

Université de Montréal

**Étude de la reconstitution de l'immunité spécifique au cytomégalovirus et au virus de la varicelle suite à la transplantation de sang de cordon ombilical**

par

Insaf Salem Fourati

Département de microbiologie, infectiologie 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

Février 2016

© Insaf Salem Fourati, 2016

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Étude de la reconstitution de l'immunité spécifique au cytomégalovirus et au virus de la varicelle suite à la transplantation de sang de cordon ombilical**

Présentée par :

Insaf Salem Fourati

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

**Nathalie Arbour, président-rapporteur**

**Hugo Soudeyns, directeur de recherche**

**Nathalie Labrecque, membre du jury**

**Krista Heinonen, examinateur externe**

**Azemi Barama représentant du doyen de la FES**

# Résumé français et mots clés

---

La transplantation de sang de cordon ombilical (TSCO) constitue un traitement de choix pour une multitude de pathologies hématologiques malignes et non malignes chez l'enfant et dans certains cas l'adulte. La TSCO est associée à certaines complications, dont une reconstitution immunitaire plus lente et une incidence élevée d'infections opportunistes, notamment celles reliées au cytomégalovirus (CMV) et au virus varicella-zoster (VZV). Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la caractérisation de la reconstitution immunitaire spécifique au CMV et au VZV. Nos résultats ont démontré que la reconstitution de l'immunité cellulaire ne requiert ni un statut séropositif pré-transplantation ni le développement de la maladie. De plus, des reconstitutions spontanées ont été détectées chez certains patients séronégatifs vis-à-vis du CMV ou du VZV. Outre le fait qu'elle se manifeste surtout à partir de 6 mois post-transplantation, ladite reconstitution mérite le qualificatif de « protectrice » en termes de réactivations virales et du développement de signes cliniques lorsqu'une fréquence de 150 cellules produisant l'IFN- $\gamma$ /million est dépassée. Toutefois, moins de 5% des patients développent une réponse T anti-VZV et anti-CMV au cours 100 premiers jours suivant la TSCO. Il est donc possible que les lymphocytes CD8<sup>+</sup> T provenant du SCO, comparativement à leurs homologues provenant de la moelle osseuse (MO), présentent un défaut de fonctionnalité, communément appelé « épuisement clonal ». La caractérisation du répertoire de récepteurs inhibiteurs exprimés par les cellules T CD8<sup>+</sup> suivant la TSCO ou la transplantation de moelle osseuse (TMO) a révélé une augmentation significative de la fréquence des cellules exprimant PD-1 tôt suivant la transplantation. Cette population, caractérisée majoritairement par un phénotype effecteur-mémoire (EM), démontre une perte significative de la capacité proliférative et exprime moins d'IFN- $\gamma$ , d'IL-2, de TNF- $\alpha$  et de CD107a. Une meilleure caractérisation de la reconstitution immunitaire après TSCO permettrait, d'une part de sélectionner des biomarqueurs en vue d'une meilleure gestion des patients à risques de développer des infections virales et/ou de rechuter, et d'autre part d'améliorer leur pronostic.

**Mots clés:** Transplantation de sang de cordon ombilical, cytomégalovirus, virus de la varicelle, reconstitution immunitaire, lymphocytes T, épuisement clonal.

# Abstract and keywords

---

Umbilical cord blood transplantation (UCBT) is a treatment of choice for a variety of hematological malignancies and non-malignant diseases in children and, in some cases, in adults. UCBT is associated with a slower immune reconstitution and a high incidence of viral infections, especially related to cytomegalovirus (CMV) and the varicella-zoster virus (VZV). As part of this work, we aimed to assess the reconstitution of CMV and VZV-specific T cell responses. Neither pre-transplant serostatus nor disease development is required for development of T cell mediated immunity. Moreover, spontaneous reconstitution detected in some patients who were seronegative for CMV or VZV. Detected especially after 6 months post-transplant, antiviral responses are protective in terms of viral reactivation and development of clinical signs, when a frequency of 150 cells producing d'IFN- $\gamma$  / million is achieved. However, less than 5% of patients develop an antiviral response during the first 100 following UCBT. Compared to their bone marrow (BM) counterparts, UCB CD8<sup>+</sup> T lymphocytes may be functionally impaired, a state commonly called « clonal exhaustion ». Characterization of the inhibitory receptors repertoire expressed by CD8<sup>+</sup> T cells following UCBT and BMT showed a significant increase in the frequency of cells expressing PD-1 early after transplantation. This population, mainly characterized by effector phenotype, showed a significant loss of proliferative capacity and produced less IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  and CD107a. An improved understanding of the CD8<sup>+</sup> T cell compartment following UCBT, as well as biomarkers related to T cell exhaustion will decrease infection, transplant related mortality and correlate with better prognosis

**Keywords:** umbilical cord blood transplantation, cytomegalovirus, varicella-zoster virus, immune reconstitution, T cells, clonal exhaustion.

# Table des matières

---

Résumé français et mots clés .....	ii
Abstract and keywords .....	iii
Table des matières.....	iv
Listes des figures.....	vii
Liste des tableaux .....	ix
Liste des abréviations .....	x
Remerciements.....	xiv
Dédicace .....	xvii
<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Mise en contexte .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Le système immunitaire.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Les lymphocytes T.....</b>	<b>4</b>
1.3.1 La thymopoïèse .....	4
1.3.2 Fonction des lymphocytes T.....	7
<b>1.4 La transplantation de cellules souches hématopoïétiques .....</b>	<b>10</b>
1.4.1 Les indications pour la transplantation de cellules souches hématopoïétiques.....	10
1.4.2 Les bases génétiques de la sélection des donneurs .....	11
1.4.3 Le traitement de conditionnement pré-transplantation .....	12
1.4.4 Les sources de cellules souches hématopoïétiques .....	14
1.4.4.1 La transplantation de sang de cordon ombilical .....	15
1.4.5 La reconstitution immunitaire après TSCO .....	18
1.4.5.1 Reconstitution des neutrophiles et des plaquettes .....	18
1.4.5.2 Reconstitution des cellules NK .....	20
1.4.5.3 Reconstitution des lymphocytes B .....	21
1.4.5.4 Reconstitution des lymphocytes T .....	21
1.4.6 Biologie des lymphocytes T du sang de cordon ombilical .....	24
1.4.7 Rôle des lymphocytes T dans les complications liées à la TSCO .....	26
1.4.7.1 L'échec et rejet de greffe.....	26
1.4.7.2 La réaction du greffon contre l'hôte: GvHD .....	27
1.4.7.3 La rechute de leucémie et l'effet du greffon contre la leucémie : effet GvL.....	32
1.4.7.4 Les infections virales à CMV et à VZV après TSCO.....	34
1.4.7.4.1 Les infections à CMV .....	34
1.4.7.4.2 Les infections à VZV .....	37
1.4.8 Stratégies d'amélioration de la TSCO .....	38
1.4.8.1 La double TSCO (dTSCO).....	38
1.4.8.2 Expansion des CSH.....	40

1.4.8.3 Amélioration du homing des CSH.....	41
1.4.8.4 Production in vitro de lymphocytes T spécifiques aux antigènes viraux et tumoraux.....	42
<b>1.5 Épuisement clonal des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.....</b>	<b>43</b>
1.5.1 Épuisement clonal des lymphocytes T dans le contexte d'une TCSH.....	43
1.5.2 Origine de l'épuisement clonal.....	48
1.5.3 Fonctions inhibitrices des récepteurs inhibiteurs impliqués dans l'épuisement clonal des lymphocytes T.....	51
1.5.3.1 Régulation de l'expression de PD-1 et de ses ligands.....	54
1.5.3.2 CTLA-4.....	57
1.5.3.3 BTLA.....	58
1.5.3.4 2B4.....	59
1.5.3.5 TIM-3.....	59
1.5.3.6 LAG-3.....	60
1.5.3.7 TIGIT.....	60
1.5.4 Épuisement clonal et régulation transcriptionnelle.....	61
1.5.5 Épuisement clonal, médiateurs solubles et cellules régulatrices.....	64
<b>1.6 Problématique du projet de recherche.....</b>	<b>66</b>
<b>1.7 Hypothèses de recherche.....</b>	<b>68</b>
<b>1.8 Objectifs de recherche.....</b>	<b>68</b>
<b>Chapitre 2 Premier article.....</b>	<b>69</b>
<b>2.1 Mise en contexte et contribution au premier article.....</b>	<b>70</b>
<b>2.2 Long Abstract.....</b>	<b>72</b>
<b>2.3 Introduction.....</b>	<b>72</b>
<b>2.4 Protocol Text.....</b>	<b>74</b>
<b>2.5 Representative Results.....</b>	<b>78</b>
<b>2.6 Discussion.....</b>	<b>81</b>
<b>2.7 Acknowledgements.....</b>	<b>86</b>
<b>2.8 References.....</b>	<b>86</b>
<b>2.9 Tables and Figures.....</b>	<b>91</b>
<b>Chapitre 3 Deuxième article.....</b>	<b>98</b>
<b>3.1 Mise en contexte et contribution au deuxième article.....</b>	<b>99</b>
<b>3.2 Abstract.....</b>	<b>101</b>
<b>3.3 Introduction.....</b>	<b>102</b>
<b>3.4 Materials and methods.....</b>	<b>105</b>
<b>3.5 Results.....</b>	<b>110</b>
<b>3.6 Discussion.....</b>	<b>119</b>
<b>3.7 Acknowledgements.....</b>	<b>126</b>
<b>3.8 References.....</b>	<b>127</b>
<b>3.9 Figure legends.....</b>	<b>140</b>
<b>Chapitre 4 Troisième article.....</b>	<b>151</b>
<b>4.1 Mise en contexte et contribution au troisième article.....</b>	<b>152</b>
<b>4.2 Abstract.....</b>	<b>154</b>
<b>4.3 Introduction.....</b>	<b>155</b>
<b>4.4 Patients, materials, and methods.....</b>	<b>156</b>

<b>4.5 RESULTS .....</b>	<b>160</b>
<b>4.6 Discussion .....</b>	<b>165</b>
<b>4.6 Acknowledgements .....</b>	<b>168</b>
<b>4.7 References .....</b>	<b>168</b>
<b>4.8 Figure legends .....</b>	<b>176</b>
<b>Chapitre 5 Discussion .....</b>	<b>188</b>
<b>5.1 Pouvoir protecteur des lymphocytes T du SCO contre les infections au CMV et au VZV .....</b>	<b>189</b>
5.1.1 Immunité antivirale pendant les 100 premiers jours suivant la TSCO: absence totale, défaut de prolifération, ou fonction altérée? .....	190
5.1.2 Des réponses immunitaires antivirales en absence de signes de présence virale.....	195
5.1.3 L'ATG: une question de temps et de dose .....	197
5.1.4 Monitoring immunitaire pour une meilleure gestion des patients.....	198
<b>5.2 L'épuisement clonal des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> tôt suivant la TCSH.....</b>	<b>200</b>
5.2.1 Expression de PD-1 par les lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> totaux.....	202
<b>5.3 Les récepteurs inhibiteurs au-delà de l'épuisement clonal après TCSH.....</b>	<b>204</b>
<b>5.4 Conclusions et perspectives.....</b>	<b>206</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>209</b>

# Listes des figures

---

## *CHAPITRE 1*

---

Figure 1. 1 Développement thymique des lymphocytes T .....	6
Figure 1. 2 Association phénotypique et fonctionnelle au niveau des différentes sous-populations de lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> humains. ....	9
Figure 1. 3 Principales indications pour une transplantation allogénique de CSH.....	10
Figure 1. 4 La transplantation de cellules souches hématopoïétiques .....	15
Figure 1. 5 Cinétique de reconstitution et les complications reliées à la transplantation après TSCO.....	19
Figure 1. 6 Le déroulement de la GvHD aiguë.....	30
Figure 1. 7 Aperçu des mécanismes impliqués dans l'épuisement clonal.....	50
Figure 1. 8 Récepteurs inhibiteurs exprimés par les cellules T CD8 <sup>+</sup> .....	52
Figure 1. 9 Mécanismes de l'inhibition médiée par le récepteur PD-1 .....	55

## *CHAPITRE 2*

---

Figure 2. 1 Effect of $\gamma$ -irradiation of live inactivated vzv vaccine on the frequency of IFN- $\gamma$ -producing cells as determined using IFN- $\gamma$ elispot .....	94
Figure 2. 2 Quantification of vzv-specific cell-mediated immune responses in children with documented evidence of previous infection with vzv .....	95
Figure 2. 3 Effect of depletion of CD4 <sup>+</sup> or CD8 <sup>+</sup> cells on the frequency of IFN- $\gamma$ -producing cells as measured using IFN- $\gamma$ elispot.....	96
Figure 2. 4 Representative Elispot wells.....	97

## *CHAPITRE 3*

---

Figure 3. 1 Reconstitution of CD8 <sup>+</sup> and CD4 <sup>+</sup> T lymphocytes t in study subjects .....	147
Figure 3. 1 Reconstitution of CMV-specific T cells over the post-transplant period.....	147
Figure 3. 2 Reconstitution of CMV-specific T cell responses in recipient of umbilical cord blood transplantation.....	148
Figure 3. 3 CMV-specific T cell responses in HLA-A2 <sup>+</sup> subjects .....	149
Figure 3. 4 Reconstitution of VZV-specific T cells over the post-transplant period.....	150
Figure 3. 5 Reconstitution of VZV-specific T cell responses in recipient of umbilical cord blood transplantation.....	150



## **CHAPITRE 4**

---

Figure 4. 1 expression pattern of single inhibitory receptors by CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> T cells in pediatric recipients of HSCT .....	182
Figure 4. 2 PD-1 is preferentially expressed on T <sub>EM</sub> CD8 <sup>+</sup> T cells in pediatric recipients of HSCT during the first 100 days after transplantation .....	183
Figure 4. 3 Expression of PD-1 affects the proliferative capacity of CD8 <sup>+</sup> T cells following HSCT .....	184
Figure 4. 4 Expression of PD-1 impaired cytokine production of CD8 <sup>+</sup> T cell following HSCT .....	185
Figure 4. 5 Supplemental figure 1 Dual expression of inhibitory receptors and single expression of CTLA-4 and LAG-3 by CD8 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> T cells in pediatric recipients of umbilical cord blood transplantation (UCBT) .....	186
Figure 4. 6 Supplemental figure 2 Mean fluorescence intensity of inhibitory receptors in pediatric recipients of umbilical cord blood transplantation (UCBT) .....	187

# Liste des tableaux

---

## *CHAPITRE 2*

---

Tableau 1.1 Avantages et inconvénients de la TSCO .....	18
---	----

## *CHAPITRE 2*

---

Tableau 2.1 Additional troubleshooting .....	93
--	----

## *CHAPITRE 3*

---

Tableau 3. 1 Clinical characteristics of study subjects .....	145
Tableau 3. 2 Association between frequencies of CMV- or VZV-specific cells producing IFN- $\gamma$ , absolute CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , and CD8 <sup>+</sup> T cell counts, and frequencies of naïve CD8 <sup>+</sup> and CD4 <sup>+</sup> T cells during the first 6 months post-UCBT .....	146
Tableau 3. 3 Comparison between VZV-specific IFN- $\gamma$ and antibody production .....	146

## *CHAPITRE 4*

---

Tableau 4. 1 Clinical characteristics of study subjects .....	181
---	-----

# Liste des abréviations

---

## *A*

---

**AgmH** *Antigène mineur d'histocompatibilité*

**ATG** *Anti-thymocyte globulin*

**ADV** *Adénovirus*

## *B*

---

**Bat3** *HLA-B-associated transcript 3*

**BCIP/NBT** *5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl Phosphate et Nitro Blue Tetrazolium Chloride*

**BTLA** *B- and T-lymphocyte attenuator*

## *C*

---

**CAR** *Chimeric antigen receptors*

**CFSE** *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*

**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** *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*

**cSMAC** *Central supramolecular activation cluster*

## *D*

---

**DAMP** *Danger Associated Molecular Pattern*

**DC** *Dendritic cells*

**DLL1** *DLL1 delta-like 1*

**DMSO** *Diméthylsulfoxyde*

**DPP4** *Dipeptidyl peptidase-4*

**dTSCO** *double transplantation de sang de cordon ombilical*

## ***E***

---

**EBV** *Epstein-Barr virus*

**EH** *Expansion homéostatique*

**ELISpot** *Enzyme-linked immunosorbent spot*

**EM** *Effecteur mémoire*

**EMRA** *Effecteur en différenciation terminale*

## ***G***

---

**GP** *Glycoprotéine*

**GvHD** *Graft-versus-host-disease*

**GvL** *Graft-versus-leukemia*

**G-CSF** *Granulocyte colony-stimulating factor*

## ***H***

---

**HHV** *Human herpes virus*

**HIV** *Graft-versus-host disease*

**HLA** *Human leukocyte antigen*

**HVEM** *Herpesvirus entry mediator*

## ***I***

---

**IFN- $\gamma$**  *Interféron-gamma*

**Ig** *Immunoglobuline*

**IL** *Interleukine*

**IO** *Infections opportunistes*

**IRM** *Infection related mortality*

**IRF** *Interferon regulatory factor*

**ISRE** *Interferon-stimulated response element*

**ITIM** *Immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif*

**ITSM** *Immunoreceptor tyrosine-based switch motif*

## ***L***

---

**LAG-3** *Lymphocyte-activation gene 3 (CD223)*

**LCMV** *Lymphocytic choriomeningitis virus*

## ***M***

---

**MO** *Moelle ossseuse*

## ***N***

---

**NIMA** *Non-inherited maternal antigen*

**NFAT** *Nuclear factor of activated T cells*

**NK** *Natural killer*

**NMDP** *National marrow donor program*

## ***P***

---

**PAMP** *Pathogen-associated molecular pattern*

**PBMC** *Peripheral-blood mononuclear cell*

**PD-1** *Programmed death 1*

**PD-L** *Programmed death 1 ligand*

**PI3K** *Phosphoinositide 3-kinase*

**PVRL2** *Poliovirus Receptor-Related 2*

## ***R***

---

**RAG** *Recombination-activating genes*

## ***S***

---

**SP** *Sang périphérique*

**SAP** *Signaling lymphocytic activation molecule-associated protein*

**SCO** *Sang de cordon ombilical*

**SHP** *Tyrosine phosphatase*

**SIV** *Simian immunodeficiency virus*

**STAT** *Signal Transducers and Activators of Transcription*

## ***T***

---

**TCSH** *Transplantation de cellules souches hématopoïétiques*

**TCR** *T cell receptor*

**TIGIT** *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*

**TIM3** *T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3*

**TMO** *Transplantation de moelle osseuse*

**TNF** *Tumor necrosis factor*

**TLR** *Toll like receptor*

**TREC** *T-cell receptor excision circle*

**TRM** *Transplant related mortality*

**Treg** *T régulatrice*

**TSCO** *Transplantation de sang de cordon ombilical*

**TSP** *Transplantation de sang périphérique*

## ***V***

---

**VHC** *Virus de l'hépatite C*

**VIH** *Virus de l'immunodéficience humaine*

**VISTA** *V-domain immunoglobulin (Ig)-containing suppressor of T-cell activation*

**VZV** *Varicella-zoster virus*

## ***Z***

---

**Zap70** *Zeta-chain-associated protein kinase 7*

# Remerciements

---

Me voilà rendu à un moment plein d'émotions qui me fait réaliser que mes longues années de travail ardu portent ENFIN leur fruit. J'ai beaucoup de reconnaissance à témoigner envers plusieurs personnes qui m'ont tant aidée tout au long de cette aventure loin d'être dénudée d'interactions humaines. Ces 5 années représentent avant tout un parcours que je qualifierais « de dent de scie », oscillant entre baisse de morale, doute, relève de défi et excitation.

Je tiens à remercier en premier mon directeur de recherche, Dr Hugo Soudeyns. Merci pour ta confiance. Merci de m'avoir appris à être autonome et à tester mes hypothèses. Nonobstant tes engagements, ta relecture finale méticuleuse de chacun des chapitres m'a sans aucun doute permis de préciser mon propos. J'ai été particulièrement sensible à tes qualités humaines, une denrée si rare de nos jours.

Je tiens également à remercier les membres du jury : Dre Nathalie Arbour, Dre Nathalie Labrecque, Dre Krista Heinonen d'avoir accepté d'évaluer ma thèse. Je tiens à remercier tous les membres du GRETISC en particulier Samira Mezziani. Samira, la collecte des données clinique n'aurait pas été pareille sans ta présence. Tu étais aussi la personne porteuse de bonnes nouvelles « *Insaf, j'ai un nouveau patient* » qui essayait de m'aider pour avoir un nombre suffisant de patients.

J'adresse aussi mes remerciements à tous les membres du laboratoire. Martine, le pilier de notre laboratoire. Merci d'avoir été la maman de tous les étudiants. Sans toi je ne sais pas ce que le laboratoire serait. Natacha, j'ai tellement appris de toi en si peu de temps. Tu continues à m'aider sans rien attendre en retour. Merci infiniment pour la lecture de

mes articles, de ma discussion et pour toutes les remarques pertinentes. Doris, j'ai tellement apprécié toutes les discussions qu'on a eues. J'ai appris à bien te connaître et ce fut très agréable.

Je voudrais remercier mes très chers parents, sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Merci de m'avoir bien élevé, inculqué les bonnes valeurs et appris à ne jamais baisser les bras et viser l'excellence. Merci pour tous vos encouragements et pour votre confiance. Vous êtes les meilleurs parents au monde. Je sais que vous êtes très fiers de ce que j'ai accompli, et je ne vous décevrais jamais. Papa, je me souviens toujours de ta phrase « *Ne me dis pas que tu es partie au Canada juste pour faire une maîtrise* ». Me voilà docteur, enfin presque. Je tiens également à remercier mes très chères sœurs Hela et Bochra et ma nièce Myriam. Les milliers de kilomètres qui nous séparent n'ont rien changé à notre relation. On est encore plus proches et on a encore non moments de folie dont on ne peut se passer. Merci pour vos encouragements, pour votre présence et votre confiance. Mes remerciements vont également à mes chers beaux-parents, tonton Moncef et tata Haifa, pour leur aide, leur confiance, leur présence et leur encouragement continu.

Les derniers et non les moindres, mes hommes, ma vie : mon très cher époux, Amine et la prunelle de mes yeux, Skander. Amine, sans toi je n'aurai pas fait de doctorat et tu le sais très bien. Merci pour ta confiance en moi presque inébranlable, j'en suis vraiment reconnaissante. Merci d'avoir été mon plus grand soutien surtout moral. Merci d'avoir accepté d'être mon bouc émissaire pendant les périodes les plus difficiles en essayant toujours et sans cesse de me faire changer les idées. Merci pour toutes les discussions aussi enrichissantes qu'apaisantes. Tu es un mari formidable. C'est une chance immense de t'avoir dans ma vie et je ne te remercierai jamais assez. Skander, tu as grandi en même



temps que mon projet de doctorat. Merci de m'avoir permis d'être à la fois une super maman et une doctorante, de me surpasser et d'atteindre les sommets. Maman est très fière de toi et de ce qu'elle a accompli. Tu es mon bonheur.

# Dédicace

---

*À mes parents : Hamadi et Hédia*

*À mes hommes : Amine et Skander*

*Ils sauront pourquoi...*

*À ma grand-mère partie trop tôt...*



# **CHAPITRE 1 INTRODUCTION**

## 1.1 Mise en contexte

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques (TCSH) telle que pratiquée de nos jours est le fruit de révolutions incessantes. La plus marquante concerne sans doute l'identification du sang de cordon comme source de cellules souches hématopoïétiques. Ceci a permis de faire des avancées décisives à la transplantation allogénique. Malheureusement de nombreux problèmes continuent d'entraver le succès de la transplantation de sang de cordon ombilical (TSCO), l'incidence élevée d'infections opportunistes en particulier causées par le cytomégalovirus (CMV) et le virus de la varicelle (VZV) demeure un facteur limitant. Ceci ravive le débat sur le potentiel des lymphocytes T issus du SCO à fournir une protection immunitaire transitoire jusqu'à la reprise de la thymopoïèse. Les mécanismes immunologiques prédisposant les patients receveurs de TSCO à des infections virales plus sévères sont encore mal caractérisés.

L'objectif principal du présent projet de doctorat était de définir la fonctionnalité des lymphocytes T spécifiques au CMV et au VZV issus du SCO une fois transférés aux patients, et d'identifier les facteurs cliniques et virologiques qui influencent le développement de réponses antivirales protectrices. Le deuxième objectif de ce travail visait à déterminer les raisons pour lesquelles l'incidence et la sévérité des infections virales sont particulièrement plus élevées après la TSCO. Nous avons donc étudié le profil d'expression de plusieurs molécules co-inhibitrices associées avec le dysfonctionnement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, processus communément désignée par « épuisement clonal ». La présente revue de la littérature a pour but d'exposer l'état des connaissances sur la TCSH, en mettant l'accent sur la TSCO, ainsi que sur l'épuisement clonal des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> tout en expliquant la relation qui les lie.

## 1.2 Le système immunitaire

Le système immunitaire s'est doté au cours de l'évolution d'une capacité anti-infectieuse qui s'est conjuguée à une organisation cellulaire et moléculaire complexe pour en garantir l'efficacité de nous protéger contre l'innombrable variété de dangers, tant externes qu'internes, allant des agents infectieux pathogènes aux mutations à l'origine de cancer. Le système immunitaire peut être divisé en deux branches distinctes : le système inné et le système adaptatif [1]. La première ligne de défense, mise en place grâce au système immunitaire inné, est médiée par des cellules dotées de récepteurs non polymorphiques dont les plus connus sont les TLRs (« *Toll-like receptors* ») exprimés à la surface des cellules dendritiques ou les macrophages [2]. Cette réponse innée demeure toutefois incapable de générer une mémoire [3, 4]. Contrairement à l'immunité innée, le développement d'une réponse spécialisée contre les pathogènes, aussi appelée immunité adaptative, découle de leur reconnaissance par les lymphocytes B ou T, chefs d'orchestre respectivement de l'immunité à médiation humorale, caractérisée par la sécrétion d'anticorps, et cellulaire. Les lymphocytes T ne peuvent reconnaître l'antigène que sous forme de peptides associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), de classe I ou II, exprimées à la surface de cellules présentatrices d'antigènes. Le CMH, ou système HLA (« *Human leukocyte antigen* ») chez l'homme, est localisé sur le bras court du chromosome 6 dont les gènes codent principalement pour des protéines allogéniques, les antigènes majeurs d'histocompatibilité [5, 6]. Les deux allèles de chaque locus sont exprimés de manière codominante. La plupart des individus sont donc hétérozygotes à chaque locus du CMH. Les gènes impliqués dans la réponse immunitaire peuvent être subdivisés en deux classes, I et II, structurellement et fonctionnellement

différentes. Le CMH de classe I inclut les gènes de classe I classiques : HLA-A, B, C, qui codent pour des protéines ubiquitaires présentes à la surface de toutes les cellules nucléées, ainsi que des gènes HLA de classe I non classiques (HLA-E, F et G) caractérisés par un polymorphisme limité. Le CMH de classe I permet de présenter des peptides immunogènes de 9 acides aminés provenant d'antigènes endogènes générées par le protéosome [7, 8] . Le CMH de classe II, quant à lui, inclut les gènes HLA-DR, -DQ et -DP exprimés de façon constitutive par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) incluant les cellules dendritiques, les cellules B, les macrophages et l'épithélium thymique. Le CMH de classe II a la capacité de présenter les peptides exogènes ayant une longueur de 12 à 20 acides aminés [9, 10].

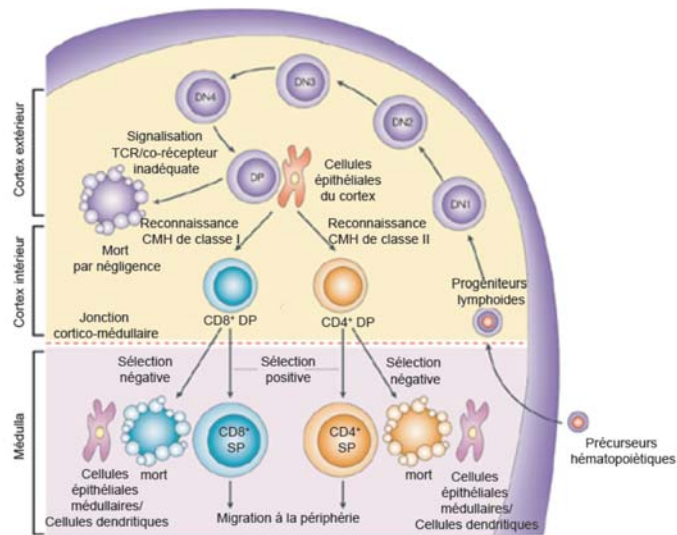
## **1.3 Les lymphocytes T**

### **1.3.1 La thymopoïèse**

Les progéniteurs lymphoïdes issus de la moelle osseuse (MO) migrent jusqu'au thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire d'abord vers la zone sous-capillaire du cortex extérieur puis vers le cortex intérieur avant de passer à travers la médulla thymique. Composante clé du micro-environnement thymique, les cellules épithéliales thymiques forment des niches permettant d'interagir de façon coordonnée et étroite avec les progéniteurs des cellules T. Durant les étapes initiales de leur différenciation, les thymocytes n'expriment ni le co-récepteur CD4 ni le co-récepteur CD8 (cellules doubles négatives ou DN), et se déclinent en quatre stades de différenciation séquentiels identifiés selon l'expression de CD44 et CD25 (récepteur à l'IL-2) : (DN1, CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>; DN2, CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>; DN3, CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>; et DN4, CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>) [11, 12]. Les cellules DN

peuvent générer des lymphocytes T qui expriment soit les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR ou les chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  [13]. Pour, les cellules qui se sont engagées dans une voie leur permettant de se différencier en lymphocytes T  $\alpha\beta$ , le stade DN3 marque le réarrangement aléatoire des segments de gènes V, D et J pour la chaîne  $\beta$  qui requiert l'expression des recombinaisons RAG1 et RAG2 (« *Recombination-activating genes*»). [14, 15]. Lorsque productif, la chaîne  $\beta$  s'associe avec le complexe CD3 et la chaîne invariante du pré-TCR $\alpha$ , contrôlant ainsi la transition du stade DN3 au stade DN4 et donnant naissance à des lymphocytes T avec un TCR $\alpha\beta$  doubles positifs, CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>. L'interaction des thymocytes avec le complexe CMH-peptide présentés par les cellules épithéliales thymiques conditionne leur devenir, et ce via des mécanismes de mort par négligence [16], de sélection positive (restriction par le CMH) [17] et de sélection négative (tolérance centrale) (Figure 1.1) [18]. Seulement les lymphocytes avec un TCR capable de se lier avec une affinité faible au complexe CMH-peptide (CMH-p) du soi reçoivent un signal de survie. Les peptides présentés aux thymocytes sont soit produits par les TEC soit importés des tissus périphériques par les macrophages et les cellules dendritiques. À l'issue de ces étapes de sélection thymique, les lymphocytes T matures exprimant le co-récepteur CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> se retrouvent dans le sang périphérique et dans les ganglions lymphatiques.





**Figure 1. 1 Développement thymique des lymphocytes T**

Les thymocytes doubles négatifs n'exprimant pas de  $CD4^+$  et de  $CD8^+$  peuvent être subdivisés en quatre stades de différenciation: (DN1,  $CD44^+CD25^-$ ; DN2,  $CD44^+CD25^+$ ; DN3,  $CD44^-CD25^+$ ; and DN4,  $CD44^-CD25^-$ ). La progression des cellules du stade DN2 au stade DN4 est associée à l'expression du pre-TCR, produit suite au réarrangement de la chaîne  $\beta$  du TCR. Les cellules doubles positives avec un  $TCR\alpha\beta$  et exprimant  $CD4^+$  et  $CD8^+$  vont interagir avec les cellules du cortex exprimant des niveaux élevés de complexes CMH-peptides du soi. L'intensité des signaux transmis suite à cette interaction va conditionner le devenir des cellules. Une faible interaction entraîne la mort par négligence, un signal intermédiaire permet de transmettre un signal de survie aux lymphocytes qui vont subir par la suite la sélection positive, et une très forte interaction avec les peptides du soi induit la sélection négative des thymocytes. L'expression du co-récepteur CD4 permet l'interaction du TCR avec les complexes peptide-CMH de classe II alors que l'expression de CD8 assure son interaction avec les complexes peptide-CMH de classe I [19].

Contrairement à la souris, pour laquelle le développement du système immunitaire adaptatif commence à la naissance, les cellules T humaines peuvent être détectées à 10 jours de gestation [20]. Quelques études ont rapporté que les cellules T fœtales détectées à 16-24 semaines de gestation sont phénotypiquement différentes des cellules T naïves présentes chez les nouveaux nés ou les adultes [21-23]. La particularité de ce phénotype

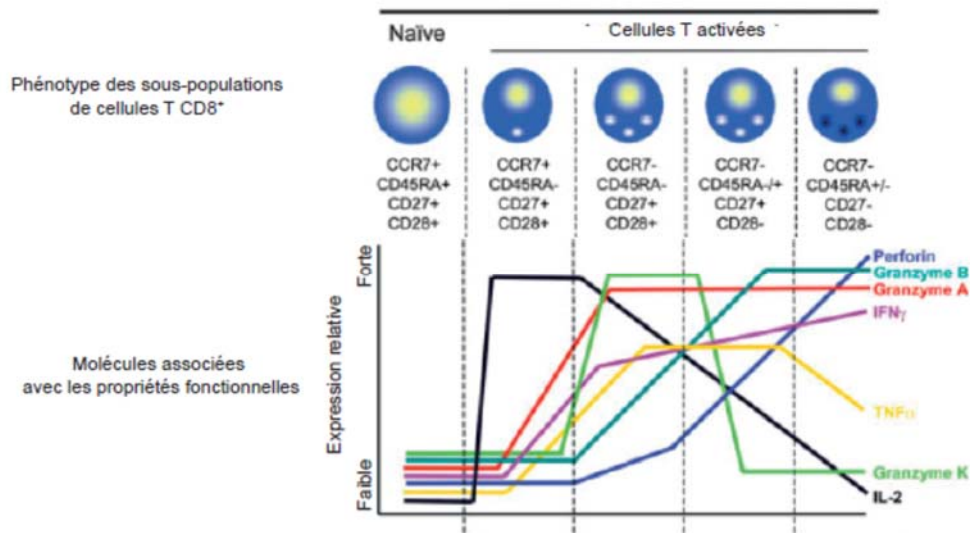
pourrait être associée à une induction plus rapide de la tolérance mise en place durant les premières étapes de l'ontogénie du système immunitaire. On pourrait présager, qu'au même titre que les modèles murins et aviaires, les cellules souches fœtales et adultes possèdent des localisations tissulaires, des propriétés phénotypiques, un potentiel fonctionnel et une capacité de différenciations différentes [24-26]. Il n'est pas encore clair si les générations des deux populations de cellules souches (fœtales et adultes) sont indépendantes l'une de l'autre ou que les cellules T fœtales constituent la version immature des cellules T adultes. Une élégante étude par Mold et *al.* propose que les thymocytes sont produits en deux vagues, la première issue des cellules souches présentes dans le foie fœtal et la deuxième issue des cellules souches provenant de la moelle osseuse fœtale [27]. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> fœtaux sont dotés de propriétés fonctionnelles de type tolérogènes, perçues à travers leur prédisposition à se différencier en cellules T régulatrices (Treg) suite à une stimulation *in vitro*, mais également à travers leur abondance au niveau des tissus périphériques à mi-gestation [28, 29]. Il serait intéressant d'examiner si ce biais de différenciation vers une tolérance immunitaire est restreint aux antigènes du soi et aux antigènes maternels, ou s'il est observé également dans le cas d'antigènes étrangers rencontrés au cours du développement.

### **1.3.2 Fonction des lymphocytes T**

L'activation et la différenciation des cellules T requiert trois signaux : *i*) l'engagement du TCR avec le complexe CMH-peptide, *ii*) les signaux de costimulation délivrés par les cellules présentatrices d'antigènes, *iii*) la stimulation par les cytokines pro-inflammatoires [30]. Ces multiples interactions qu'entretiennent les lymphocytes T avec les CPA

induisent une cascade de réactions transcriptionnelles engageant la cellule T dans une voie de différenciation précise. L'établissement du profil phénotypique des différentes sous populations T peut se faire sur la base de l'expression de récepteurs impliqués dans l'activation des cellules T (CD45RA et CD45RO), de costimulation (CD27 ou CD28) et de chimiokines (CCR7) [31]. Les lymphocytes T aussi bien CD8<sup>+</sup> que CD4<sup>+</sup> peuvent être subdivisés en 4 populations : les lymphocytes T naïfs, central-mémoires (CM : CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>), effecteurs-mémoires (EM: CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>), effecteur terminaux (EMRA: CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>). Les lymphocytes T naïfs passent continuellement du sang périphérique vers les ganglions lymphatiques jusqu'à ce qu'ils reconnaissent l'antigène présenté par les CPA. Une fois activées, les cellules T naïves prolifèrent de façon exponentielle pour former les populations effectrices (EM et EMRA). Durant la phase de contraction, alors que la majorité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> effecteurs sont engagés dans une voie apoptotique, 5 % seulement survivent et se différencient en cellules mémoires (les CM) présents dans les organes lymphoïdes secondaires capables de monter une réponse immunitaire robuste suite à une deuxième exposition à l'antigène [32, 33]. Il en découle une spécificité antigénique, une protection immédiate et une mémoire immunitaire. Au-delà de la classification simpliste des cellules T, on découvre une multitude de sous-populations lymphocytaires T qui se démarquent en se basant à la fois sur l'expression de marqueurs de surface et les marqueurs intracellulaires, reflétant la large hétérogénéité des cellules T et fournissant une importante avancée conceptuelle en termes de dynamique, de survie et de compartimentalisation des cellules T. Outre la fréquence des lymphocytes T (la magnitude de la réponse immunitaire) et leur phénotype, la qualité de la réponse s'ajoute à ses critères pour définir la réponse immunitaire

optimale. En effet, la polyfonctionnalité des cellules CD8 se traduisant par l'ensemble des molécules produites par une même cellule détermine la qualité de la réponse. La fonctionnalité de ces cellules est évaluée selon leur capacité à produire l'IL2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , MIP1 $\beta$  et CD107a et selon leur capacité de dégranulation (Figure 1.2) [31].



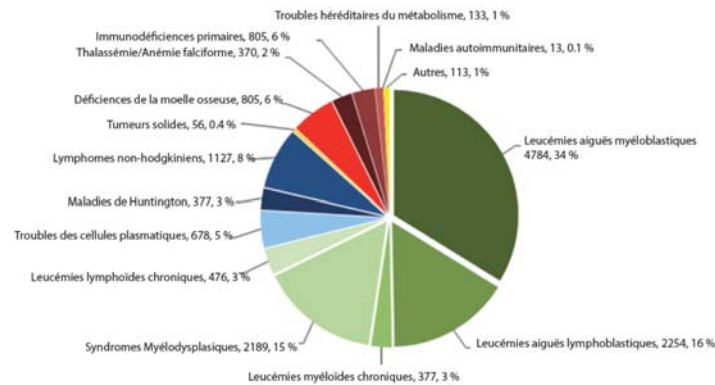
**Figure 1. 2 Association phénotypique et fonctionnelle au niveau des différentes sous-populations de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> humains.**

CM : central mémoire, EM : effecteur mémoire, EMRA : effecteur mémoire terminalement différencié [31].

## 1.4 La transplantation de cellules souches hématopoïétiques

### 1.4.1 Les indications pour la transplantation de cellules souches hématopoïétiques

La transplantation de cellules souches hématopoïétique (TCSH) constitue un traitement de choix pour les pathologies hématologiques malignes (leucémie aiguë et chronique) et non malignes (aplasies médullaires congénitales ou acquises, anomalies innées du métabolisme) (Figure 1.3). La première TCSH fut accomplie par Gatti *et al.* en 1968 [34].



**Figure 1. 3 Principales indications pour une transplantation allogénique de CSH**

Nombre absolu et proportions relatives principales indications pour la TCSH en Europe en 2010. *Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Bone Marrow Transplantation [35], copyright (2014).*

On parle d'une autogreffe lorsque les cellules souches hématopoïétiques (CSH) proviennent du patient lui-même et d'une allogreffe (ou greffe allogénique) lorsque ces dernières proviennent d'un autre individu. Dans ce cas, le donneur peut être apparenté (membre de la famille) ou non-apparenté. Nous nous intéresserons ici plutôt à la greffe allogénique.

#### 1.4.2 Les bases génétiques de la sélection des donneurs

Le système humain d'histocompatibilité détient une place prépondérante dans le domaine de la TCSH qui découle à la fois de son expression ubiquitaire polymorphe et de son rôle fonctionnel largement dominant dans les réactions allogéniques inter-individus. L'envergure de la réponse induite par le système HLA n'exclut pas l'existence d'autres facteurs qui contribuent aux réactions immunitaires contre le non-soi tel que par exemple les anticorps naturels contre les déterminants ABO (groupes sanguins). Toutefois, l'individualité immunologique dictée par le système HLA est de loin la principale source des réactions immunitaires dirigées contre les alloantigènes. De ce fait, la sélection de donneurs potentiels se fait principalement sur la base de leur degré de disparité-HLA avec le receveur. Seulement 15-30 % des patients qui nécessitent une TCSH allogénique peuvent compter sur l'existence d'un donneur apparenté identique [36]. L'indisponibilité de ce type de donneur ne constitue aucunement une contre-indication à la greffe, qui peut être partiellement incompatible, tout en respectant certaines conditions.

En effet, le « *National Marrow Donnor Program* » (NMDP) a fixé le degré de compatibilité minimum accepté à 5/6 pour les loci HLA-A, -B et -DRB1. Ainsi la compatibilité n'est recherchée que sur les deux allèles de chacun des loci HLA suivants : HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 (soit une compatibilité dite 6/6). Plus tard, le locus HLA-C a été ajouté à cette liste après avoir été associé à une amélioration du pronostic après transplantation [37]. On parle aujourd'hui de greffon avec un niveau de compatibilité HLA d'au moins 7/8 pour procéder à la greffe [38]. Les données probantes issues d'études comparatives montrent que le degré de disparité entre donneur et receveur ainsi que le locus à l'origine de l'incompatibilité constituent une condition *sine qua non* à la

réussite de la greffe [39-41]. Toutefois, les avis restent encore partagés concernant l'association des différents loci avec le pronostic du patient, et il n'existe à ce jour pas de consensus établi. Toutes les études convergent néanmoins vers un même concept qui suggère que les risques accompagnant les multiples disparités peuvent être cumulatifs voire même synergiques. Lee *et al.* ont démontré qu'une compatibilité au niveau des loci HLA-A, B, C et HLA-DRB1 était corrélée à un meilleur pronostic du patient [42]. De plus, la disparité HLA-DQ semble avoir un impact mineur sur la survie du patient, à moins qu'elle ne soit couplée à une autre disparité [41, 43]. D'autres études ont noté une association entre la disparité HLA-DP et l'incidence de la maladie du greffon contre l'hôte aigüe (« *Acute Graft-versus-host-disease*»; GvHD) (discuté plus loin) [42, 44].

De plus en plus d'évidences supportent la pertinence de génotyper simultanément les HLA et les KIR (« *Killer-cell immunoglobulin-like receptors* ») du donneur. Les cellules NK, contrairement aux cellules T, sont activées en l'absence de reconnaissance du récepteur inhibiteur KIR, exprimé à leur surface, par son ligand HLA de classe I. Lorsque les HLAs de classe I du receveur ne sont pas reconnus par les KIRs du donneur, on assiste à une levée de l'inhibition de la cytotoxicité NK et la mise en place d'une réponse alloréactive permettant l'éradication des cellules cancéreuses résiduelles et des cellules présentatrices d'antigènes du receveur [45-47].

### **1.4.3 Le traitement de conditionnement pré-transplantation**

La TCSH requiert une étape préparatoire communément appelée régime de conditionnement, ayant pour but d'induire une aplasie médullaire pour prévenir le rejet par les cellules immunitaires du receveur, favorisant ainsi la prise de la greffe. Dans le

cas où la TCSH est utilisée pour le traitement de la leucémie, cette étape préparatoire permet également de supprimer, ou au moins réduire le nombre de cellules tumorales. L'intensité du régime de conditionnement est ajustée en fonction de plusieurs facteurs qui ont trait au passé médical du patient, à sa pathologie, son âge ainsi qu'au degré de disparité avec le donneur [48]. Ceci laisse entrevoir la difficulté d'établir un consensus entre les différents centres de TCSH de par le monde. Cette complexité a laissé place à une classification plus simplifiée, voire même dichotomique, des régimes de conditionnement, soit : myéloablatif et non-myéloablatif [49]. Traditionnellement, les régimes qui sont à la fois myéloablatifs et immunosuppresseurs combinent de fortes doses de chimiothérapie (drogues alkylantes, analogues de nucléosides [48]) et de radiothérapie (12 à 16 Grey fractionnées; anticorps monoclonaux radio-marqués dirigés contre les antigènes des cellules de la moelle) [50, 51]. Bien que leur utilisation ait été associée à une diminution du risque de la rechute de la leucémie après greffe, un risque considérable de toxicité et de complications, immédiates et différées, allant de la senescence des progéniteurs hématopoïétiques [52, 53] jusqu'au retard de développement chez les enfants et la possibilité de développer d'autres pathologies malignes ont été notés [48]. Une observation intéressante découlant d'une étude prospective par Bredeson *et al.* supporte la possibilité d'administrer uniquement de fortes doses de busulfan par voie intraveineuse aux patients atteints de leucémie sans toutefois affecter le risque de la rechute de la leucémie ou la mortalité liées à la transplantation [54]. Ce n'est qu'à partir du début des années 80, que les observations cliniques ont démontré que le succès de la greffe n'est pas uniquement tributaire de la capacité des cellules souches à reconstituer le système hématopoïétique et le système immunitaire du patient, mais également de la

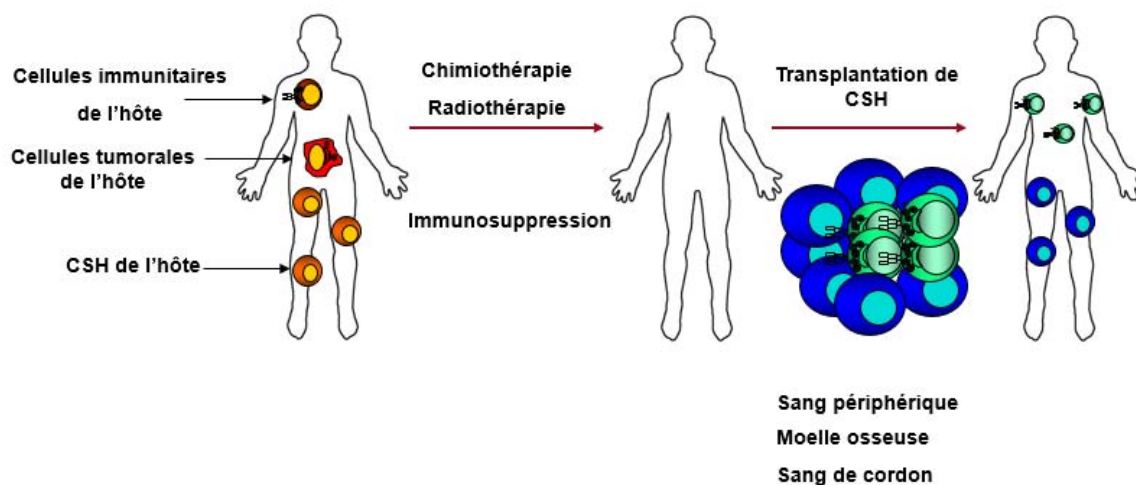


réaction du greffon contre la leucémie (« *Graft-versus-Leukemia effect* »; effet GvL) [55, 56]. Cet effet (discuté plus loin) est la conséquence directe de l'alloréactivité médiée par les cellules immunocompétentes du donneur présentes dans le greffon et dirigée contre les cellules du receveur, éliminant ainsi les cellules leucémiques quiescentes qui résistent au régime préparatoire. Dès lors, le régime à intensité réduite, connu également sous l'appellation « non-myéloablatif », a été mis en place, offrant ainsi la chance à certains patients plus âgés d'avoir accès à la greffe sans pour autant abroger l'effet anti-leucémique [57]. La principale limite liée aux conditionnements non-myéloablatifs réside dans le fait que le gain apporté par la baisse de l'intensité (environ de 30%) se fait le plus souvent au détriment de l'augmentation du risque de rechute de la leucémie [58, 59] étant donné que l'éradication de la maladie dépend en grande partie de l'effet GvL. À l'ère des régimes de conditionnement à intensité réduite, des essais randomisés contrôlés nous permettront de savoir à l'avenir si l'efficacité, en termes de survie et de qualité de vie, obtenue à long-terme est comparable à celle des régimes myéloablatifs.

#### **1.4.4 Les sources de cellules souches hématopoïétiques**

La transplantation proprement dite consiste en une infusion intraveineuse de CSH, qui vont migrer vers la moelle osseuse (MO) où elles se différencieront pour reconstituer les systèmes hématopoïétique et immunitaire (Figure 1.4) [36]. Traditionnellement, les CSH provenaient soit de la MO ou du sang périphérique (SP). Les cellules souches utilisées dans le contexte d'une transplantation de MO (TMO) sont prélevées sous anesthésie générale au niveau des crêtes iliaques postérieures [60]. Le SP quant à lui est enrichi en

CSH suite à un traitement du donneur avec du G-CSF (« *Granulocyte colony-stimulating factor* »).



**Figure 1. 4 La transplantation de cellules souches hématopoïétiques**

#### **1.4.4.1 La transplantation de sang de cordon ombilical**

Il y a plus de 25 ans, le domaine de la TCSH a été révolutionné par la reconnaissance du sang de cordon ombilical (SCO) comme une nouvelle source de CSH. Longtemps considéré comme un déchet biologique, sa découverte fut considérée comme un nouvel horizon thérapeutique pour 70% des patients faisant partie de minorités ethniques et/ou n'ayant par ailleurs pas de donneurs compatibles. Depuis, plus de 20% des TCSH réalisées utilisent le SCO comme source de CSH [61]. La première étude ayant démontré la présence de cellules formant des colonies granulocytaires pouvant se développer *in vitro* à partir du SCO fut publiée par Knudtzon *et al.* en 1974 [62]. Ce n'est qu'en 1989 que Broxmeyer *et al.* [63] ont démontré que le SCO contenait un nombre suffisant de

CSH pour être greffé et établir les principes de base gouvernant le transport et le stockage des unités de SCO. Cette étude a marqué le début de la transplantation de SCO (TSCO) tant au niveau expérimental que médical [63-66].

La première TSCO a été réalisée à l'Hôpital Saint-Louis de Paris en 1988 par le Dr Éliane Gluckman chez un enfant atteint d'anémie de Fanconi, une insuffisance médullaire héréditaire mortelle [67]. Il s'agissait d'une greffe allogénique apparentée dont le donneur, la petite sœur en santé, était parfaitement compatible avec le receveur. La première TSCO non-apparentée, rapportée par Kutzberg *et al.* a permis de valider le succès de cette procédure [68]. Depuis, la TSCO a pris une place de choix dans le domaine de la TCSH. On parle de plus de 600,000 unités de SCO stockées avec plus de 30,000 TSCO accomplies à travers le monde et plus de 160 banques publiques de SCO [69]. Le SCO peut être prélevé à partir de la veine ombilicale avant (*in utero*) ou après (*ex utero*) la délivrance du placenta [70].

Comme toute procédure, la TSCO est associée à des risques et des bénéfices potentiels à considérer lors de la sélection des donneurs. Étant donné sa disponibilité rapide, le SCO offre la possibilité de traiter une large panoplie de pathologies hématologiques malignes et non malignes chez les patients dont le besoin de recevoir une greffe est urgent, évitant ainsi la progression de la maladie et la détérioration du pronostic [71-73]. De par son accessibilité, le prélèvement du SCO n'occasionne quasiment aucun risque pour le donneur. En outre, la mise en place de banques à usage public consolide l'amélioration de l'équilibre ethnique. De plus, la TSCO entraîne un risque quasi-nul de transmission d'infections virales du donneur au receveur [70, 74]. Bien que la barrière foeto-placentaire soit efficace contre le passage du virus, une transmission virale *antepartum*

(par passage transplacentaire) peut survenir au cours d'une virémie maternelle [75]. Le dépistage de maladies infectieuses transmissibles constitue un préalable indispensable à la greffe de sang de cordon. Les tests viraux, réalisés sur le sérum de la mère, comprennent le dépistage de l'infection au CMV, VIH (« *virus de l'immunodéficience humaine* »), hépatite B et C et, permettent de réduire le risque et le rendre inférieur à celui couru lorsqu'un donneur de moelle est utilisé (moins de 0,3 % de positivité pour le CMV détecté par PCR) [76, 77]. Une plus grande flexibilité en matière de disparité HLA entre donneur et receveur peut être permise dans le contexte d'une TSCO. Ceci étant dit, la GvHD, obstacle d'envergure qui perdure jusqu'à aujourd'hui dans le contexte d'une TMO ou de TSP, constitue l'un des plus gros avantages liés à la TSCO. En effet, une incidence comparable de GvHD aiguë (environ 20%) est notée après TSCO et après une TMO pour laquelle le greffon a été déplété des lymphocytes T [78, 79]. L'incidence de la rechute de la leucémie après TSCO, quant à elle, est comparable à celle rapportée suite à une TMO ou TSP (discuté plus loin) [78, 80, 81]. Le succès de la TSCO demeure néanmoins limité par le taux de prise de greffe nettement réduit et par une reconstitution immunitaire différée associée à une plus grande mortalité liée à la transplantation (« *Transplant related mortality* »; *TRM*) comparativement aux autres sources [73, 82, 83]. Ceci est la conséquence directe du faible nombre de cellules nucléées contenues dans une unité de SCO, soit 1 log<sub>10</sub> à 2 log<sub>10</sub> de CSH de moins que dans le cas d'une TMO ou du TSP respectivement [84]. La TSCO était initialement réservée aux patients pédiatriques compte tenu du pronostic réservé des patients adultes après la TSCO, dont 40% mourraient avant même d'atteindre les 100 premiers jours étant donné l'association entre

le nombre de cellules CD34<sup>+</sup> contenues dans le greffon, la prise de la greffe et la survie sans évènements [85].

**Tableau 1 1 Avantages et inconvénients de la TSCO**

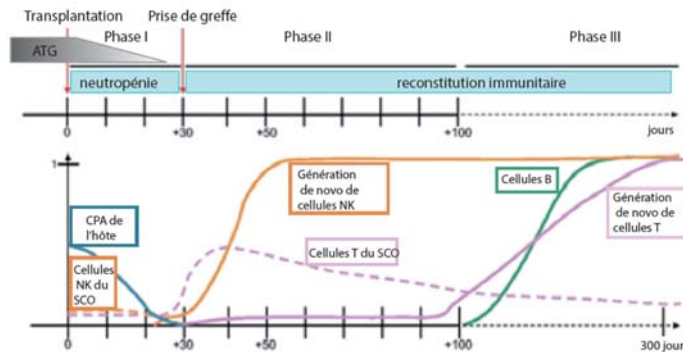
Avantages	Inconvénients
Absence de risque pour le donneur	Nombre limité de CSH
Plus grande disparité HLA entre donneur et receveur	Plus grande incidence d'échec de greffe
Amélioration de la balance ethnique	Retard au niveau de la prise de la greffe
Incidence et sévérité plus faibles de la GvHD	Indisponibilité du donneur pour la transfusion des cellules après greffe
Absence quasi totale de contamination virale du greffon	Reconstitution myéloïde plus lente
Disponibilité presque immédiate grâce à la présence de banque	Incidence élevée d'infections opportunistes pendant les 100 premiers jours suivant la TSCO

## 1.4.5 La reconstitution immunitaire après TSCO

### 1.4.5.1 Reconstitution des neutrophiles et des plaquettes

Le pronostic du patient est tributaire de la rapidité de la reconstitution immunitaire après la transplantation [86, 87]. La prise de la greffe, se traduisant par la reconstitution des neutrophiles et des plaquettes, marque le début du développement du système immunitaire inné. L'évaluation de la prise de la greffe se fait à la fois à travers une analyse de la sortie d'aplasie et une détermination du chimérisme donneur *versus* receveur. La prise est considérée complète lorsque le patient n'est plus neutropénique et que son chimérisme est supérieur à 95% [88]. La TSCO est associée à un risque

augmenté de non-prise et d'une prise de greffe plus lente. En effet, le temps médian de sortie des neutrophiles après TSCO est prolongé à 30 jours versus 21 jours après TMO et 14 jours après TSP [82, 89, 90]. Le retard au niveau de la reconstitution des neutrophiles est associé à une plus grande fréquence de mortalité liée à la transplantation (19 % après TMO versus 39 % après TSCO) [82]. La reconstitution des plaquettes est également plus lente, avec un temps médian qui s'échelonne sur une période allant de 50 à 100 jours post-TSCO, alors qu'il est d'environ 30 jours après TMO [71, 91, 92]. La prise de greffe différée peut être la conséquence : *i*) du plus faible nombre de cellules nucléées; *iii*) du degré de disparité HLA; *iii*) des propriétés intrinsèques des cellules souches du SCO, qui requièrent plus de temps pour se différencier en précurseurs myéloïdes; *iii*) de la perturbation, par les traitements de conditionnement, de l'environnement spécialisé au niveau de la MO nécessaire pour l'auto-renouvellement des CSH, leur prolifération ainsi que leur différenciation [93].



**Figure 1. 5 Cinétique de reconstitution et les complications liées à la transplantation après TSCO**

La période post-transplantation peut être divisée en 3 phases. La période précédant la prise de la greffe (Phase I, 0-30 jours) est caractérisée par un état d'immunosuppression général (déplétion in vivo des lymphocytes du receveur par l'ATG par exemple), la neutropénie, un faible compte de plaquettes et une forte sensibilité aux infections fongiques. Les cellules présentatrices de l'antigène (CPAs) résiduelles de l'hôte disparaissent progressivement durant la phase I. Une prolifération massive permet aux cellules NK d'atteindre des niveaux normaux à un mois post-transplantation. Elles

représentent 80% des lymphocytes durant la phase II (jours 31-100). Durant la phase II, on assiste à la prolifération homéostatique des certaines cellules T du SCO et à la génération de novo de lymphocytes T par thymopoïèse. La dernière phase (Phase III) est caractérisée une reconstitution progressive des cellules B et des sous-populations de cellules T, qui atteignent des niveaux normaux à 6-9 mois post-transplantation [94].

#### ***1.4.5.2 Reconstitution des cellules NK***

Les cellules NK ne sont pas soumises à la sélection thymique et se reconstituent de ce fait aussi bien quantitativement que qualitativement dès le premier mois post-greffe [94, 95]. On assistera d'abord à l'émergence d'une première vague de cellules NK issues de l'expansion homéostatique de la sous-population CD16<sup>-</sup> CD56<sup>bright</sup>, caractérisée par une faible activité cytotoxique et exprimant préférentiellement le récepteur NKG2A [96-98]. Comme les premières semaines suivant la TCSH marquent une profonde période de lymphopénie au niveau du compartiment T, les cytokines nécessaires (en particulier l'IL-15) à la prolifération et à l'activation des cellules NK sont plus accessibles, contribuant ainsi grandement à leur reconstitution [94]. Au-delà des 100 premiers jours, la sous-population de cellules NK CD16<sup>-</sup> CD56<sup>dim</sup>, caractérisés par une importante activité cytolytique et exprimant les récepteurs inhibiteurs KIR, émerge [98, 99]. Cet accroissement, aussi bien en termes de nombre absolu que de proportion, est plus important après TSCO que suivant la TMO [99]. Somme toute, les patrons de reconstitution des cellules NK demeurent sensiblement les mêmes quelle que soit la source de CSH [100, 101].

#### ***1.4.5.3 Reconstitution des lymphocytes B***

La deuxième sous-population lymphocytaire à se reconstituer relativement rapidement est celles des lymphocytes B. Leur reconstitution après TSCO adopte une cinétique plus rapide que celle observée suivant une TMO [102]. Les cellules B transitionnelles CD19<sup>+</sup> CD28<sup>high</sup> CD38<sup>high</sup> émergent à partir de 1 mois suivant la transplantation. Lorsqu'on s'éloigne de la fenêtre des 100 premiers jours, la proportion de cellules B, cette fois matures et exprimant CD19<sup>+</sup>CD28<sup>int</sup>CD38<sup>int</sup> augmente graduellement pour atteindre environ 90% à 9 mois post-transplantation [103].

#### ***1.4.5.4 Reconstitution des lymphocytes T***

Le compartiment T demeure lourdement affecté dans les premiers mois suivant la transplantation. Typiquement, la reconstitution des lymphocytes T emprunte deux voies: la reconstitution thymus-dépendante et thymus-indépendante. La première vague de lymphocytes T est issue de la prolifération induite par la lymphopénie (« *Lymphopenia induced proliferation* »; LIP), laquelle repose sur l'expansion des lymphocytes T du donneur auxquels se joignent les lymphocytes résiduels du receveur ayant résisté au traitement de conditionnement [104]. La LIP dépend d'interactions de faible affinité avec les complexes CMH-peptide du soi conjointement à une exposition à des niveaux de cytokines élevés [105]. La diversité du répertoire généré par ce mécanisme est limitée par la diversité du répertoire d'origine des cellules T matures, servant de source à l'expansion. La reconstitution thymus-indépendante après TSCO repose sur l'activation et la prolifération du répertoire limité des cellules naïves. Des réponses antivirales précoces, un mois suivant la TSCO, ont toutefois été détectées [106].



Les lymphocytes issus de la voie thymus-indépendante sont majoritairement CD8<sup>+</sup>, entraînant l'inversion du ratio CD4:CD8 [89]. Le compartiment T périphérique subit des changements graduels qui se traduisent, à long terme, par un répertoire restreint et une expansion oligoclonale, fruits de stimulations allogéniques ou médiées par des agents infectieux [107, 108].

La reconstitution thymus-dépendante se manifeste généralement à partir de 3 mois post-TCSH. Elle permet une reconstitution à long-terme du compartiment T avec un répertoire diversifié [109, 110]. Cette voie de régénération est un long processus requérant des fonctions adéquates de toutes les composantes impliquées dans la production de cellules T. En effet, le thymus fournit le microenvironnement essentiel pour supporter la prolifération, la différenciation et la sélection des lymphocytes T via des cytokines (interleukine-7, SCF, KGF et CCL25) et des protéines de surface (récepteurs de chimiokines, complexes pCMH) qui facilitent à la fois la migration et l'interaction cellule-cellule. Le thymus est un organe sensible à la GvHD qui pourrait induire la délétion des thymocytes, le changement au niveau du nombre et de la composition des cellules épithéliales thymiques, et la disparition de la démarcation cortico-médullaire. L'altération de l'architecture thymique normale résulte alors en une déficience de la thymopoïèse [111].

En dépit du temps requis pour leur différenciation dans la MO, les précurseurs lymphoïdes doivent interagir avec les différents compartiments thymiques pour atteindre un phénotype typique des cellules T matures [112, 113]. Le laps de temps passé dans le thymus est de 2-3 semaines chez la souris, mais reste encore inconnu chez l'homme cependant il est indéniable que la reconstitution thymique prend plusieurs semaines voire

même plusieurs mois et qu'elle n'atteint un plateau qu'après 1-2 ans post-transplantation [114]. Après une TCSH, la reprise de la thymopoïèse peut être mesurée à travers la production de cercles d'excision, les TRECs (« *T cell receptor excision circles* »), produits lors du réarrangement du TCR [115]. En effet, n'étant pas répliqués durant la division des lymphocytes T, les TRECs reflètent, en périphérie, le nombre de lymphocytes T générés *de novo* ainsi que la polyclonalité du répertoire TCR. Il est primordial de souligner l'importance de disposer d'un thymus intègre et fonctionnel, ce qui est loin d'être le cas tôt après transplantation où le tissu thymique est généralement lésé. Ainsi, la toxicité sous-jacente au régime de conditionnement, la prophylaxie pour la GvHD ainsi que l'âge du patient vont interférer avec les mécanismes moléculaires et cellulaires gouvernant la thymopoïèse. Escalon *et al.*, ont soulevé un retard au niveau de la reprise de la thymopoïèse après TSCO comparé aux autres sources de cellules souches hématopoïétiques [116], ce qui semble être directement associé au nombre limité de progéniteurs lymphoïdes contenus dans le greffon. Dans le contexte d'une TSCO, le plus degré de disparité plus important entre le donneur et le receveur pourrait affecter la sélection intrathymique. En effet, les cellules épithéliales du cortex et de la medulla proviennent du receveur alors que les cellules dendritiques thymiques proviennent du donneur. On pourrait supposer que le degré d'incompatibilité entre donneur et receveur pourrait perturber les mécanismes physiologiques du processus de la sélection positive dans le thymus, entraînant un retard de la reconstitution des lymphocytes T [117].

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> reconstituent généralement relativement rapidement un répertoire T diversifié [118]. La différence frappante réside au niveau de la reconstitution des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, qui se trouve être dramatiquement retardée, pouvant aller

jusqu'à 9-12 mois après TSCO *versus* 3-6 mois pour la TMO [102]. Toutefois, à 2 ans post-transplantation, une diversité plus grande du répertoire T est atteinte après TSCO comparativement à la TMO [119], ce qui laisse suggérer que les progéniteurs lymphoïdes du SCO ont un potentiel supérieur leur permettant d'atteindre une plus grande diversité des TCR [120, 121].

#### **1.4.6 Biologie des lymphocytes T du sang de cordon ombilical**

Alors que certains risques liés à la TCSH se trouvent être atténués suite à une TSCO, l'IRM demeure un problème d'envergure qui persiste d'ailleurs encore. Si la place des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est majeure à la fois dans la prévention et l'induction des complications survenant suivant la transplantation. Alors quelles sont les propriétés quantitatives et qualitatives qui distinguent les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> du SCO? Le SCO contient un nombre absolu de cellules T significativement plus important que le SP [94]. Toutefois, elles sont majoritairement des émigrants récents du thymus [31, 122]. En comparaison avec leurs homologues provenant de la MO ou du SP, les lymphocytes T du SCO répondent moins à une stimulation allogénique, présentent une expression réduite des facteurs de transcription tels que le NFAT associés à l'activation des cellules T et produisent moins de cytokines effectrices, de granzyme et de perforine [123, 124]. Le SCO contient une fréquence élevée de lymphocytes Treg, qui expriment FoxP3 qui constituent environ 15 % des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pendant la vie fœtale (versus 5% chez l'adulte) [29, 125]. Merindol et *al.* ont démontré que les lymphocytes T du SCO sont dotés d'un potentiel fonctionnel important. Toutefois, certaines différences qualitatives ont été soulevées comparativement à leurs homologues du SP notamment un potentiel

bifonctionnel (production d'IFN- $\gamma$  et capacité cytotoxique réduites) et une différenciation terminale atteinte plus rapidement [180]. D'autres études ont démontré que la différenciation des cellules T du fœtus est biaisée vers des réponses allergiques de type Th2 et que l'expression de Fas-ligand au niveau de l'interface fœto-maternelle entraîne l'élimination des cellules T activées [126]. Une élégante démonstration de la particularité des lymphocytes T du SC nous provient de l'étude de Mold *et al.* qui ont démontré que les cellules fœtales et adultes émergent de deux populations distinctes et successives de CSH, la première, initialement présente dans le foie fœtal, et la seconde, provenant de la MO. Ces deux vagues mènent à la production de deux populations lymphocytaires caractérisées par différents stades de développement. Dans un essai de réaction lymphocytaire mixte, les cellules naïves issues de la première vague ont démontré une plus grande capacité proliférative et avaient tendance à se différencier en cellules CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg. Les auteurs stipulent que la population lymphocytaire fœtale, ayant des propriétés fonctionnelles de type tolérogène, est encore présente à la naissance, conjointement avec les lymphocytes dont les propriétés sont semblables aux cellules du SP adulte [31]. Il est à noter que les cellules T du SCO ne sont pas fonctionnellement inertes et sont capables de monter une réponse immunitaire de type pro-inflammatoire bien que de moindre envergure. En effet, la détection de cellules de type T<sub>H</sub>1 dans le cas d'une infection congénitale par le CMV ainsi que le développement d'une GvHD aiguë chez certains patients la laisse entrevoir [127, 128].

## **1.4.7 Rôle des lymphocytes T dans les complications liées à la TSCO**

### ***1.4.7.1 L'échec et rejet de greffe***

L'échec et le rejet de greffe constituent des complications post-TSCO et la mortalité et la morbidité qui y sont associées demeurent élevées [129, 130]. L'échec de la prise de greffe est la conséquence directe du faible nombre de CSH contenues dans le greffon et des propriétés intrinsèques des cellules T du SCO [78, 131-133]. La TSCO est associée à une incidence d'échec de greffe la plus élevée, par comparaison aux autres sources de CSH (20% après TSCO versus 16% après TMO et 3% après TSP) [134, 135].

Le rejet de greffe, quant à lui, est caractérisé par une perte des cellules du donneur subséquente à la prise de la greffe, dû à leur élimination par les cellules du receveur. Le rejet de greffe est un processus impliquant aussi bien l'immunité à médiation cellulaire qu'humorale [136, 137]. Tout comme les lymphocytes T, les cellules NK du receveur semblent interférer activement avec la prise de greffe [138-140]. Rajouté au degré de disparité entre donneur et receveur, il est établi que les anticorps anti-HLA du donneur constituent une barrière critique à la réussite de la TSCO. Des données probantes issues de plusieurs études démontrent l'association entre la présence d'anticorps anti-HLA chez le receveur, le retard de la reconstitution des neutrophiles et des plaquettes, reflet d'une faible dose cellulaire, et l'incidence élevée du rejet de greffe [141, 142]. Les cellules T et NK du donneur semblent contribuer à la prise de la greffe. En effet, dans un contexte d'incompatibilité au niveau des récepteurs KIR entre le donneur et le receveur, les cellules NK permettent d'éliminer les CPA et les cellules T du receveur ayant résisté

au régime de conditionnement. Plusieurs études ont démontré l'implication des voies granzyme/perforine et Fas/Fas-L dans le rejet de la greffe [143-145].

#### ***1.4.7.2 La réaction du greffon contre l'hôte: GvHD***

La GvHD, tel que définie par Billingham dans les années 1960, est une réaction immunitaire inflammatoire qui ne peut se développer que si trois conditions *sine qua non* sont réunies : *i*) la présence de cellules immunocompétentes dans le greffon, *ii*) la disparité HLA entre donneur et receveur, et *iii*) l'incapacité du receveur à produire une réponse immunitaire efficace [146]. Il existe deux types de manifestations cliniques de la GvHD : la GvHD aiguë et la GvHD chronique. Traditionnellement, les 100 premiers jours post-greffe ont servi de repère temporel arbitraire pour la distinction entre ces deux formes en se basant sur la classification proposée entre autre par le groupe de Seattle [147]. Toutefois, ce paradigme, pour le moins dogmatique, ne tient pas compte de la réalité clinique et du changement quasi continu des pratiques de transplantation. Cette catégorisation a été ultérieurement qualifiée d'inadaptée et d'obsolète puisqu'environ 20 % des patients qui présentent une GvHD chronique en utilisant ces critères font, en fait, une GvHD aiguë [148]. Pour pallier ces faiblesses, la classification se fait depuis 2005 après que le NIH (« *National Institutes of Health* ») ait établi un consensus en se basant sur la présence ou l'absence de signes cliniques et biologiques évocateurs de GvHD aiguë ou de GvHD chronique [149]. Cliniquement parlant, alors que la GVHD aiguë, réaction inflammatoire par excellence, affecte la peau, le tractus gastro-intestinal et le foie, la GvHD chronique affecte quant à elle quasiment tous les organes donnant des symptômes caractéristiques de maladies auto-immunes et de fibrose [150, 151]. La sévérité de chaque

type de GvHD est divisée en grades, qui à leur tour sont définis sur la base du nombre d'organes affectés et la sévérité de la manifestation. On parle de GvHD aiguë de grade I à IV et de GvHD chronique extensive ou limitée [151].

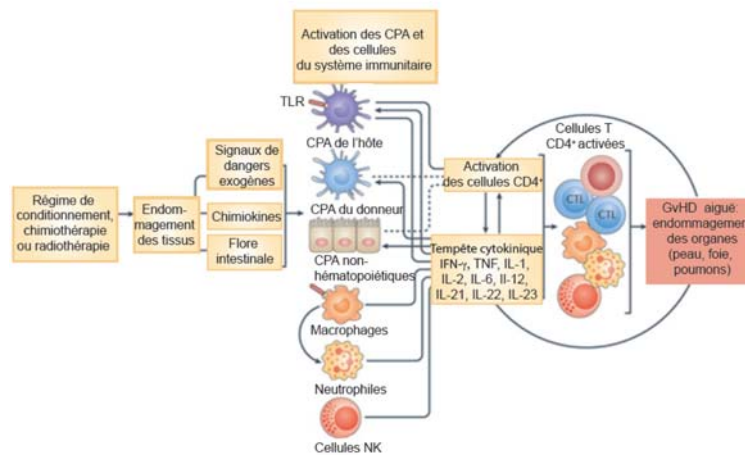
Rarement nuisibles, les marqueurs de l'identité individuelle, les antigènes majeurs d'histocompatibilité, jouent un rôle majeur dans le déclenchement de la GvHD, qui demeure encore aujourd'hui un obstacle majeur causant la mort d'environ 20% des receveurs de TCSH [152]. À la diversité au niveau des antigènes majeurs d'histocompatibilité, il faut aussi ajouter la diversité au niveau des antigènes mineurs d'histocompatibilité (« *Minor histocompatibility H antigens* »; AgmH) [153] restreints majoritairement, mais pas exclusivement, par les molécules du CMH de classe I [154] et capables d'induire une réponse immune de le cas de receveurs de greffe HLA-identique. Les AgmH correspondent à des fragments peptidiques immunogènes issus de la dégradation de protéines cellulaires polymorphes (codées par l'ADN mitochondrial, le chromosome Y ou des chromosomes autosomaux) présentant des polymorphismes génétiques induisant une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T [155]. Le risque de développer une GvHD est plus élevé lorsque le donneur et le receveur sont de sexes différents [156].

Outre les différences HLA-dépendantes, d'autres facteurs influencent l'amplitude et la sévérité de la GvHD. En effet, certains polymorphismes au niveau de gènes codants pour des cytokines proinflammatoires (IL-1, IL-6) et anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- $\beta$ ), ou des polymorphismes influençant la pharmacocinétique des molécules immunosuppressives, peuvent expliquer en partie l'hétérogénéité interindividuelle de l'incidence et la sévérité de la GvHD [154, 157]. La pathogenèse de la GvHD sous ses

deux formes dépend également de la nature du régime de conditionnement, de la source des CSH, des infections virales post-transplantation, du nombre de cellules T dans le greffon, ainsi que la prophylaxie pour la GvHD [158-160]. En effet, Mothy *et al.* ont noté une forte association entre les niveaux d'IL-12 circulante et le risque de développer une GvHD chez des patients ayant reçu un régime non-myéloablatif, ce qui ne semble pas être le cas pour les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif [161]. Tel que mentionné plus haut, bien que la transplantation et le régime de conditionnement soient indissociables, il est indéniable que l'impact négatif de ce dernier et les complications subséquentes qui en découlent perdurent bien au-delà de l'étape préparatoire. En effet, le conditionnement représente l'élément déclencheur de la GvHD aiguë, mettant en branle une cascade d'interactions cellulaires entre le donneur et le receveur (Figure 1.6) qui se résume en trois phases séquentielles: *i*) l'établissement d'un environnement pro-inflammatoire; *ii*) l'activation et la prolifération des lymphocytes T du donneur, et *iii*) la phase effectrice impliquant les cellules effectrices (cellules T et NK) qui vont attaquer les organes cibles [162]. Le recours à la radiothérapie et à la chimiothérapie, même à une intensité modérée, compromet l'intégrité de la muqueuse intestinale, induisant la translocation subséquente de stimuli pro-inflammatoires comme les endotoxines bactériennes et les signaux de dangers exogènes (« *Pathogen associated molecular patterns* »; PAMPs) ou endogènes (« *Damage-associated molecular patterns* »; DAMPs) vers la circulation. Ces molécules vont à leur tour activer les récepteurs de l'immunité innée [106] et entraîner une hyperproduction de cytokines incluant l'IL-1, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IFN- $\gamma$  [163, 164], plus connue sous le nom de « tempête cytokinique ». Ladite inflammation joue un rôle pivot dans la pathogenèse de la GvHD aiguë, son



établissement et sa sévérité. En effet, les lésions contribuent à l'activation des CPA, provenant du donneur ou du receveur, lesquelles vont présenter les antigènes de l'hôte aux lymphocytes T allogéniques naïfs présents dans le greffon. Une fois activés, on assiste à leur polarisation vers un phénotype effecteur terminalement différencié, déterminant pour l'établissement de la pathogenèse [165].



**Figure 1. 6 Le déroulement de la GvHD aiguë**

L'initiation et le maintien de la GvHD se fait globalement en 4 phases. Même si le conditionnement ne constitue pas une étape nécessaire absolument pour l'induction de la GvHD, dans plusieurs modèles il est à l'origine de l'activation des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) via la destruction des tissus et accroît par ailleurs la fonction des CPAs. À travers le relâchement d'endotoxines bactériennes, des signaux de danger exogènes, de chimiokines et l'activation des cellules du système immunitaire inné, le régime de conditionnement contribue à l'établissement de « tempête cytokinique ». Les CPAs du receveur ont probablement le rôle le plus important dans l'initiation de la GvHD. Toutefois, le rôle potentiel des CPAs du donneur ne semble pas être négligeable. Suite à la présentation des antigènes aux cellules T, une puissante réponse cytokinique est initiée. Ces cytokines vont par la suite promouvoir la présentation antigénique ainsi que le recrutement de cellules T effectrices et cellules de l'immunité innée, qui vont rendre le milieu davantage pro-inflammatoire. Finalement, les cellules effectrices T et les cellules NK, les macrophages, les cytokines pro-inflammatoires (incluant le « tumor necrosis factor» (TNF)) entraînent des dommages au niveau des organes, notamment la peau, les poumons, le foie et l'estomac, permettant de reconnaître cliniquement la GvHD aiguë. Lorsqu'ils ne sont pas traités ces dommages amplifient le processus et rendent la GvHD plus sévère, qui devient alors extrêmement difficile à contrôler. CTL, cytotoxique T

lymphocyte; IFN $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; TLR, Toll-like receptor. *Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature immunology [162], copyright (2012).*

Encore là, il est important de soulever la faible incidence de la GvHD après TSCO comparé à la TMO et à la TSP [166-168]. Une étude menée par Rocha *et al.* a démontré une réduction de l'incidence de la GvHD, aussi bien aiguë (environ 20 %) que chronique (incidence à 2 ans d'environ 25% *versus* 45 % pour la TMO) [82], lorsque les cellules du SCO sont utilisées à la place des cellules de la MO dans le contexte d'une greffe pédiatrique [169]. Cette différence est, selon toute apparence, la conséquence directe de la différence au niveau de la composition du greffon et des propriétés intrinsèques des principaux acteurs de la GvHD aiguë. Des données éloquentes d'études initialement réalisées chez la souris et confirmées par la suite chez l'homme [170, 171] dévoilent que la déplétion des lymphocytes T naïfs du greffon préviendrait la GvHD aiguë. Eapon *et al.* proposent néanmoins l'utilisation, avec une grande réserve, des unités de SCO présentant plus de 3 disparité HLA avec le receveur [37]. Les lymphocytes T du SCO présentent également un faible niveau d'expression de facteurs de transcription associés à l'activation des cellules T (« *Nuclear factor of activated T-cells* »; NFAT, « *Signal Transducer and Activator of Transcription* »; STAT4; T-bet) et produisent moins de cytokines effectrices [124, 172, 173]. Le SCO contient plus de lymphocytes T régulateurs caractérisés par un plus grand potentiel d'expansion et une capacité suppressive plus importante que leur homologues provenant du SP adulte [174, 175]. Bien qu'il n'y ait pas de consensus concernant l'implication des cellules dendritiques (DC) dans l'initiation de la GvHD, il semblerait qu'elles puissent réguler l'expansion subséquente des lymphocytes T [176,

177]. Ceci dit, l'immaturation des DC du SCO, associées à une capacité de présentation antigénique moindre et une réduction de l'expression de molécules de co-stimulation [177], contribuerait jusqu'à une certaine mesure à la faible incidence de la GvHD après TSCO. La GvHD aiguë interfère avec les fonctions thymiques et compromet par ailleurs la reprise de la thymopoïèse. Toutefois, dans le cas d'une TSCO, la faible incidence de la GvHD ne permet pas pour autant une amélioration de la reconstitution immunitaire, soulignant encore une fois la particularité du SCO. A la différence de la GvHD aiguë, la physiopathologie de la GvHD chronique demeure, à bien des égards, mal caractérisée, notamment en raison de faible disponibilité des modèles expérimentaux permettant de mimer la maladie humaine.

#### ***1.4.7.3 La rechute de leucémie et l'effet du greffon contre la leucémie : effet GvL***

La rechute de leucémie demeure jusqu'à aujourd'hui une complication majeure après TCSH. Environ, 20% des patients leucémiques receveurs de TCSH rechutent, souvent après 6 mois, et 90% d'entre eux finissent par en mourir. Barnes *et al.* ont été les premiers à mettre en évidence, dans un modèle murin, l'existence d'une réponse immunitaire dirigée contre les cellules leucémiques résiduelles dont l'effet contribuerait à l'éradication de la maladie [178]. La mise en évidence de l'effet GvL chez l'homme est basée sur des observations indirectes. En effet, en 1979, une étude clinique publiée par Weinde *et al.* associait un risque de rechute plus faible en présence de la GvHD [55]. Le rôle des lymphocytes T dans l'élimination des cellules leucémiques est devenu plus clair depuis que leur déplétion *in vitro* du greffon a été introduite dans la pratique clinique comme prophylaxie pour la GvHD [179]. 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. Trois classes d'antigènes peuvent être reconnus par les lymphocytes T: *i*) les antigènes mineurs d'histocompatibilité (A<sub>g</sub>mH), *ii*) les A<sub>g</sub>mH uniquement exprimés par les cellules hématopoïétiques, et *iii*) les antigènes spécifiques aux cellules leucémiques [180].

Une preuve élégante du rôle joué par les cellules NK a été fournie par Ruggeri *et al.* démontrant que les cellules NK alloréactives permettent de prévenir la rechute de la leucémie [181]. Tel que décrit précédemment, les cellules NK sont les premières à émerger tôt après la greffe et représentent 80 % des lymphocytes présents en périphérie pendant les 100 premiers jours. L'activité cytotoxique étant optimisée dans le contexte de disparité KIR-KIR ligand entre le donneur et le receveur, elles vont cibler spécifiquement les CPA du receveur et les cellules leucémiques n'exprimant pas le CMH-I et ne pouvant donc pas être éliminées par les cellules T. Ainsi suivant une greffe allogénique, la distinction entre les contributions relatives des deux types cellulaires dans l'effet GvL peut se faire sur une base temporelle: les cellules NK dominent pendant les 100 premiers jours alors que les cellules T dominent lorsqu'on s'éloigne de cette fenêtre. En lien avec leur caractère naïf et leur reconstitution différée, on pourrait spéculer que la contribution des lymphocytes T tôt suivant la TSCO à l'effet GvL serait mineure et qu'un risque de la rechute de leucémie plus élevé pouvait être attendu. Toutefois ce risque est sensiblement le même après TSCO et TMO [82, 182] grâce, entre autre, aux propriétés anti-leucémiques des cellules T du SCO [183]. L'appariement des antigènes NIMA (« *Non-inherited maternal antigens* ») a été associé avec une réduction de l'incidence de rechute de leucémie, suggérant que les lymphocytes T sont capables de reconnaître et tuer

spécifiquement les cellules leucémiques [184]. Très récemment, une étude par Hiwarkar *et al.* a démontré chez la souris un potentiel anti-leucémique supérieur des lymphocytes T du SCO comparativement à leurs homologues du SP, toutefois les mécanismes associés à leur infiltration dans l'environnement tumoral, leur activation, et leur différenciation demeurent inconnus [185].

#### ***1.4.7.4 Les infections virales à CMV et à VZV après TSCO***

Suit à la TSCO, la faible incidence d'infections virales est associée à la reconstitution d'un répertoire T diversifié par la voie dépendante du thymus. Alors que la MO contient des lymphocytes T mémoires spécifiques à l'antigène, les lymphocytes T du SCO sont caractérisés par un phénotype naïf. De ce fait, la mortalité liée aux infections opportunistes (« *Infection-related mortality* »; IRM) suite à la TSCO se trouve être particulièrement augmentée pendant les 100 premiers jours comparativement à la TMO (45 % versus 21% respectivement) [186, 187]. Toutefois, en s'éloignant de la fenêtre des 100 jours, l'IRM est pratiquement équivalente pour les différentes sources de CSH [186]. Après la prise de la greffe, les infections virales causées entre autres par le cytomegalovirus (CMV) et le virus de la varicelle (VZV) sont principalement dues à une déficience au niveau de l'immunité à médiation cellulaire. Nous nous intéresserons uniquement à ces deux virus qui sont associés à une incidence élevée de mortalité et de morbidité suite à la TSCO.

##### **1.4.7.4.1 Les infections à CMV**

Le CMV est un  $\beta$ -herpèrevirus lymphotropique qui établit la latence suite à la primo-infection, laquelle est largement asymptomatique chez l'hôte immunocompétent.

Toutefois, chez l'hôte immunocompromis, il est associé à des complications graves incluant des pneumonies, des gastroentérites et, moins fréquemment, des encéphalites, hépatites et rhinites [188]. Environ 50-100% des patients CMV-séropositifs avant la TCSH vont réactiver le virus et/ou développer des maladies à CMV, lesquelles sont associées à un pronostic défavorable pendant les 6 premiers mois [189-191]. Cette proportion pourrait être plus grande que suivant une TMO (64% d'incidence cumulative d'infection à CMV pour la TSCO *versus* 51% pour les TMO) [192, 193]. Le ganciclovir, de fortes doses d'acyclovir et le valacyclovir, utilisés comme prophylaxie antivirale, ont démontré une grande efficacité en termes de suppression de la réactivation du CMV dans plusieurs études randomisées [194, 195]. Cette stratégie permet d'une part la prévention de l'infection à CMV et fait surgir d'autre part de nouvelles interrogations en rapport avec la toxicité néphrologique et myéloïde importante de ces agents [196, 197] et le risque de développer des résistances aux médicaments [198]. De surcroît, le problème des infections tardives à CMV consécutives à des administrations prolongées d'antiviraux efficaces ou à des situations d'immunodépression particulièrement profondes reste entier. En effet, la réactivation du CMV n'est pas réservée uniquement à la période précoce suivant la transplantation, et on peut assister à des épisodes de réactivations tardives associés à une incidence élevée de mortalité, particulièrement chez les patients séropositifs [199, 200]. Il est clair qu'à bien des égards, le traitement prophylactique devrait être remplacé par un traitement préemptif mieux ciblé et d'une durée plus courte. Il s'agit de suivre, pendant la période d'immunosuppression, un critère biologique définissant l'infection, qui, lorsqu'il se positive, est prédictif de l'apparition ultérieure d'une maladie à CMV. Un test de PCR quantitative en temps réel ciblant l'ARN de la

protéine pp65 est utilisé à cette fin. Si le patient présente plus de 3000 copies/ml de sérum, il reçoit un traitement généralement à base de ganciclovir jusqu'à la résolution de l'infection (deux PCR consécutives négatives). Bien qu'il ait contribué à diminuer l'incidence de la maladie à CMV de 5-20% pendant les 100 premiers jours post-TSCO, ce protocole n'est pas dépourvu de conséquences lourdes pouvant conduire à un sur-traitement des patients [191, 201]. En effet, il implique la notion d'un traitement précoce de l'infection déclarée, ne distinguant pas de ce fait les patients qui réactivent le virus et sont capables de maîtriser l'infection de ceux qui développent inéluctablement la maladie [202, 203]. Chez les sujet sains, le contrôle de l'infection par le CMV est opéré par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> majoritairement spécifiques aux épitopes de la protéine de la matrice pp65 et moindrement à la protéine IE-1 (« *Immediate early* »; IE-1) [204-206]. Des études plus récentes ont démontré que la reconstitution rapide de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques au CMV était directement associée à une réduction des complications subséquentes à l'infection virale [207, 208]. Lors d'une étude longitudinale faite chez un groupe d'enfants ayant reçu une TSCO pour le traitement de pathologies malignes, des réponses anti-CMV protectrices, entre autre, ont été détectées environ 40 jours suivant la transplantation [106]. Paradoxalement, McGoldrick *et al.*, ont rapporté que bien que présentes tôt après la TSCO, les réponses T spécifiques au CMV étaient insuffisantes pour contrôler la réactivation virale. Les auteurs stipulent que les immunosuppresseurs et/ou la déficience au niveau des cellules T CD4<sup>+</sup> peu après la transplantation pourraient en être la cause [209].

#### 1.4.7.4.2 Les infections à VZV

Le VZV, ou HHV-3, est un membre de la sous famille des alpha-herpesvirus qui infecte préférentiellement les cellules épithéliales et neuronales où il établit sa latence. Il est l'agent étiologique de deux maladies cliniquement distinctes: la varicelle (suite à l'infection primaire) et le zona (après réactivation). Les infections à VZV sont parmi les infections virales tardives les plus fréquentes après TCSH, avec une incidence variant de 13-55% pendant la première année [210]. Après une TSCO, la réactivation du VZV est plus fréquente et est associée à des complications plus sévères comparativement à la TMO [211, 212]. Pour ces raisons, la prévention des infections à VZV fait appel à une prophylaxie antivirale à base d'acyclovir et de valacyclovir d'une durée de 12 mois [213]. Au Centre hospitalier universitaire Sainte-Justine, le famciclovir est administré systématiquement, depuis 2007, à tous les patients quel que soit leur statut sérologique avant la transplantation (*Michel Duval, communication personnelle*). On pense que cette stratégie, qui n'est pas personnalisée, et entraîne indéniablement un sur-traitement des patients, pourrait compromettre la reconstitution immunitaire anti-VZV, repoussant ainsi dans le temps l'apparition de la maladie [214, 215]. La durée optimale, la dose minimale requise et les facteurs de risque associés à l'arrêt de la prophylaxie demeurent encore mal connus. Une étude récente par Kawamura *et al.* montre que l'utilisation prolongée de très faibles doses d'acyclovir après TCSH permet de réduire le pourcentage des patients, de 40% à environ 7%, développant ainsi la maladie une fois le traitement interrompu. Distler *et al.* ont quant à eux rapporté que la réactivation du VZV, était un pré-requis pour la reconstitution d'une immunité antivirale spécifique [216]. Chez un hôte immunocompétent, on pense que le contrôle de la dissémination et de la réactivation du



VZV se fait principalement par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et moindrement par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> [217-219].

#### **1.4.8 Stratégies d'amélioration de la TSCO**

Il est indéniable que l'amélioration du pronostic des patients passe par l'augmentation de la dose cellulaire et l'accélération de la prise de la greffe, qui demeurent un obstacle de taille dans le contexte de la TSCO. Afin de s'affranchir du faible nombre de cellules contenues dans le SCO, plusieurs approches sont présentement à l'essai visant soit l'augmentation de la dose cellulaire soit l'amélioration du 'homing' des CSH.

##### **1.4.8.1 La double TSCO (dTSCO)**

Dans le but d'accroître la dose cellulaire infusée, diminuer le temps d'aplasie et la mortalité précoce reliée à la greffe, l'utilisation de deux unités de SCO, dite « double TSCO » provenant de deux donneurs différents a été rapportée pour la première fois en 2005 [220]. Les résultats prometteurs ont permis d'aller chercher un plus grand nombre de patients, spécialement des adultes, habituellement non éligibles pour la TSCO compte tenu du faible nombre de cellules nucléées contenues dans le greffon. Les mécanismes gouvernant la prise de la greffe dans ce contexte ne sont pas totalement élucidés. L'étude réalisée par Barker *et al.* sur 23 double TSCO suivant un régime myéloablatif a apporté des évidences directes démontrant la persistance d'une seule unité à 100 jours post-transplantation[220]. En effet, les cellules hématopoïétiques provenant d'un seul donneur ont été détectées chez 76% de patients au jour 21 et chez 100 % des patients au jour 100 post-transplantation [221]. Dans le cas où le régime de conditionnement est non-

myéloablatif, le chimérisme correspondant à un seul donneur a été détecté chez 57 %, 81 % et 100 % des patients aux jours 21, 100 et 365 respectivement [222]. Chez ces patients, le temps médian de sortie des neutrophiles est plus court (3-33 jours dépendamment du régime de conditionnement). Ceci dit, la différence n'est pas statistiquement significative selon qu'une unité ou deux aient été transplantées. Une tendance pour la majoration de la GvHD, particulièrement de grade II, (20% versus 30-40% pour une ou deux unités de SCO respectivement) [79, 223] qui se traduit par un meilleur effet GvL [223, 224] est observée après double TSCO, même si la reconstitution *in fine* ne se fait qu'à partir d'une seule unité infusée. Certaines études plaident en faveur de la persistance de l'unité qui contient plus de cellules CD3<sup>+</sup> [225] alors que d'autres suggèrent que la première unité infusée est celle qui va persister [222]. Toutes ces hypothèses susmentionnées méritent d'être investiguées davantage. Une approche qui consiste à manipuler génétiquement une des deux unités dans l'optique de suivre leur contribution respective dans l'établissement du chimérisme peut être envisagée [226]. Alors, pouvons-nous affirmer que la double TSCO constitue une meilleure alternative que la TSCO pour les adultes? Une étude publiée par Ruggeri *et al.* laisse le débat ouvert sur cette question étant donné que l'infusion d'une unité de SCO avec un nombre adéquat de cellules nucléées combinée à un régime de conditionnement approprié donne les mêmes résultats chez l'adulte qu'une double TSCO [227]. Ceci dit, les études réalisées jusqu'à date, dans la majorité des cas rétrospectives, présentent des failles au niveau de l'hétérogénéité des paramètres liés à la transplantation [225, 227]. Une conclusion plus fondée peut être donnée presque sans équivoque pour la double TSCO chez les enfants et les adolescents. En effet, une étude

randomisée multicentrique menée par Wagner *et al.* [79] a démontré que la double TSCO n'améliore pas la survie des patients pédiatriques.

#### ***1.4.8.2 Expansion des CSH***

Une autre approche de plus en plus utilisée consiste à étendre *ex vivo* les CSH. Pour ce faire, elles sont incubées en présence de cytokines et de facteurs de croissance, incluant le SCF (« *Stem cell factor* »), la thrompoïétine, le G-CSF (« *Granulocyte colony-stimulating factor* »), l'IL-1 et l'IL-6. Le premier essai clinique évaluant la faisabilité de cette approche, réalisée sur 37 patients, a démontré une incidence plus élevée de GvHD, reflétant probablement un changement des propriétés biologiques des cellules souches préalablement exposées aux cytokines [228]. Ceci témoigne d'un déclin de la capacité d'auto-renouvellement se traduisant par une différenciation, potentiellement irréversible, des cellules souches en cellules effectrices impliquées dans la GvHD.

Une autre approche implique l'expansion des CSH en utilisant la voie Notch/DLL1 (« *Delta Like Ligand-1* »). Delaney *et al.* ont démontré que l'unité manipulée, infusée avec une autre unité qui ne l'est pas, n'est plus détectée au-delà de 14-21 jours post-transplantation [229]. L'importance du microenvironnement médullaire dans le maintien du programme d'autorenouvellement est incontestable, et d'autres approches plus attrayantes permettent de mimer la niche médullaire en utilisant les cellules mésenchymateuses. Étant dotées d'une capacité de sécrétion de cytokines et de ligands, incluant DLL-1, SCF, G-CSF et l'IL-6, elles permettent de supporter la croissance ainsi que l'expansion des CSH [230-232]. de Lima *et al.* ont récemment rapporté les résultats

d'un essai clinique réalisé sur 31 patients ayant reçu une double TSCO, dont une des deux unités avait subi une expansion *ex vivo* en présence de cellules mésenchymateuses. À 30 jours post-transplantation, 46% des patients présentaient un chimérisme mixte alors que la majorité, si ce n'est la totalité, des patients démontrent un chimérisme complet de l'unité non manipulée à 12 mois [233]. À nouveau, ces deux approches impliquent une contribution des cellules manipulées pour repeupler les niches médullaires semble se faire à court terme. Il est clair que, pour efficace qu'elle soit, l'expansion *ex vivo* des cellules affecte les mécanismes de régulation intrinsèques responsables du comportement prolifératif, entraînant une diminution du potentiel d'autorenouvellement des CSH en faveur de la différenciation.

#### ***1.4.8.3 Amélioration du homing des CSH***

Plusieurs études cliniques ont investigué l'efficacité de l'infusion des cellules du SCO directement dans la moelle dans le but d'améliorer la prise de la greffe [234, 235]. Somme toute, cette procédure a été associée à un temps médian de sortie des neutrophiles et des plaquettes plus court comparativement à une infusion intraveineuse d'une ou de deux unités de SCO. De plus, une plus faible incidence de GvHD aiguë et une absence de complications liées à l'injection ont été notées. D'autres essais cliniques sont en cours pour évaluer les cinétiques de la prise de la greffe et de la reconstitution immunitaire suite à une injection intraosseuse de SCO [95]. Une autre stratégie consiste à manipuler indirectement l'axe SDF-1/CXCR4, médiateur important du homing des CSH vers la MO qui joue un rôle clé dans la rétention et le maintien des CSH au sein de la niche médullaire [236, 237]. Cette approche consiste à inhiber le principal régulateur négatif de

la migration médiée par le SDF-1, la DPP4 (« *Dipeptidyl peptidase 4* ») [238]. Cette dernière entraîne le clivage de la partie N-terminale du SDF-1, réduisant ainsi sa capacité à recruter les cellules exprimant CXCR4. Les études cliniques démontrent une suppression d'environ 70-80% de l'activité de DPP4 [239, 240]. Toutefois, il reste encore à déterminer le temps optimum pour l'administration de l'inhibiteur ainsi que la dose optimale qui mène à une suppression optimale.

#### ***1.4.8.4 Production in vitro de lymphocytes T spécifiques aux antigènes viraux et tumoraux***

Étant donné la profonde lymphopénie caractérisant les 100 premiers jours post-TSCO, un intérêt particulier est porté au transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques au CMV, au virus d'Epstein-Barr (EBV), et à l'adénovirus (ADV). De façon remarquable, Hanley *et al.* ont démontré la possibilité de produire *in vitro* des cellules T cytotoxiques spécifiques à ces trois virus, lesquelles sont capable de lyser les cellules cibles et de produire des cytokines effectrices en réponse à une stimulation antigénique [241]. Cette méthode ne requiert que 20% de l'unité de SCO et permet de générer  $150 \times 10^8$  cellules spécifiques à l'antigène. L'élimination des cellules tumorales en utilisant des cellules T exprimant les récepteurs chimériques exogènes (« *Chimeric antigen receptors* »; CAR) constitue une thérapie en pleine essor, aussi bien pour les pathologies hématologiques malignes que pour les tumeurs solides. Cette approche est de plus en plus utilisée pour expandre *ex vivo* des cellules T dérivées du SCO et ayant été modifiées génétiquement pour exprimer les récepteurs CD19 ou CD20 CAR [242]. L'avantage majeur lié à l'utilisation de ces cellules est leur capacité de reconnaissance qui est CMH-indépendante et leur grande efficacité à

éliminer les tumeurs CD19<sup>+</sup> tel que démontré par plusieurs essais cliniques [243, 244]. Une élégante stratégie permettant de combiner deux stratégies consiste à générer des cellules T dotées d'une double spécificité; combinant des propriétés anti-tumorales et antivirales [245]. L'activation des cellules T cytotoxiques par les antigènes viraux accroît leur effet anti-leucémique médié par les CARs. Si l'approche semble prometteuse, son efficacité, en termes d'effets indésirables et de protection à long terme, doit être démontrée dans des protocoles de grade clinique.

## **1.5 Épuisement clonal des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

### **1.5.1 Épuisement clonal des lymphocytes T dans le contexte d'une TCSH**

Le processus de différenciation mis en place dans le contexte d'une infection aiguë suit toute une autre dynamique dans le contexte d'une activation chronique du système immunitaire. En effet, impliquant une exposition prolongée à l'antigène et une inflammation chronique, la coordination des mécanismes immuno-stimulateurs et immuno-suppresseurs est nettement dérégulée, menant à une population lymphocytaire biaisée vers un phénotype épuisé [246]. Communément décrit comme étant « un état de différenciation unique » [246], l'épuisement clonal des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est caractérisé par une perte hiérarchique et progressive des propriétés effectrices pouvant mener jusqu'à la délétion clonale. L'hypothèse qui prévaut stipule que l'intensité de la signalisation par le TCR conditionne leur devenir (épuisement *versus* apoptose).

Bien que l'épuisement clonal des lymphocytes T n'ait pas été étudié de façon extensive dans le contexte de la TCSH, plusieurs évidences laissent entrevoir son établissement pendant les premiers mois post-transplantation. Quelques études ont démontré une

association entre l'expression de PD-1 par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et la rechute de la leucémie suivant une TCSH [247-249]. Alors, quels sont les facteurs qui rendent les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, maîtres d'œuvre de la réponse à médiation cellulaire, dysfonctionnels dans ce contexte? Ce n'est pas une question facile à répondre étant donné la nature complexe et subtile des interactions entre les différents acteurs, à la fois extrinsèques et intrinsèques, qui déterminent le dysfonctionnement des lymphocytes T. Dans certaines pathologies chroniques, notamment dans le contexte d'une infection par le VIH, l'activation à la fois forte et durable du système immunitaire est reconnue comme un facteur pathogénique majeur de la prédiction de la progression de la maladie, tout aussi important que la charge virale [250-252]. L'environnement pro-inflammatoire régnant tôt suivant la transplantation, caractérisé par la production d'IL-1, de TFN- $\alpha$ , d'IL-6 et d'IFN- $\gamma$  [163, 164], dure dans le temps et pourrait avoir des conséquences délétères sur la fonctionnalité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Les causes possibles du déclenchement et d'entretien de l'activation immunitaire et de l'inflammation sont multiples. Un rôle important est à attribuer aux infections bactériennes et aux lésions causées au niveau de la muqueuse intestinale à l'origine de la translocation de ligands de TLR, responsables de l'activation des monocytes, eux-mêmes jouant un rôle central dans la genèse de l'inflammation chronique. Le récepteur PD-1 (« *Programmed death-1*») joue un rôle clé dans l'épuisement clonal, dont l'expression a été validée par de nombreuses études comme étant un reflet de la perte de fonction des lymphocytes T [253-256]. PD-1 est exprimé de façon inductible par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, les cellules NK, les cellules NKT, les cellules B, les macrophages et quelques cellules dendritiques durant une activation immunitaire ou une inflammation chronique [257].

Que ce soit en raison du passé clinique du patient, du conditionnement pré-greffe et/ou des complications post-greffe, les lésions causées au niveau de la muqueuse intestinale entraînent la translocation de ligands de TLR qui semblent activer les lymphocytes T de façon indirecte via l'induction de l'expression de PD-L1 par les cellules dendritiques [258]. Les stimuli pro-inflammatoires influencent également l'expression des ligands de PD-1, PD-L1 et PD-L2. PD-L1 est exprimé par les cellules hématopoïétiques (cellules dendritiques, macrophages, cellules T et cellules B) et non-hématopoïétiques (cellules épithéliales, stromales et plusieurs cellules tumorales) [259]. Son expression peut être induite par les IFNs de type I et II, le TNF- $\alpha$ , l'IL-1- et les cytokines  $\gamma$ -c [260, 261]. Le promoteur de PD-L1 contient un site de fixation pour STAT3, un facteur de transcription au cœur de la signalisation de l'IL-6 [262] ainsi qu'un site de fixation pour le NF- $\kappa$ B régulant son expression par les monocytes [263]. PD-L2, quant à lui, possède une expression inductible plus restreinte notamment par les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules B mémoires [264]. Son expression peut être induite par l'Il-4 et le GM-CSF, et moindrement par les IFNs et les cytokines  $\gamma$ -c [265, 266]. Au-delà de la translocation bactérienne, les réactivations virales et les infections *de novo* peuvent être évoquées. L'activation immunitaire et l'inflammation sont entretenues avec les infections virales notamment celles causées par le CMV, l'ADV, l'HSV (« *Herpès simplex virus* »). Par ailleurs, l'activation dérégulée des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> conduirait à l'épuisement lymphocytaire et à un cercle vicieux d'activation immunitaire.

En dépit de leur rôle clé dans l'immunité antivirale, quelques études suggèrent que les IFNs  $\alpha$  et  $\beta$  peuvent également supprimer le système immunitaire et promouvoir la persistance virale [267, 268]. Chez la souris, l'administration de l'IFN- $\alpha$  induit et



maintient l'expression de PD-1 par les cellules T même en absence de signaux médiés par le TCR. Le mécanisme moléculaire sous-jacent fait intervenir l'interaction de la protéine IRF9 (« *Interferon regulatory factor* ») avec la séquence consensus dite ISRE (« *Interferon-stimulated response element* ») au niveau du promoteur du gène *Pdcd1* [269]. Ceci laisse suggérer que l'ISRE coopère avec les signaux en aval du TCR pour assurer une expression à la fois stable et importante de PD-1. Plus encore, l'inhibition des IFNs de type I résulte en une réduction de l'expression de l'IL-10 et de PD-L1 dans le contexte d'une infection chronique [268, 270]. Ce rôle paradoxal incite à la réévaluation du rôle fondamental des IFNs de type I dans le contexte d'une infection chronique et permet d'expliquer les observations cliniques obtenus suite au traitement avec l'IFN  $\alpha$  et  $\beta$  [271-273].

La profonde lymphopénie tôt suivant la transplantation impose secondairement la mobilisation de mécanismes homéostatiques compensatoires. La prolifération massive des lymphocytes T est à la fois bénéfique et néfaste. Elle permet, d'une part, de compenser le déficit en cellules T donc de restaurer au moins transitoirement un degré de compétence immunitaire, et d'autre part, induit l'expression de PD-1 [274]. Les mécanismes d'homéostasie mis en place en réponse à une diminution des lymphocytes périphériques entraînent la production de cytokines visant à régénérer les cellules et les activer pour permettre leur renouvellement. Les cytokines  $\gamma$ -c notamment l'IL-2, l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-21, connues pour leur rôle important dans l'activation et/ou l'expansion et la survie des cellules T en périphérie, entraînent l'augmentation de l'expression de PD-1 et ses ligands *in vivo* et *in vitro* [275]. Ainsi, il limite la production des cytokines suite à un engagement du TCR. De plus, la lymphopénie entraîne l'accumulation de l'IL-7 en

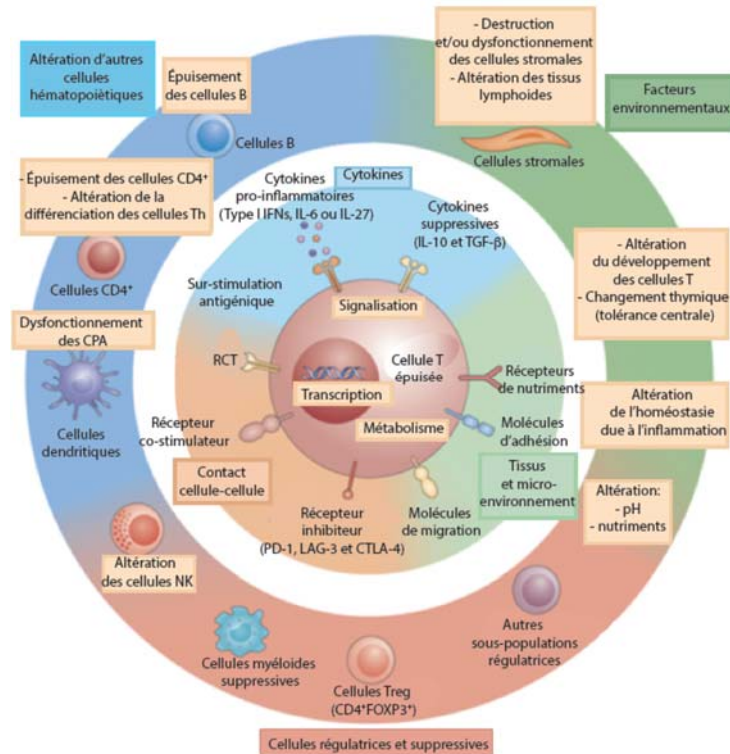
grandes quantités. Il a été démontré que les lymphocytes T épuisés expriment moins la chaîne  $\beta$  du récepteur de l'IL-2 et de l'IL-15 et le CD127 (récepteur de l'IL-7) et démontrent une plus faible réponse à l'IL-7 et à l'IL-15 [276, 277]. En outre, Shive et *al.* [278] ont démontré que la présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 ou l'IL-6 induit une diminution de l'expression membranaire de CD127, et donc une réduction des capacités à répondre à l'IL7. Les mécanismes régulant cette réponse sous-optimale demeurent mal connus.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires pouvant expliquer pourquoi les cellules du SCO seraient plus susceptibles d'être épuisées demeurent mal connus. Quelques hypothèses peuvent être émises à cet effet. Il est possible que la présence de cellules souches biaisées vers une tolérance immunitaire, caractérisées par la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en cellules Treg, soit associée à l'établissement du phénotype épuisé [27]. Dans le même sens, la fréquence élevée de cellules Treg présentes dans le SCO, dotées de fonctions suppressives plus importantes, comparativement à leurs homologues du sang périphérique, soit associée avec le dysfonctionnement des lymphocytes T du SCO [279]. De plus, l'exposition des lymphocytes T au TGF- $\beta$  pendant la grossesse pourrait également contribuer à l'épuisement [280]. La faible expression du facteur de transcription NFAT par les lymphocytes T du SCO pourrait être couplée à un défaut de translocation au niveau du noyau [281] ou d'interaction avec le facteur AP-1, initiant l'expression des gènes de récepteurs inhibiteurs incluant PD-1 [282].

### 1.5.2 Origine de l'épuisement clonal

L'épuisement clonal a été décrit pour la première fois dans un modèle murin d'infection chronique par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) clone-13 [283, 284]. En effet, dans un modèle d'infection chronique avec le LCMV clone-13, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> NP396-spécifiques sont supprimés relativement rapidement à cause d'une sur-stimulation alors que les lymphocytes spécifiques à la GP33 ou GP276 persistent et progressent vers un phénotype épuisé [285]. Typiquement, la production d'IL-2, la polyfonctionnalité ainsi que la capacité proliférative se trouvent être compromises en premier. Par la suite, plus important est l'épuisement clonal, plus grande sera la perte de fonction, se traduisant par un défaut au niveau de la dégranulation et de la production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  [286]. Il est toutefois important de noter que les lymphocytes T épuisés ne sont pas fonctionnellement inertes et retiennent par ailleurs une activité résiduelle qui leur permet de limiter la réplication virale. En effet, la déplétion des cellules T CD8<sup>+</sup> durant une infection par le virus de l'immunodéficience simienne (« *Simian immunodeficiency virus* »; *SIV*) résulte en une augmentation rapide de la charge virale ainsi qu'une progression plus rapide vers la maladie [287, 288]. De plus, une sous-population des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> épuisés semble exprimer des niveaux élevés de granzyme B [256, 286], bien que l'activité cytotoxique s'avère être compromise comparativement aux cellules T effectrices. Il semblerait que cette sérine protéase soit utilisée par les cellules épuisées à d'autres fins, notamment pour promouvoir leur migration [289]. D'autres études ont démontré que la pression de sélection exercée par les lymphocytes T en cours d'épuisement est telle qu'elle induit des mutations aux niveaux de certains épitopes viraux, prévenant la reconnaissance virale par les cellules T

CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> [287, 288]. Initialement décrit dans le contexte d'infection virale chronique (LCMV clone-13[290], VIH [291, 292], VHC [293, 294]), le phénotype épuisé a par la suite été fortement corrélé à la sévérité du dysfonctionnement dans d'autres scénarios pathologiques, incluant le cancer [295, 296] et la malaria [297, 298]. Bien qu'encore moins bien caractérisé dans ces deux contextes, le dysfonctionnement demeure le même dans sa globalité. En effet, Baitsch *et al.* ont soulevé des similarités substantielles au niveau des profils transcriptionnels des lymphocytes T spécifiques à Melan-A provenant de patients en métastases et des lymphocytes T spécifiques à la GP33 du LCMV clone-13 [299]. Une démonstration élégante de la complexité de ce phénomène nous provient de l'étude de la signature moléculaire des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> épuisés, menée chez la souris, par l'équipe de E. J. Wherry. Bien que l'étude suggère que les récepteurs inhibiteurs (discutés plus loin) [286, 300, 301] constituent des joueurs de premiers plans dans l'épuisement clonal, il est indéniable que la persistance antigénique, la modulation de l'expression de certains facteurs de transcription clés, l'influence des cytokines immunosuppressives et des cellules immunorégulatrices, l'absence de l'aide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, ainsi que les changements métaboliques, jouent un rôle prépondérant dans l'établissement ainsi que la sévérité du dysfonctionnement [302-305] (Figure 1.7).



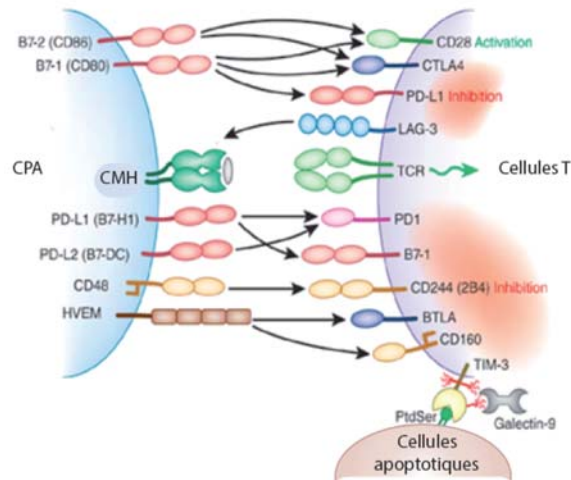
**Figure 1 7 Aperçu des mécanismes impliqués dans l'épuisement clonal**

Les voies impliquées dans la régulation de l'épuisement des cellules T peuvent être divisées en 3 catégories: le contact cellulaire incluant une stimulation prolongée via le TCR (signal 1) et les signaux co-stimulateurs et/ou co-inhibiteurs (signal 2); les facteurs solubles tels que des niveaux élevés de cytokines inflammatoires (par exemple, l'interféron de type I (IFNs)) et de cytokines immunosuppressives incluant l'interleukine-10 (IL-10) et le transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ); l'influence du microenvironnement émanant de changements des niveaux d'expression des récepteurs de chimiokines et de molécules d'adhésion. Cette dernière classe peut inclure l'altération des tissus et/ou des patrons de migration modulant les niveaux des facteurs VHL (« von Hippel–Lindau tumour suppressor ») et HIF (« hypoxia-inducible factor »), des nutriments et du pH. La destruction tissulaire et l'altération de l'organisation lymphoïde joue un rôle majeur. D'autres cellules immunitaires et stromales peuvent être la source de la plupart de ces changements (cercle externe). Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), les cellules T CD4<sup>+</sup>, les cellules NK, les cellules B et les cellules T régulatrices ont été impliquées dans l'épuisement des cellules T CD8<sup>+</sup>. Somme toute, durant une infection chronique, des signaux intrinsèques et extrinsèques sont intégrés et influencent négativement la différenciation des cellules T. L'équilibre entre ces signaux détermine la sévérité et/ou les aspects qualitatifs de l'épuisement clonal. CTLA, cytotoxic T lymphocyte antigen 4; DC, cellules dendritiques; FOXP3, forkhead box P3; LAG3, lymphocyte activation gene 3 protein; PD1, programmed cell death protein 1; T<sub>H</sub> cell, T helper cell. *Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature immunology [306] , copyright (2015).*

### 1.5.3 Fonctions inhibitrices des récepteurs inhibiteurs impliqués dans l'épuisement clonal des lymphocytes T

Les récepteurs inhibiteurs ont été décrit pour la toute première fois au début des années 1990 chez les cellules NK et ont été définis comme ayant un domaine ITIM (« *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* ») qui, lorsque déphosphorylé, recrute des tyrosines phosphatases tel que les SHP-1 et SHP-2 qui vont interférer à leur tour avec les intermédiaires de signalisation en aval du TCR [307-309]. Par la suite, il s'est avéré que les fonctions immunorégulatrices de ces récepteurs dépassaient amplement le compartiment des cellules NK [310]. Durant la dernière décennie, ils ont été au cœur des travaux portant sur l'épuisement clonal des lymphocytes T, particulièrement les cellules CD8<sup>+</sup>, et l'expression d'une large panoplie de récepteurs inhibiteurs, incluant entre autre ceux dépourvus du domaine ITIM, a été associée à l'épuisement clonal. Les récentes études sont venues alors apporter des ajustements au niveau de la définition initialement attribuée aux molécules inhibitrices. De façon plus générale, l'interférence avec l'activation et la fonction des lymphocytes T peut se faire à différents niveaux moyennant des mécanismes distincts incluant: *i*) la compétition avec les récepteurs co-stimulateurs pour la liaison avec les ligands partagés [311, 312]; *ii*) l'interférence (proximale et/ou distale) avec les signaux en aval du TCR et des récepteurs de co-stimulation; et *iii*) la sur-expression de gènes impliqués dans le dysfonctionnement des lymphocytes T [313]. Au centre de la signature moléculaire des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> épuisés on retrouve PD-1 (« *Programmed death-1* ») [314], BTLA (« *B and T lymphocyte attenuator* ») [296], CTLA-4 (« *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* ») [315, 316], TIM-3 (« *T cell immunoglobulin Mucin-3* ») [317, 318], TIGIT (« *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* ») [319, 320], LAG-3 (« *Lymphocyte Activation Gene-3* ») [321, 322],

VISTA (« *V-domain immunoglobulin suppressor of T-cell activation* ») [323, 324], CD160 [325, 326] et 2B4 [300].



**Figure 1. 8 Récepteurs inhibiteurs exprimés par les cellules T CD8<sup>+</sup> [327]**

Contrairement à l'infection virale aiguë, durant laquelle leur expression est transitoire, l'exposition chronique à l'antigène couplée à l'inflammation modifie de façon radicale le déroulement de la réponse immunitaire en question. En effet, l'expression à la fois élevée et soutenue des récepteurs inhibiteurs constitue une caractéristique cardinale de l'épuisement clonal. Globalement, ces molécules inhibitrices appartiennent à des familles de récepteurs structurellement distincts et se lient à des ligands ayant des spectres d'expression divergents qui dépendent des tissus et du contexte inflammatoire. Ainsi, on peut envisager que les voies de signalisation intracellulaires qui leur sont associées ne sont pas redondantes. Les mécanismes moléculaires gouvernant la fonction inhibitrice de ces récepteurs restent encore mal compris. Toutes les évidences indiquent clairement que ces voies inhibitrices, bien que substantiellement chevauchantes ne sont pas

mutuellement exclusives et leurs effets sont néanmoins additifs voire même synergiques [328, 329].

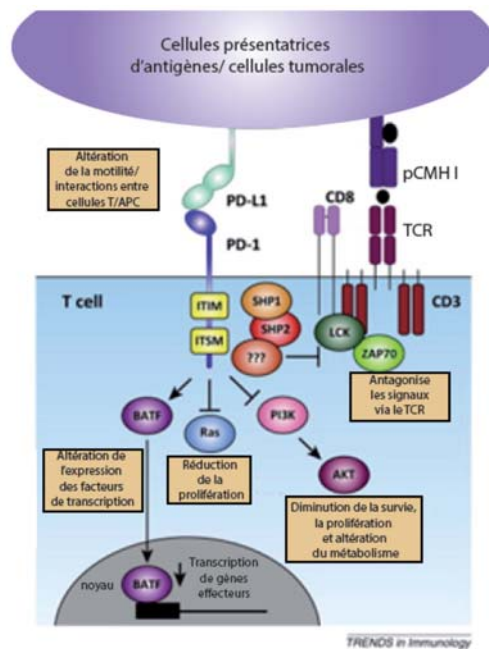
De façon remarquable, l'intégration des signaux dictés par le microenvironnement ainsi que les multiples facteurs touchant tant les cellules infectées ou tumorales qu'immunitaires contribuent à rendre le répertoire des récepteurs inhibiteurs, leur niveau d'expression ainsi que le degré du dysfonctionnement dépendants de la pathologie en question. Un exemple éclairant concerne les cellules T CD8<sup>+</sup> VIH spécifiques qui, contrairement aux cellules VHC spécifiques, perdent assez rapidement leur capacité à produire l'IFN- $\gamma$  et présentent des défauts en termes de polyfonctionnalité et de cytotoxicité [330, 331]. De plus, Barber *et al.* ont rapporté que le blocage de l'interaction entre PD-1 et PD-L1 ne permettait qu'une restauration partielle de la fonction des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> [332]. Blackburn *et al.* ont observé un effet sélectif du blocage envers la population exprimant des niveaux intermédiaires de PD-1 et une inversion synergique du dysfonctionnement [333]. Une récente étude par Paley *et al.* a démontré, dans un modèle d'infection par le LCMV clone-13, l'existence de deux populations de cellules épuisées. La population exprimant un niveau intermédiaire de PD-1 servait de progéniteur pour les populations les plus épuisées exprimant des niveaux plus élevés de PD-1 [256]. Le contexte, en termes de l'abondance de l'antigène et/ou la perte de l'aide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, favorise en grande partie cette transition vers un épuisement plus sévère. Ceci a été également démontré chez des patients infectés par le VIH [334], mettant en exergue à la fois la complexité de ce phénomène et la plasticité des populations épuisées.



### ***1.5.3.1 Régulation de l'expression de PD-1 et de ses ligands***

PD-1 (ou CD279) a été initialement découvert par Ishida *et al.* en tant que gène surexprimé dans un hybridome de cellules T subissant la mort cellulaire [335]. Toutefois, PD-1 n'active pas directement les caspases ou les voies impliquées dans la mort cellulaire. Des études ultérieures n'ont pas confirmé son implication directe dans la mort programmée de ces lignées et sa fonction est demeurée évasive jusqu'à son association avec le développement spontané de maladies auto-immunes chez les souris *Pdcd1*<sup>-/-</sup> [336]. Depuis, il est devenu évident que PD-1 joue un rôle crucial dans la régulation négative de la réponse immunitaire et qu'il contribue à limiter l'immunopathologie et à promouvoir la tolérance périphérique [260]. Aussi bien chez l'homme que chez la souris, le gène *Pdcd1* consiste en 5 exons : *i*) l'exon 1 codant pour une séquence signal, *ii*) l'exon 2 codant pour un domaine Ig-V, *iii*) l'exon 3 codant pour un domaine transmembranaire, et *iv*) les exons 4 et 5 codant pour le domaine cytoplasmique contenant l'ITIM et l'ITSM. Leur expression est régulée par un mécanisme d'épissage alternatif de l'ARNm, ce qui se traduit par la synthèse de 4 variants tous exprimés par les cellules mononucléées humaines dont le rôle reste toutefois inconnu pour la plupart [257]. La découverte de ses deux ligands PD-L1 (ou B7-H1, CD274) et PD-L2 (ou B7-DC, CD273) peu de temps après [259] a permis de mieux comprendre les mécanismes régulateurs impliqués dans la voie inhibitrice médiée par PD-1. Structurellement, PD-1 possède deux résidus tyrosines dans sa portion intracytoplasmique: un proximal par rapport à la membrane, l'ITIM et un autre l'ITSM (« *Immunoreceptor tyrosine-based switch motif* »). Ces deux résidus ne sont pas fonctionnellement équivalents, tel que démontré par Okazaki *et al.* soulignant l'importance du résidu ITSM dans la fonction inhibitrice de PD-1 [337]. PD-1 antagonise

un large éventail de voies de signalisation en aval du TCR et du co-récepteur CD28. En effet, la liaison de PD-1 à son récepteur PD-L1 rend les cellules T CD8<sup>+</sup> nettement plus sensibles à l'apoptose en inhibant l'expression de Bcl-xL (« *B-cell lymphoma-extra large* ») qui est dépendante de l'activité de la PI3K [338]. La translocation de PD-1 vers le complexe supramoléculaire d'activation central de la synapse immunologique (« *central supra-molecular activation complexe*»; cSMAC) est nécessaire pour la régulation négative de l'activité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> [339]. Les études *in vitro* suggèrent que lorsque phosphorylé, l'ITSM présent dans son domaine cytoplasmique interagit avec la SHP-2 et possiblement avec SHP-1 [340, 341], qui vont à leur tour déphosphoryler CD3ζ, Zap70 (« *Zeta-chain-associated protein kinase 70* »), et PKCθ, interférant de ce fait avec la production de cytokines effectrices [328, 340].



**Figure 1. 9 Mécanismes de l'inhibition médiée par le récepteur PD-1 dans les cellules T**

Cinq mécanismes ont été proposés comme étant impliqués dans la modulation de la fonction des cellules T. PD-1 peut: (A) antagoniser directement les signaux en aval du TCR en recrutant les phosphatases au résidu tyrosine présent au niveau de son domaine

cytoplasmique, ce qui prévient la phosphorylation de ZAP 70 (« Zeta-chain-associated protein kinase 70 ») médiée par LCK (« Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase »); (B) inhiber l'activation de PI3K (« Phosphatidylinositide 3 Kinase ») menant à une réduction de l'activation d'AKT et du mTOR (« Mammalian Target of Rapamycin »); (C) inhibe la voie RAS; (D) augmente l'expression de certains facteurs de transcription incluant BATF (« Basic leucine zipper transcription factor ») qui inhibe à son tour l'expression de plusieurs gènes effecteurs; (E) Affecte la motilité des cellules T et la stabilité et/ou la durée de l'interaction entre les cellules T et les cellules présentatrices de l'antigène (CPA). *Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Trends in immunology [342], copyright (2015).*

PD-1 module également les voies Ras/MEK/ERK et PI3K/Akt/mTOR (« *Phosphatidylinositide 3 Kinase* »; « *Mammalian Target of Rapamycin* »), affectant par conséquent le métabolisme du glucose et la régulation du cycle cellulaire. En outre, une étude élégante de Quigley et *al.* a démontré que PD-1 régulait positivement l'expression de gènes effecteurs tels que BATF [304], compromettant ainsi la prolifération et la sécrétion de cytokines effectrices incluant l'IL-2, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ . Somme toute, ces mécanismes ont été disséqués en grande partie grâce aux études *in vitro* faites à partir de cellules activées de façon aiguë. Si ces mécanismes sont mis en jeu *in vivo* dans le contexte d'une exposition prolongée à l'antigène est encore inconnu. PD-1 module les fonctions effectrices en réduisant l'expression de cytokines et de facteurs de transcriptions incluant Tbet, et Eomes [343]. De plus, il interfère avec la production de molécules cytotoxiques, réduisant ainsi la capacité cytolytique des cellules T CD8<sup>+</sup>. Wei *et al.* suggèrent que l'inhibition des fonctions effectrices se fait de façon dépendante du niveau d'expression de PD-1, d'où le caractère hiérarchique de la perte de fonction [255]. PD-1 module également la motilité et la force de l'interaction entre les cellules dendritiques et les cellules cibles [344].

### 1.5.3.2 CTLA-4

CTLA-4 et CD28 sont les membres les mieux caractérisés de la famille des co-récepteurs, la superfamille des immunoglobulines (*Ig SF*). Ces deux molécules, l'une immuno-régulatrice et l'autre immuno-stimulatrice, forment des homodimères et se lient aux mêmes ligands CD80 (ou B7-1) et CD86 (ou B7-2) exprimé par les CPA, toutefois avec différentes affinités [345-347]. Exprimé à la surface des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés, CTLA-4 entre en compétition avec CD28 en se liant avec une plus grande avidité aux CD80/CD86, accroît le seuil d'activation cellulaire et interfère avec la réponse immunitaire en cours. Il permet ainsi de limiter le développement de maladies auto-immunes. En effet, les souris *Ctla-4*<sup>-/-</sup> démontrent une lymphoprolifération accrue et meurent après 3 semaines suite à une infiltration massive des tissus par les cellules T et la destruction des organes [348, 349]. Deux mécanismes inhibiteurs distincts sont mis à contribution. Se liant au CD80 avec une affinité 10-20 fois supérieure à celle notée pour CD28, CTLA-4 exclut physiquement ce dernier de la synapse immunologique même lorsqu'il est exprimé à de plus faibles niveaux [312]. Contrairement à PD-1, CTLA-4 préserve l'activité de PI3K et de BcL-xL mais inhibe directement l'activation de AkT via la phosphatase PP2A (« *serine/threonine protein phosphatase 2A*»). De surcroit, CTLA-4 s'associe, via son motif YVKM présent au niveau du domaine cytoplasmique, SHP-2 et la PP2A, et entraîne la déphosphorylation du complexe TCR-CD3 $\zeta$ , de LAT (« *linker for activation of T cells*») et de ZAP70. Ceci a pour conséquence directe une inhibition de la progression du cycle cellulaire et de la production de cytokines. CTLA-4 antagonise également la signalisation distale en aval du TCR en inhibant la phosphorylation d'ERK et JNK [350].

### **1.5.3.3 BTLA**

Le récepteur BTLA se distingue de CTLA-4 et PD-1 par son expression de façon constitutive par les cellules T naïves et de façon précoce par les cellules activées [351, 352]. Les souris déficientes en BTLA développent graduellement des anticorps dirigés contre les constituants du soi et démontrent une infiltration cellulaire accrue dans plusieurs organes [353]. Le rôle joué par BTLA dans l'induction de la tolérance périphérique se manifeste à travers un biais en faveur de l'expansion des cellules Treg au détriment des cellules effectrices [354]. Paradoxalement, lorsqu'exprimé par les CPA, l'interaction de BTLA avec son ligand, le HVEM (« *Herpesvirus entry mediator* ») présent à la surface des cellules T, délivre des signaux positifs d'une part permettant de promouvoir la survie des cellules T effectrices et mémoires, et, d'autre part nécessaires pour le développement de réponse protectrice chez la souris [355]. Ceci dit, selon qu'il sert de récepteur ou de ligand, BTLA bascule entre régulation négative ou positive dépendante du contexte. Chez les patients atteints de mélanome, les cellules T CD8<sup>+</sup> NY-ESO-1 spécifiques, exprimant simultanément BTLA, PD-1, TIM-3, constituent la sous-population la plus engagée dans le processus d'épuisement clonal. Le blocage combiné de ces récepteurs permet l'inversion du dysfonctionnement et le rétablissement des fonctions effectrices et de la capacité proliférative des cellules T CD8<sup>+</sup>, suggérant un rôle joué par BTLA dans la régulation de l'épuisement clonal dans le microenvironnement tumoral [356]. Paradoxalement, Speiser *et al.* ont démontré, via une analyse du transcriptome réalisée sur des cellules CD8<sup>+</sup> MART-1-spécifiques de patients atteints de mélanome, que BTLA n'est pas inclus dans la signature génique caractérisant les cellules épuisées détectées chez les patients atteints de mélanome [299]. Ceci laisse suggérer que

BTLA, en plus d'être un marqueur d'épuisement clonal, pourrait indiquer un défaut de différenciation des cellules T activées.

#### **1.5.3.4 2B4**

Le récepteur 2B4 peut induire à la fois des voies de signalisation stimulatrices ou inhibitrices. En effet, la phosphorylation de son domaine ITSM permet son interaction avec la protéine adaptatrice SAP (« *Slam-associated protein* »). Pourvu d'un domaine SH2, cette dernière va promouvoir indirectement l'activation des cellules T en bloquant l'activité de SHP-1 et SHP-2. Chlewicki *et al.* ont démontré que la fonction inhibitrice de 2B4 était la conséquence directe de son niveau d'expression et de la disponibilité des molécules adaptatrices EAT-2A et EAT-2B (« *Ewing's sarcoma-associated transcript 2* »), deux autres protéines de la famille SAP [355]. Leur liaison aux domaines ITSM de 2B4 est à l'origine du recrutement de SHP1 et SHIP1 au niveau de la synapse immunologique et inhibe par ailleurs la fonction des lymphocytes T [357, 358].

#### **1.5.3.5 TIM-3**

Tim-3 a été initialement identifié comme un marqueur des cellules T CD4<sup>+</sup> auxiliaires et T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques [359]. Jusqu'ici, on n'en connaît que très peu sur les molécules intracellulaires qui interagissent avec, ou modulent, la fonction de TIM-3. Des études récentes ont rapporté que l'interaction avec la galectine-9 induisait une phosphorylation du domaine cytoplasmique de TIM-3, l'accumulation de la forme inactive de LcK et un défaut de production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ . Il semblerait que Bat3 (« *B-associated transcript 3* »), une protéine chaperone, protégerait les cellules d'une régulation négative TIM-3

dépendante [360]. Une faible expression de Bat3 a été par ailleurs dans les cellules T CD4<sup>+</sup> Tim-3<sup>+</sup> épuisées provenant de patients infectés par le VIH positifs [361].

#### **1.5.3.6 LAG-3**

LAG-3 se lie aux molécules du CMH de classe II, tout comme CD4, toutefois avec une plus grande affinité [362]. Il est exprimé par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> activés, les cellules Treg et quelques sous-populations de cellules B, NK et dendritiques plasmacytoïdes. Suite à une stimulation via le TCR, LAG-3 est rapidement transloqué à la surface cellulaire, où son expression se trouve être régulée par l'action combinée de deux métalloprotéases qui vont assurer son clivage et permettre l'activation des cellules T [363]. Tout comme les souris TIM-3<sup>-/-</sup>, les souris déficientes en LAG-3 ne manifestent pas de susceptibilité accrue à l'autoimmunité spontanée, ce qui suggère un rôle plus subtil dans la régulation de la réponse immunitaire comparativement à CTLA-4 et PD-1. LAG-3 affecte la progression du cycle cellulaire et ne semble pas influencer la survie cellulaire ou du moins très peu [364]. Il semblerait que, subséquemment à une signalisation via le TCR, un résidu lysine (K468) présent dans un motif conservé du domaine intracellulaire de LAG-3 soit directement impliqué dans ses fonctions inhibitrices [365].

#### **1.5.3.7 TIGIT**

Le récepteur TIGIT est le plus récent membre de l'IgSF [366, 367]. Aussi bien chez la souris que chez l'homme, il est exprimé par les lymphocytes T activés et mémoires, les cellules Treg, les cellules NK et les cellules NKT [366]. Il interagit avec deux ligands, soit le PVR (« *Poliovirus receptor* ») et le PVRL2 (« *Poliovirus receptor-related 2* »)

[368]. TIGIT ne semble pas être directement lié à la sensibilité des souris à l'autoimmunité. Toutefois, son absence est à l'origine de l'exacerbation de ce phénotype [369]. Plusieurs études récentes attribuent un rôle de régulateur négatif à TIGIT. Les mécanismes impliqués dans la modulation de la réponse T peuvent être directs ou indirects. La signalisation en aval de TIGIT abroge la prolifération des cellules T, la production de cytokines effectrices et accroît la production d'IL-10 [370]. En effet, chez l'homme, la liaison de TIGIT à PVR induit la phosphorylation du domaine intracellulaire ITT (« *Immunoglobulin tail tyrosine* ») ce qui est à l'origine du recrutement de la phosphatase SHIP1 et l'inhibition des voies PI3K, MAPK et NF-κB [320, 371]. Les mécanismes indirects, quant à eux, sont dépendants de CD226, molécule co-stimulatrice cruciale pour

#### **1.5.4 Épuisement clonal et régulation transcriptionnelle**

Le modèle actuel dominant stipule que le profil transcriptionnel caractéristique des cellules épuisées prend plusieurs semaines à s'établir et que les cellules T CD8<sup>+</sup> ayant initialement acquis des fonctions effectrices deviennent alors dysfonctionnelles [286]. Les gènes impliqués dans le développement de cellules mémoires fonctionnelles demeurent réprimés dans le contexte d'une signalisation prolongée via le TCR, qui se poursuit dans ce cas au-delà de la phase effectrice de la réponse immunitaire, menant ainsi à une polarisation graduelle vers un phénotype épuisé [372]. Ceci pointe du doigt l'importance de faire la distinction entre ce phénotype acquis dans un contexte bien défini et les autres formes de dysfonctionnement des lymphocytes T tels que l'anergie ou la sénescence [286, 373]. Le changement au niveau de l'expression des récepteurs inhibiteurs, aussi minime soit-il, implique une fine régulation de l'expression des gènes



d'intérêt, laquelle est coordonnée par des mécanismes combinatoires incluant le recrutement de facteurs de transcription et des changements épigénétiques. Des études génomiques ont permis de révéler des différences majeures au niveau du programme transcriptionnel des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> épuisés comparativement aux cellules effectrices et mémoires [286, 372]. Il est primordial de pointer du doigt le fait que, jusqu'à présent, aucune étude n'a permis d'identifier un seul et unique facteur de transcription comme étant impliqué directement dans l'épuisement clonal. En effet, c'est une large panoplie de facteurs qui a été identifiée sur la base de l'abondance des transcrits incluant: T-bet, Eomes, Blimp-1, NFAT, BATF, FOXO1, FOXP1 [256, 281, 304, 374-377]. Les concepts actuels suggèrent une fonction contexte-dépendante des facteurs de transcription, traditionnellement impliqués dans la maturation des cellules effectrices et mémoires. T-bet et Eomes semblent avoir des rôles diamétralement opposés selon qu'il s'agisse d'une cellule épuisée, d'une cellule effectrice ou d'une cellule mémoire. Alors qu'il joue un rôle majeur dans la différenciation terminale des cellules CD8<sup>+</sup> dans le contexte d'une infection aiguë, T-bet est exprimé par une sous-population de cellules épuisées qui retient des fonctions effectrices résiduelles et exprime des niveaux intermédiaires de PD-1. De façon similaire, Eomes participe au maintien de l'homéostasie des cellules T mémoires et est fortement exprimé par les lymphocytes T ayant atteint un état d'épuisement plus sévère et présents préférentiellement dans les tissus périphériques [256].

Blimp-1 joue un rôle critique dans la maturation et la génération des cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices [378, 379]. Son implication dans l'épuisement clonal provient d'une étude publiée par Shin *et al.* qui démontre que les cellules T CD8<sup>+</sup> déficientes en Blimp-1

expriment de faibles niveaux de récepteurs inhibiteurs et que cette délétion permet l'inversion du phénotype épuisé [375]. Blimp-1 pourrait faire partie d'une boucle de rétroaction négative qui résulte en une sécrétion limitée d'IL-2 dans le contexte d'une persistance antigénique [379]. Blimp-1 joue un rôle important en tant que répresseur transcriptionnel de PD-1 soit en se fixant directement sur le promoteur du gène *Pdcd1* [380] ou en réprimant l'expression de NFATc1 et en destituant le NFAT de son site de fixation depuis lequel il contrôle l'expression de PD-1. L'expression de BATF a été corrélée à celle de PD-1, aussi bien chez la souris que chez l'homme. En effet, les patients infectés par le VIH qui sont incapables de contrôler la réplication virale, expriment des niveaux élevés de BATF qui compromettent la capacité proliférative et la sécrétion de cytokines effectrices [304]. BATF est aussi impliqué dans la génération des cellules Th17, le développement des cellules T folliculaires et la différenciation des cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices [381, 382].

Les rôles contradictoires soulevés indiquent que ces facteurs de transcription peuvent être à la fois des régulateurs positifs et négatifs dont l'activité est dépendante : *i*) des modifications post-traductionnelles; *ii*) de leur niveau d'expression ; et *iii*) des régulations épigénétiques au niveau de l'ADN, du nucléosome et de l'organisation de la chromatine. Tel que décrivent Youngblood *et al.* dans le contexte d'une infection par le LCMV clone-13, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> épuisés contiennent un locus PD-1 non méthylé, le rendant ainsi plus accessible [383]. Une re-méthylation n'a cependant pas été observée même lorsque le niveau d'expression de PD-1 est bas et que la charge virale est contrôlée. Une autre étude publiée par le même groupe et réalisée cette fois-ci chez l'homme dans le contexte de l'infection par le VIH est venue appuyer cette conclusion

[384]. Les marques épigénétiques, de nature répressive, ne sont donc pas rétablies, même après contrôle de la réplication virale. Les changements épigénétiques viennent soutenir, voire même renforcer, les signaux permettant le maintien du phénotype épuisé. Une étude récente par Zhang *et al.* a montré que le dysfonctionnement des cellules CD8<sup>+</sup> épuisées, perçu à travers une faible production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2, était corrélé à un faible niveau de diAcH3 (« *diacetylated histone H3* ») au niveau des régions régulatrices des loci *Ifng* et *Il2* [385]. De plus, Lichterfeld *et al.* ont rapporté un raccourcissement des télomères conjointement à une activité de télomérase réduite dans les cellules T CD8<sup>+</sup> VIH spécifiques provenant de patients ne contrôlant pas leur infection comparativement aux contrôleurs d'élite. Chez ces derniers, une stabilisation de la longueur des télomères a été associée à une préservation des propriétés cytotoxiques et prolifératives. L'identification des mécanismes impliqués dans la mise en place différentielle de réseaux de régulation gouvernant l'activation et la répression sélective des gènes nécessaire à l'établissement et/ou le maintien de l'épuisement clonal mènerait à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques permettant l'inversion du dysfonctionnement.

### **1.5.5 Épuisement clonal, médiateurs solubles et cellules régulatrices**

Parmi les mécanismes impliqués dans l'épuisement clonal des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, on retrouve ceux médiés par les cytokines immunorégulatrices incluant entre autre l'IL-10 et le TGF- $\beta$  [246]. Des niveaux d'expression d'IL-10 particulièrement élevés ont été observés dans le contexte d'une infection par le VIH, le VHC et le VHB et le LCMV-clone 13 et ont été corrélés avec la perte de fonction des cellules T CD8 [386-388]. Brooks *et al.* ont démontré que la délétion génétique de l'IL-10 ou la manipulation de l'axe IL-10/IL-10 récepteur résulte en une élimination plus rapide du LCMV clone-13 et

permet l'inversion de l'épuisement [389]. De plus, le blocage de l'IL-10 en plus de la voie PD-1 permet une inversion plus efficace du dysfonctionnement, soulignant d'une part l'implication de l'IL-10 dans l'épuisement clonal et, d'autre part, que ces deux voies agissent en synergie [390]. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la signalisation par l'IL-10 ainsi que ses cibles cellulaires demeurent encore mal caractérisés. Les raisons associées à une production importante d'IL-10 dans le cas de certaines infections restent encore mal comprises. La magnitude et la qualité de la réponse immunitaire innée, comme les IFN de types I, peuvent influencer la production d'IL-10. Elle agirait en supprimant le développement d'une réponse immunitaire adaptative et ce en altérant la fonction des CPA ou en exacerbant le fonctionnement des lymphocytes T, probablement en induisant une sur-expression de PD-L1 par les cellules dendritiques [391]. Autant les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> que CD8<sup>+</sup> constituent une source secondaire d'IL-10 [392]. Le rôle joué à cet égard par les cellules CD4<sup>+</sup> semble être secondaire en renforçant probablement l'immunosuppression. Dans le cas d'une infection par le VHC, il a été démontré que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques intrahépatiques produisent l'IL-10, indiquant que la suppression autocrine influence la capacité de ces cellules à combattre l'infection [392, 393].

Le rôle joué par le TGF- $\beta$  dans l'épuisement clonal demeure controversé. Des études récentes ont mis en évidence son implication directe dans la répression transcriptionnelle des gènes clés codants pour des cytokines clés incluant la perforine et les granzymes [394, 395]. Il semble que le TGF- $\beta$  produit par les cellules tumorales supprime la fonction des cellules T en modulant positivement, et de façon marquée, les niveaux de miR-23a [394].

La fréquence des cellules Treg est augmentée dans le contexte d'une infection par le VIH et le VHC. Toutefois, le mécanisme précis mis en œuvre pour le développement de l'épuisement clonal demeure inconnu. Les Tregs expriment des niveaux élevés de CD25, ce qui leur permet de consommer excessivement l'IL-2, compromettant ainsi la fonction effectrice des cellules T [396, 397]. La co-expression de l'ectoenzyme CD39 et de CD73 par des Tregs entraîne la production d'adénosine péri-cellulaire en se liant à son récepteur A2AR (*adenosine A2A receptor*), supprimant par ailleurs les fonctions effectrices [398, 399]. De plus, des mécanismes suppresseurs par les cytokines produites par les Treg, telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$  repriment la fonctions des cellules T effectrices [394].

Une étude par Penaloza-MacMaster *et al.* dans un modèle murin d'infection par le LCMV clone-13 a démontré un effet synergique, particulièrement prononcé, sur l'inversion de l'épuisement suite à la déplétion des cellules Treg et du blocage de PD-1 [400]. De plus, une sous-population des cellules Treg produisant de l'IL-35 [401, 402] peut entraîner la polarisation des cellules T effectrices normales en cellules Treg. Ceci dit, ces dernières peuvent soit affecter directement des cellules antigène-spécifiques durant une exposition chronique à l'antigène, soit agir indirectement en renforçant l'immunosuppression.

## **1.6 Problématique du projet de recherche**

La profonde lymphopénie consécutive à la TCSH, *à fortiori* à la TSCO, est telle qu'elle expose le patient à des risques élevés d'infections virales, causées en grande partie par le CMV et le VZV. Malgré les progrès observés en termes de prévention et de gestion de ces infections, ces deux virus demeurent une préoccupation considérable spécialement

après une TSCO. La cinétique de la reconstitution immunitaire spécifique au CMV et au VZV chez les receveurs de TSCO demeure à ce jour mal caractérisée. De plus, toutes les études supposent que les cellules T du sang de cordon, compte tenu leur caractère naïf, offrent une protection limitée au receveur durant les 100 premiers jours suivant la transplantation. En effet, l'absence de mémoire immunitaire est associée à une oligoclonalisation du compartiment T ne permettant pas d'assurer une protection contre une large panoplie d'antigènes. La question des facteurs intrinsèques et extrinsèques menant à une telle différence, au niveau de l'IRM, entre TSCO et TMO est loin d'être épuisée. Tel qu'exposé dans l'introduction, l'épuisement clonal représente un état de dysfonctionnement des lymphocytes T acquis dans un contexte d'exposition antigénique et d'inflammation chronique, deux conditions présentes dans l'environnement lymphopénique tôt suivant la transplantation. La frontière entre l'engagement dans une voie menant à l'épuisement clonal ou à une réponse T optimale peut être remarquablement ténue puisqu'une légère modification peut suffire à la franchir aussi bien après TSCO qu'après TMO. L'absence de littérature caractérisant le répertoire de récepteurs inhibiteurs exprimés par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> provenant de l'une ou l'autre des sources de CSH nous a amené à nous pencher sur la question. La caractérisation phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> a donc fait l'objet de la seconde partie du présent projet. L'intégration de thérapies immunomodulatrices dans les protocoles cliniques pourrait constituer une stratégie prometteuse pour assurer une meilleure gestion des infections virales après TSCO. Il est pertinent de soulever l'importance de renforcer l'immunité antivirale sans pour autant entraîner une majoration de la GvHD.

## **1.7 Hypothèses de recherche**

1. L'incidence élevée d'infections virales après TSCO reflète un défaut de fonctionnement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> du SCO, compromettant leur capacité à protéger les receveurs pédiatriques de SCO contre les infections à CMV et VZV.
2. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> du SCO co-expriment plusieurs récepteurs inhibiteurs associés à l'épuisement clonal, affectant leur capacité proliférative ainsi que leur capacité à produire des cytokines effectrices.
3. Le répertoire de récepteurs inhibiteurs exprimés par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> du SCO est différent de celui de leurs homologues provenant de la MO.

## **1.8 Objectifs de recherche**

1. Caractériser les réponses lymphocytaires spécifiques à CMV et à VZV suivant la TSCO.
2. Étudier l'expression concomitante de plusieurs molécules associées à l'épuisement clonal par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> suivant TSCO et la TMO.
3. Caractériser les propriétés fonctionnelles des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> après TSCO et TMO.

## **Chapitre 2 Premier article**



## **2.1 Mise en contexte et contribution au premier article**

Dans le contexte d'une TSCO, les infections à VZV, outre leur incidence élevée, elles sont associées à des tableaux cliniques plus sévères. De ce fait, tous les patients séropositifs vis-à-vis du VZV avant la transplantation reçoivent une prophylaxie antivirale durant les 12 premiers mois pouvant affecter la reconstitution de l'immunité antivirale et retardant ainsi l'apparition de la maladie. Ce premier chapitre décrit le développement d'un test d'ELISpot IFN- $\gamma$  pour l'évaluation de la reconstitution immunitaire spécifique au VZV suite à la TSCO et évoque la pertinence d'associer une telle technique à un suivi personnalisé des patients dans le but d'identifier ceux qui sont capables de contrôler l'infection de ceux nécessitant une thérapeutique médicamenteuse antivirale. Le vaccin Varivax inactivé a été utilisé comme source d'antigène, évitant ainsi la manipulation et la culture de souches vivantes du VZV dans un milieu hospitalier. Dans ce premier article, j'ai entrepris les essais de mise au point des tests ELISpots avec Anne-Julie Grenier et Elyse Joliette, sous la supervision de Dr Soudeyns.

Ma contribution à l'article est évaluée à 80% et consiste en la réalisation d'une partie des mises au point et expériences (Figure 2.2, Figure 2.4 et Tableau 2.1), l'analyse des résultats, l'écriture de l'article en totalité le lequel a été par la suite corrigé par mon directeur de thèse.

## **Development of an IFN- $\gamma$ ELISpot Assay to Assess Varicella-Zoster Virus-specific Cell-mediated Immunity Following Umbilical Cord Blood Transplantation.**

### **Authors:**

Insaf Salem Fourati, Anne-Julie Grenier, Elyse Jolette, Natacha Merindol, Philippe Ovetchkine and Hugo Soudeyns.

**Keywords:** Varicella zoster virus, cell-mediated immunity, T cells, interferon gamma, ELISpot, umbilical cord blood transplantation.

### **Short abstract:**

Novel generations of functional assays such as gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) ELISpot, which detect cytokine production at the single cell level and provide both quantitative and qualitative characterization of T cell responses can be used to assess cell-mediated immune responses directed against varicella-zoster virus (VZV).

**Status:** *published in Journal of Visualized Experiment : J Vis Exp. 2014 Jul 9;(89).*

## 2.2 Long Abstract

Varicella-zoster virus (VZV) is a significant cause of morbidity and mortality following umbilical cord blood transplantation (UCBT). For this reason, antiherpetic prophylaxis is administered systematically to paediatric UCBT recipients to prevent complications associated with VZV infection, but there is no strong, evidence based consensus that defines its optimal duration. Because T cell mediated immunity is responsible for the control of VZV infection, assessing the reconstitution of VZV-specific T cell responses following UCBT could provide indications as to whether prophylaxis should be maintained or can be discontinued. To this end, a VZV-specific gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay was developed to characterize IFN- $\gamma$  production by T lymphocytes in response to *in vitro* stimulation with irradiated live attenuated VZV vaccine. This assay provides a rapid, reproducible and sensitive measurement of VZV-specific cell-mediated immunity suitable for monitoring the reconstitution of VZV-specific immunity in a clinical setting and assessing immune responsiveness to VZV antigens.

## 2.3 Introduction

First performed in 1989, UCBT is increasingly used as part of the treatment of various neoplastic and non-neoplastic blood disorders in children<sup>1</sup>. VZV is a cytopathic human alphaherpesvirus which causes two different diseases, varicella (after primary infection) and herpes zoster (after reactivation). Following primary infection, VZV persists throughout the life of the host sheltered within sensory nerves of dorsal root ganglia. One of the most threatening infectious complications following UCBT is associated with

VZV<sup>2-4</sup>. In our clinical center, in absence of VZV prophylaxis, the cumulative incidence of VZV disease at 3 years post-UCBT was 46%<sup>2</sup>. In these patients, *de novo* infection with or reactivation of VZV is often associated with visceral dissemination to the central nervous system, lungs and liver<sup>5-7</sup>. As a result, acyclovir, valacyclovir or famciclovir prophylaxis is commonly administered to UCBT recipients<sup>8,9</sup>. However, this treatment strategy does not take into account the protective potential of VZV-specific T lymphocytes or the kinetics of reconstitution of VZV-specific T cell responses. Potential problems associated with the expanding use of long-term anti-herpetic prophylaxis include a) patient over-treatment; b) the development of antiviral drug resistance<sup>10,11</sup>; and c) impairment of VZV-specific immune reconstitution<sup>12,13</sup>. Because detection of functional VZV-specific T lymphocytes correlates with the presence of long-term protection from VZV infection and improved clinical outcome<sup>4,14,15</sup>, monitoring cell-mediated immune responses directed against VZV during the post-transplant period might result in a more rational use of antiviral treatment by enabling medical practitioners to distinguish patients who would benefit from VZV prophylaxis from those whose immune system is capable of controlling VZV replication<sup>4,13</sup>.

The IFN- $\gamma$  ELISpot assay is widely used for the monitoring cell-mediated immune responses in a variety of experimental systems and clinical conditions. Spots are generated following the cleavage of a chromogenic substrate, generating a visible and stable precipitate at the site of the reaction. Each individual spot thereby represents the footprint of an individual cytokine-producing cell. IFN- $\gamma$  ELISpot not only measures the ability of individual cells *ex vivo* to produce IFN- $\gamma$  in response to *in vitro* stimulation with cognate antigen, but it also provides an estimate of the frequency of responding cells in a

given cell population<sup>16,17</sup>. In addition to its high sensitivity, IFN- $\gamma$  ELISpot is straightforward to perform, making its use possible in the context of personalized clinical protocols aimed at guiding initiation or cessation of antiviral treatment. The procedure detailed below describes an ELISpot assay that is specifically designed to detect and measure the production of IFN- $\gamma$  by peripheral blood mononuclear cells following *in vitro* stimulation with VZV-derived antigens.

## **2.4 Protocol Text**

This research protocol was approved by the Institutional Ethics Review Board of CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada, where the study was conducted. Informed consent was sought and obtained from all study participants, their parents or legal guardians. All procedures performed on days 1 and 2 must be carried out under sterile conditions (*i.e.* under a laminar flow hood). Standard safety procedures for handling human blood should be strictly observed.

### **1. Coating the Plates**

1.1) Permeabilize the polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes at the bottom of 96-well MultiScreen IP white ELISPOT plates by adding to each well 20  $\mu$ l of 35% ethanol for 1 minute. Membranes should become slightly translucent.

1.2) Immediately wash the wells 3 times with 200  $\mu$ l of 1X phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) using a multichannel pipette or similar device. This step is critical given that ethanol residues can

affect cell viability and binding of capture antibody. ELISpot plates are fragile and should be handled carefully: the use of an automated plate washer is not recommended.

1.3) Coat the wells with 100  $\mu\text{l}$  of purified mouse anti-human IFN- $\gamma$  capture antibody diluted in 1X PBS to a final concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$ . Cover the plates with regular plastic wrap and incubate overnight at 4  $^{\circ}\text{C}$ .

## **2. Blocking Plates**

2.1) Empty the wells, tapping them dry, and wash plates 5 times with 200  $\mu\text{l}$  of 1X PBS.

2.2) Fill the wells with 200  $\mu\text{l}$  of complete RPMI 1640 medium and incubate plates for 2 hours at 37  $^{\circ}\text{C}$  (blocking step).

2.3) Wash the plates 5 times with 200  $\mu\text{l}$  of 1X PBS and keep the wells full of 1X PBS until cells are ready to be plated.

## **3. Cell Plating and Stimulation**

3.1) Prepare peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from human venous blood samples by centrifugation on Ficoll-Paque gradients using standard procedures. Alternatively, using standard methods, thaw aliquots of PBMC frozen under liquid nitrogen. After the last centrifugation, resuspend cells at a final concentration of  $2 \times 10^6$  cells/ml and incubate overnight at 37  $^{\circ}\text{C}$  under a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere in a water jacket incubator.

3.2) Remove PBMC from the incubator and resuspend them in a final volume of 5 ml of complete RPMI 1640 medium.

3.3) Incubate PBMC in the presence of 10  $\mu\text{l}$  of genetically engineered endonuclease

from *Serratia marcescens* for 5 minutes at room temperature.

3.4) Remove a 50  $\mu$ l aliquot of PBMC and mix with 50  $\mu$ l of trypan blue dye. Count cells and estimate % viability using a haemocytometer and microscopic examination (dye exclusion method). Various automated methods for cell counting and assessment of cell viability can also be used. PBMC should be >95% viable. Discard sample when viability is lower than 95%.

3.5) Centrifuge PBMC at 700 x g for 5 minutes, discard supernatant, and resuspend cells in AIM-V medium supplemented with 2% v/v inactivated human serum (IHS) at a final concentration of  $2 \times 10^6$  cells/ml. Keep at 37 °C until stimulation mixtures are added to the plate.

3.6) Add to the wells, one drop at a time, 100  $\mu$ l of the appropriate stimulation mixture.

Three stimulation mixtures should be used as described below:

3.6.1) Use AIM-V medium supplemented with 2% v/v inactivated human serum (IHS) as negative control.

3.6.2) Use anti-CD3 monoclonal antibody (clone OKT3) diluted in AIM-V medium supplemented with 2% v/v IHS to a final concentration of 0.5  $\mu$ g/ml as positive control).

3.6.3) Use VZV antigen, in the form of either  $\gamma$ -irradiated (100,000 Gy; 30 minutes exposure time) live attenuated VZV vaccine (1,350 plaque-forming units [PFU]/ml) diluted 1/200 in AIM-V medium supplemented with 2% v/v IHS) or 1  $\mu$ g of an equimolar mixture of 67 peptides (15 amino acid residues) synthesized based on the sequence of the VZV immediately early (IE63) phosphoprotein. Control irradiation efficacy by monitoring the absence of visible signs of cytopathic effects after 4 days in PBMC

cultures.

3.6.4) Prepare all wells in duplicate.

3.7) Add to the wells, one drop at a time, 100  $\mu$ l of cells prepared in step 5.4 to the appropriate wells. Two wells should be left without cells (negative control). Incubate for 20 hours at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in a water jacket incubator. Do not shake, move, or stack the plates on top of one another during incubation.

#### **4. Spot Development and Detection**

4.1) Discard the cells and wash the plates 10 times with 1X PBS supplemented with 0.05% v/v Tween 20 (PBST). Tween 20 helps detach cells that have adhered to the PVDF membrane following overnight incubation.

4.2) Using a multichannel pipette, add 100  $\mu$ l of 0.5 mg/ml biotin-conjugated anti-IFN- $\gamma$  monoclonal antibody (4S.B3 clone) diluted in 1X PBS containing 0.5% w/v bovine serum albumin (BSA). Incubate plates for 2 hours at room temperature.

4.3) Wash the wells 6 times with PBST and add each well 100  $\mu$ l of streptavidin conjugated with alkaline phosphatase diluted 1:1000 in 1X PBS containing 0.5% w/v BSA. Cover the plates and incubate for 1 hour at room temperature.

4.4) Wash the plates 3 times with PBST and 3 times with 1X PBS. Add 100  $\mu$ l of a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)/nitro blue tetrazolium chloride (NBT) substrate solution and incubate 5 minutes at room temperature.

4.5) Wash the plates under running distilled water. Remove the bottom section of the ELISpot plate and wash both sides of the membrane with distilled water. Air-dry the plates.



4.6) Examine the wells and enumerate the spots using a stereoscopic dissection microscope or scan the plates using an automated spot counter. Keep the plates away from light if they cannot be examined on the same day.

4.6.1) Average the numbers of spots counted in corresponding duplicate wells and subtract the number of spots counted in the negative control wells (no cells) from the number of spots counted in the test wells.

4.6.2) Express IFN- $\gamma$  production as the number of spot-forming units (SFU) per  $10^6$  PBMC.

4.6.3) Consider that test samples are positive if the number of SFU is  $>50$  per  $10^6$  PBMC and 2 standard deviations (SD) above the negative control (cells + AIM-V medium supplemented with 2% v/v IHS).

4.6.4) Use a value of 400 SFU per well when spots are too numerous to be counted.

4.7) Test whether ELISpot data are normally distributed or not using the Kolmogorov-Smirnov test. When data are normally distributed, perform statistical comparisons using Student's  $t$  test (2 groups) or ANOVA and the Bonferroni post-test (multiple comparisons). If data are not normally distributed, use the Mann-Whitney  $U$  test (2 groups) or the Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test (multiple comparisons).

## **2.5 Representative Results**

The IFN- $\gamma$  ELISpot protocol detailed above was developed and optimized in our laboratory to measure the magnitude and the quality of cell-mediated immune responses directed against VZV<sup>4</sup>. Diverse sources of VZV antigen can be used for the stimulation

step. These include: a) commercially-available detergent-inactivated extracts from VZV-infected Vero cells<sup>18</sup>; b) pools of overlapping synthetic peptides from specific VZV-encoded proteins, including IE63<sup>15</sup> and ORF4<sup>19</sup>; c) live attenuated varicella zoster vaccine<sup>20</sup>; and d) UV-inactivated preparations of VZV antigens from the supernatant of disrupted VZV-infected MRC-cells<sup>14</sup>. In our case, dilutions of live attenuated VZV vaccine were preferred over cell culture-derived VZV in order to insure uniformity in antigen source and preparation and to limit culture and manipulation of live wild-type VZV strains in a clinical setting where nosocomial transmission is a serious concern<sup>10</sup>. In addition,  $\gamma$  irradiation was preferred over UV inactivation<sup>21</sup> because of the comparative precision with which doses of  $\gamma$  radiation can be delivered and because, unlike UV,  $\gamma$  rays efficiently penetrate sealed VZV-containing vials. Irradiation of viral stocks led to consistently higher estimates of the frequency of VZV-specific IFN- $\gamma$ -producing cells in PBMC samples obtained from a healthy donor at all dilutions of VZV antigen tested (**Figure 1**). This is possibly the result of the mitigation of cytopathic effects induced by live attenuated VZV in cell culture.

To determine which dilution VZV antigen yielded maximal readouts in terms of numbers of SFU per  $10^6$  PBMC, IFN- $\gamma$  ELISpot was performed using two-fold dilutions of  $\gamma$ -irradiated live-attenuated VZV vaccine and PBMC samples obtained from a group of immunocompetent children aged between 9 months and 12 years who had a documented history of varicella and/or a positive serology for VZV (n = 50). Study subjects were enrolled at the Infectious Diseases Clinic and Special Immunology Clinic of CHU Sainte-Justine between June 2007 and September 2009. Statistically significant differences were observed between median frequencies of IFN- $\gamma$ -producing cells that were obtained using

the 1:200, 1:400 and 1:800 dilutions of VZV antigen ( $p < 0.0001$ , Kruskal-Wallis test) (Figure 2). These disparities were accounted for by the difference between the 1:200 dilution (median = 115.0 SFU per  $10^6$  PBMC; interquartile range [IQR] = 75.0 - 232.5 SFU per  $10^6$  PBMC) and the 1:800 dilution (median = 50.0 SFU per  $10^6$  PBMC; IQR = 20.0 - 105.0 SFU per  $10^6$  PBMC), and between the 1:400 dilution (median = 92.5 SFU per  $10^6$  PBMC; IQR = 52.5 - 177.5 SFU per  $10^6$  PBMC) and the 1:800 dilution ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively, Dunn's multiple comparisons test) (**Figure 2**). For this reason, the 1:200 dilution of  $\gamma$ -irradiated live-attenuated VZV vaccine was selected for use in routine measurements of VZV-specific cell-mediated immune responses.

To determine whether IFN- $\gamma$  production resides in CD4<sup>+</sup> and/or CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subsets, PBMC samples obtained from a healthy donor were subjected to depletion of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells using anti-CD4 or anti-CD8 antibody-coupled magnetic beads according to the manufacturer's instruction. In concordance with previously-published reports<sup>22,23</sup>, depletion of CD4<sup>+</sup> cells resulted in a striking reduction in the frequencies of IFN- $\gamma$ -producing cells that were obtained using the 1:100, 1:200 and 1:400 dilutions of VZV antigen, while depletion of CD8<sup>+</sup> cells did not lead to such a reduction and positive controls (stimulation with anti-CD3 monoclonal antibody) were not similarly affected (**Figure 3**). These results suggest that the majority of cells that produce IFN- $\gamma$  in response to stimulation with VZV antigens are CD4<sup>+</sup> T cells. Alternatively, these results could stem from depletion of CD4<sup>+</sup> antigen-presenting cells (*i.e.* monocytes, dendritic cells) from the PBMC pool, leading to reduced levels of presentation of VZV antigens to responder CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. The use of irradiated VZV is unlikely to have contributed to the skewing of the response towards CD4 dominance, as similar results

were obtained by other groups using different techniques and antigen sources<sup>14,21,22</sup>. A low magnification micrograph of representative ELISpot wells is presented in **Figure 4**.

## 2.6 Discussion

Modifications and troubleshooting: IFN- $\gamma$  ELISpot assays have been used to examine cell-mediated immune responses directed against a variety of microbial pathogens, including human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)<sup>24,25</sup>, hepatitis C virus (HCV)<sup>26,27</sup>, and *Mycobacterium tuberculosis*<sup>28,29</sup>, just to name a few. Here we described the development of an IFN- $\gamma$  ELISpot assay to measure cellular immunity against, with the hope of defining correlates of VZV-specific immune reconstitution in recovering pediatric UCBT recipients.

Key characteristics of this assay are fourfold. First, it does not require prior *in vitro* expansion of T cells, which is time consuming. Second, it can be performed using cryopreserved PBMC samples, which is best to minimize inter-assay variability. In addition, cryopreservation and parallel processing are well-adapted to longitudinal studies, which require that samples be processed in batches. Third, to prevent cell clumping encountered during thawing of PBMC, treatment with an ultrapure genetically engineered endonuclease from *Serratia marcescens* was used. Cell clumping upon thawing PBMC occurs more frequently when using blood samples that are left overnight at room temperature before processing. The incorporation of genetically engineered endonuclease from *Serratia marcescens* is known not to affect cell viability, expression of cell surface markers and response to stimulation with cognate antigen in terms of SFU since low levels of nuclease are used and the duration of exposure is short<sup>22</sup>. Fourth,  $\gamma$ -irradiated

live attenuated VZV vaccine was used to stimulate PBMC. It was preferred over cell culture-derived VZV in order to insure uniformity in antigen dose and preparation and to overcome the need for manipulating live VZV in a clinical setting where the safety of patients and laboratory personnel is a major concern. Taken together, the modifications that were introduced in the VZV-ELISpot assay were intended to make it better adapted for use in a clinical environment.

Limitations of the technique significance with respect to existing methods: Straightforward, sensitive and reproducible methods are required in order to measure host cell-mediated immune responses directed against microbial antigens in the context of clinical follow-up. IFN- $\gamma$  ELISpot is a robust, reproducible and informative assay that can be performed on venous blood samples using relatively low-tech equipment (centrifuges, incubators, dissection microscope). However, it does not readily permit the simultaneous detection of multiple cytokines and cell-surface markers. Traditional *in vitro* T cell proliferation assays, which have classically been used for the enumeration of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> antigen-specific T cell responses, are labor-intensive, lack sensitivity and tend to suffer from a high degree of inter-assay variability<sup>30,31</sup>. On the other hand, cytotoxic T lymphocyte assays (CTL) based on the lysis of autologous targets loaded with <sup>51</sup>Cr and limiting dilution analysis tend to depend on time-consuming *in vitro* expansion steps to quantify antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells that are present at a low precursor frequencies<sup>32,33</sup>. Flow cytometry-based assays that measure cytokine secretion following antigenic stimulation (intracellular cytokine staining [ICS])<sup>34,35</sup> can also be used to characterize antigen-specific immune responses. ICS permits the simultaneous detection of cytokine production and cell-surface expression of phenotypic markers in single cells. The

sensitivity of ICS compares to that of ELISpot, but it requires larger numbers of cells<sup>36,37</sup>. Methods that make use of fluorescent class-I or class-II peptide-major histocompatibility complex (pMHC) oligomers (pMHC tetramers)<sup>38-40</sup> are precise and enable multi-parametric characterization of lymphocyte subsets based on expression of cell surface markers. However, pMHC tetramer staining requires prior knowledge of the patients' human leukocyte antigen (HLA) type, which can be cumbersome and limit patient enrolment into a given study. Another limitation of this technique is that pMHC tetramer staining primarily allows the detection of T cells expressing medium to high affinity T cell receptors (TCR)<sup>41</sup>. On the other hand, CD8<sup>+</sup> T cells expressing low affinity TCRs that are not stained by pMHC tetramers can be readily detected using IFN- $\gamma$  ELISpot<sup>41</sup>. In addition, pMHC tetramers can bind to so-called exhausted CD8<sup>+</sup> T lymphocytes that are prevalent in chronic viral infections<sup>42,43</sup>, thereby skewing the functional assessment of antigen-specific cell-mediated immune responses. Finally, pMHC tetramer staining and ICS typically require highly trained personnel, comparatively expensive reagents, sophisticated instruments, and dedicated facilities, making these techniques notoriously difficult to implement in a clinical follow-up setting.

Future applications: Dual-color ELISpot assays capable of simultaneously detecting the production of both IFN- $\gamma$  and IL-2<sup>44</sup> and dual- and triple-color fluorospot methods<sup>45</sup> have generated significant interest, as they allow the assessment of the polyfunctionality of antigen-specific T lymphocytes, which is an important feature of efficient cell-mediated immune responses<sup>46</sup>.

Critical steps within the protocol: Additional technical issues must be given careful consideration. Because many variables might affect spot quality (*i.e.* size and density) and number, adherence to the protocol is essential to achieve sensitive and reproducible results. The consistent use of specific brands of monoclonal antibodies (capture and detection), ELISpot plates with PVDF membranes, and 35% ethanol for membrane treatment prior to coating is of high importance. For example, over-treatment with ethanol can affect the performance of the assay and spot quality. To prevent obtaining uninformative wells (*i.e.* >300 spots), we recommend using no more than  $2 \times 10^5$  PBMC per well. When faced with low frequencies of antigen-specific T cells, assay sensitivity can be enhanced by pre-stimulating cells *in vitro* with cognate antigen or expand them with polyclonal activators such as phytohemagglutinin (PHA) for a defined period of time (typically 3-7 days)<sup>38</sup>. However, the final optimized procedure for the VZV ELISpot assay presented herein does not include *in vitro* pre-stimulation and/or expansion steps. Number and quality of spots were similar over an incubation range of 16 hours to 21 hours. Beyond 21 hours of incubation, spots were often more diffuse and sometimes overlapped, making their enumeration more difficult. Moreover, moving the plates while the cells are incubating can lead to poorly-defined snail trail spots that are likewise more difficult to count. Additional troubleshooting cues are provided in Table 1.

When using an automated spot counter, sensitivity and spot size gating are set using positive control (anti-CD3 monoclonal antibody) and negative control (AIM-V medium supplemented with 2% v/v IHS). The important characteristics to consider during spot enumeration are size and shape (**Figure 4**). The former allows one to distinguish T cell-derived cytokine spots from background spots that should be ignored. Spot number

provides an estimate of the frequency of VZV-specific T cells present in a given PBMC sample, while spot size reflects how much IFN- $\gamma$  is produced by each individual cells.

To our knowledge, this is the only IFN- $\gamma$  ELISpot method that makes use of  $\gamma$ -irradiated live attenuated VZV vaccine as antigen<sup>4</sup>. Panels of overlapping synthetic peptides (15-mers) have also been used as antigen, including mixture of peptides based on the amino-acid sequence of the VZV IE63 phosphoprotein. IE63 is highly immunogenic<sup>47</sup> and appears to be crucial for viral infectivity and the establishment of latency<sup>48</sup>. IE63-specific T cells have been detected in healthy VZV-seropositive donors<sup>15</sup>, which suggests that IE63 is an important target of cell-mediated immunity directed against VZV. However, reactive cells were found to be largely CD4<sup>+</sup> T cells<sup>15</sup>.

The VZV-IFN- $\gamma$  ELISpot assay was previously used by our group to assess the VZV-specific T cell responses in 28 children who underwent UCBT to treat neoplastic or inherited blood disorders<sup>4</sup>. Results that were obtained during the course of this study suggested that both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets were implicated in IFN- $\gamma$  production and that reconstitution of the naive CD8<sup>+</sup> T cell compartment led to more robust VZV-specific cell-mediated immune responses in terms of IFN- $\gamma$  production. Importantly, these results also showed that the detection of more than 150 SFU per 10<sup>6</sup> PBMC was consistent with T cell-mediated protection against VZV infection or reactivation<sup>4</sup>. However, this threshold value for VZV-specific cell-mediated immunity in the context of UCBT and ensuing immune reconstitution or lack thereof will have to be validated in larger prospective multicenter studies.



## 2.7 Acknowledgements

The authors wish to thank study participants and their parents. We would also like to thank Dr. Réjean Lapointe (CHUM Notre-Dame, Montreal, Canada) for access to his ELISpot reader, Dr. Lubo Alexandrov for statistical analysis, and Denis Blais, Sandra Caron, Silvie Valois and Martine Caty for expert technical assistance. Supported by grants from le Fonds d'opération pour les projets de recherche clinique et d'évaluation des technologies (CHU Sainte-Justine) to H.S. and P.O., by la Fondation Centre de cancérologie Charles-Bruneau, and by the Leukemia & Lymphoma Society of Canada. I.S.F. was supported by scholarships from la Fondation CHU Sainte-Justine and le Fonds de la recherche du Québec-santé (FRQS). A.J.G. was the recipient of scholarships from the Department of Microbiology, Infectiology & Immunology, Université de Montréal (Gabriel-Marquis Scholarship), FRQS, and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). N.M. was supported by la Fondation CHU Sainte-Justine, the Cole Foundation, and FRQS.

**Disclosures:** The authors declare that they have no competing financial interests.

## 2.8 References

1. Ballen, K.K., Gluckman, E. & Broxmeyer, H.E. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*. **122**(4), 491-498, doi: 10.1182/blood-2013-02-453175 (2013).
2. Vandenbosch, K., Ovetchkine, P., Champagne, M.A., Haddad, E., Alexandrov, L. & Duval, M. Varicella-zoster virus disease is more frequent after cord blood than after bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant*. **14**(8), 867-871, doi: 10.1016/j.bbmt.2008.05.006 (2008).

3. Barker, J.N., *et al.* Serious infections after unrelated donor transplantation in 136 children: impact of stem cell source. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **11**(5), 362-370, doi:10.1016/j.bbmt.2005.02.004 (2005).
4. Merindol, N., *et al.* Reconstitution of protective immune responses against cytomegalovirus and varicella zoster virus does not require disease development in pediatric recipients of umbilical cord blood transplantation. *J. Immunol.* **189**(10), 5016-5028, doi: 10.4049/jimmunol.1201759 (2012).
5. Feldman, S., Hughes, W.T. & Daniel, C.B. Varicella in children with cancer: Seventy-seven cases. *Pediatrics.* **56**(3), 388-397 (1975).
6. Arvin, A.M. Varicella-Zoster virus: pathogenesis, immunity, and clinical management in hematopoietic cell transplant recipients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **6**(3), 219-230, doi: 10.1016/S1083-8791(00)70004-8 (2000).
7. Wiegering, V., *et al.* Varicella-zoster virus infections in immunocompromised patients - a single centre 6-years analysis. *BMC Pediatr.* **11**, 31, doi: 10.1186/1471-2431-11-31 (2011).
8. Boeckh, M., Kim, H.W., Flowers, M.E., Meyers, J.D. & Bowden, R.A. Long-term acyclovir for prevention of varicella zoster virus disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation--a randomized double-blind placebo-controlled study. *Blood.* **107**(5), 1800-1805, doi: 10.1182/blood-2005-09-3624 (2006).
9. Boeckh, M. Prevention of VZV infection in immunosuppressed patients using antiviral agents. *Herpes.* **13**(3), 60-65 (2006).
10. Tomblyn, M., *et al.* Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **15**(10), 1143-1238, doi: 10.1016/j.bbmt.2009.06.019 (2009).
11. Ljungman, P., *et al.* Long-term acyclovir prophylaxis in bone marrow transplant recipients and lymphocyte proliferation responses to herpes virus antigens *in vitro*. *Bone Marrow Transplant.* **1**(2), 185-192 (1986).
12. Selby, P.J., *et al.* The prophylactic role of intravenous and long-term oral acyclovir after allogeneic bone marrow transplantation. *Br. J. Cancer.* **59**(3), 434-438 (1989).
13. Distler, 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.* **14**(12), 1417-1424, doi: 10.1016/j.bbmt.2008.09.004 (2008).
14. Levin, M.J., *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.* **188**(9), 1336-1344, doi: 10.1086/379048 (2003).

15. Jones, L., Black, A.P., Malavige, G.N. & Ogg, G.S. Phenotypic analysis of human CD4<sup>+</sup> T cells specific for immediate-early 63 protein of varicella-zoster virus. *Eur. J. Immunol.* **37**(12), 3393-3403, doi: 10.1002/eji.200737648 (2007).
16. Czerkinsky, C., Andersson, G., Ekre, H.P., Nilsson, L.A., Klareskog, L. & Ouchterlony, O. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J. Immunol. Methods.* **110**(1), 29-36, doi: 10.1016/0022-1759(88)90079-8 (1988).
17. Hutchings, P.R., Cambridge, G., Tite, J.P., Meager, T. & Cooke, A. The detection and enumeration of cytokine-secreting cells in mice and man and the clinical application of these assays. *J. Immunol. Methods.* **120**(1), 1-8, doi: 10.1016/0022-1759(89)90281-0 (1989).
18. De Castro, N., Carmagnat, M., Kernéis, S., Scieux, C., Rabian, C. & Molina, J.M. Varicella-zoster virus-specific cell-mediated immune responses in HIV-infected adults. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **27**(10), 1089-1097, doi: 10.1089/aid.2010.0340 (2011).
19. Jones, L., Black, A.P., Malavige, G.N. & Ogg, G.S. Persistent high frequencies of varicella-zoster virus ORF4 protein-specific CD4<sup>+</sup> T cells after primary infection. *J. Virol.* **80**(19), 9772-9778, doi: 10.1128/JVI.00564-06 (2006).
20. Malavige, G.N., *et al.* Viral load, clinical disease severity and cellular immune responses in primary varicella zoster virus infection in Sri Lanka. *PLoS One.* **3**(11), e3789, doi: 10.1371/journal.pone.0003789 (2008).
21. Sadaoka, K., *et al.* Measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity: comparison between VZV skin test and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay. *J. Infect. Dis.* **198**(9), 1327-1333, doi: 10.1086/592219 (2008).
22. Smith, J.G., Liu, X., Kaufhold, R.M., Clair, J. & Caulfield, M.J. Development and validation of a gamma interferon ELISPOT assay for quantitation of cellular immune responses to varicella-zoster virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**(5), 871-879, doi: 10.1128/CDLI.8.5.871-879.2001 (2001).
23. Ouwendijk, W.J., Laing, K.J., Verjans, G.M. & Koelle, D.M. T-cell immunity to human alphaherpesviruses. *Curr. Opin. Virol.* [Epub ahead of print] (2013).
24. Rowland-Jones, S.L., *et al.* Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *J. Clin. Invest.* **102**(9), 1758-1765, doi: 10.1172/JCI4314 (1998).
25. Alter, G., *et al.* Human immunodeficiency virus (HIV)-specific effector CD8 T cell activity in patients with primary HIV infection. *J. Infect. Dis.* **185**(6): 755-765, doi: 10.1086/339338 (2002).

26. Lechner, F., *et al.* Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J. Exp. Med.* **191**(9), 1499-1512, doi: 10.1084/jem.191.9.1499 (2000).
27. Fournillier, A., *et al.* A heterologous prime/boost vaccination strategy enhances the immunogenicity of therapeutic vaccines for hepatitis C virus. *J. Infect. Dis.* **208**(6), 1008-1019, doi: 10.1093/infdis/jit267 (2013).
28. Adetifa, I.M., *et al.* Interferon- $\gamma$  ELISPOT as a biomarker of treatment efficacy in latent tuberculosis infection: a clinical trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**(4), 439-445, doi: 10.1164/rccm.201208-1352OC (2013).
29. Lalvani, A. & Pareek, M. A 100 year update on diagnosis of tuberculosis infection. *Br. Med. Bull.* **93**, 69-84, doi: 10.1093/bmb/ldp039 (2010).
30. Berger, R., *et al.* A dose-response study of a live attenuated varicella-zoster virus (Oka strain) vaccine administered to adults 55 years of age and older. *J. Infect. Dis.* **178** Suppl. 1, S99-103, doi: 10.1086/514265 (1998).
31. Trannoy, E. *et al.* Vaccination of immunocompetent elderly subjects with a live attenuated Oka strain of varicella zoster virus: a randomized, controlled, dose-response trial. *Vaccine.* **18**(16), 1700-1706, doi: 10.1016/S0264-410X(99)00510-1 (2000).
32. Brunner, K.T., Mael, J., Cerottini, J.C. & 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.* **14**(2), 181-196 (1968).
33. Moretta, A., Pantaleo, G., Moretta, L., Cerottini, J.C. & Mingari, M.C. Quantitative assessment of the pool size and subset distribution of cytolytic T lymphocytes within human resting or alloactivated peripheral blood T cell populations. *J. Exp. Med.* **158**(2), 571-585, doi: 10.1084/jem.158.2.571 (1983).
34. Jung, T., Schauer, U., Heusser, C., Neumann, C. & Rieger, C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* **159**(1-2), 197-207, doi: 10.1016/0022-1759(93)90158-4 (1993).
35. Maecker, H.T., *et al.* Standardization of cytokine flow cytometry assays. *BMC Immunol.* **6**, 13 (2005).
36. Nomura, L., Maino, V.C. & Maecker, H.T. Standardization and optimization of multiparameter intracellular cytokine staining. *Cytometry A.* **73**(11), 984-991, doi: 10.1002/cyto.a.20602 (2008).
37. Letsch, A. & Scheibenbogen, C. Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining. *Methods.* **31**(2), 143-149, doi: 10.1016/S1046-2023(03)00124-5 (2003).

38. Merindol, N., *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.* **185**(2), 856-866, doi: 10.4049/jimmunol.0902613 (2010).
39. Altman, J.D., *et al.* Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science.* **274**(5284), 94-96, doi: 10.1126/science.274.5284.94 (1996).
40. Scriba, T.J., *et al.* Ultrasensitive detection and phenotyping of CD4<sup>+</sup> T cells with optimized HLA class II tetramer staining. *J. Immunol.* **175**(10), 6334-6343 (2005).
41. Stone, J.D., *et al.* Interaction of streptavidin-based peptide-MHC oligomers (tetramers) with cell-surface TCRs. *J. Immunol.* **187**(12), 6281-6290, doi: 10.4049/jimmunol.1101734 (2011).
42. Pantaleo, G., *et al.* Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell clones during primary HIV infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **94**(18), 9848-9853, doi: 10.1073/pnas.94.18.9848 (1997).
43. Wherry, E.J. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **12**(6), 492-499, doi: 10.1038/ni.2035 (2011).
44. Boulet, S. *et al.* A dual color ELISPOT method for the simultaneous detection of IL-2 and IFN- $\gamma$  HIV-specific immune responses. *J. Immunol. Methods.* **320**(1-2), 18-29, doi: 10.1016/j.jim.2006.11.010 (2007).
45. Ahlborg, N. & Axelsson, B. Dual- and triple-color fluorospot. *Methods Mol. Biol.* **792**, 77-85, doi: 10.1007/978-1-61779-325-7\_6 (2012).
46. Precopio, M.L. *et al.* Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J. Exp. Med.* **204**(6), 405-1416, doi: 10.1084/jem.20062363 (2007).
47. Sadzot-Delvaux, C., Kinchington, P.R., Debrus, S., Rentier, B. & Arvin, A.M. Recognition of the latency-associated immediate early protein IE63 of varicella-zoster virus by human memory T lymphocytes. *J. Immunol.* **159**(6), 2802-2806 (1997).
48. Malavige, G.N. *et al.* IE63-specific T-cell responses associate with control of subclinical varicella zoster virus reactivation in individuals with malignancies. *Br. J. Cancer.* **102**(4), 727-730, doi: 10.1038/sj.bjc.6605542 (2010).

## 2.9 Tables and Figures

### Table 2.1 Additional troubleshooting.

**Figure 2.1 Effect of  $\gamma$ -irradiation of live inactivated VZV vaccine on the frequency of IFN- $\gamma$ -producing cells as determined using IFN- $\gamma$  ELISpot.** VZV-specific IFN- $\gamma$  ELISpot was performed as described under Protocol Text using PBMC from a control volunteer and serial dilutions of  $\gamma$ -irradiated (10,000 Gy) live attenuated VZV vaccine as antigen. Data represent the mean of duplicate measurements and error bars represent the standard error of the mean. PBMC: peripheral blood mononuclear cells; SFU: spot-forming units; VZV: varicella-zoster virus.

**Figure 2.2 Quantification of VZV-specific cell-mediated immune responses in children with documented evidence of previous infection with VZV.** VZV-specific IFN- $\gamma$  ELISpot was performed as described under Protocol Text using PBMC isolated from subjects with a history of varicella (n = 50) and serial dilutions of  $\gamma$ -irradiated (10,000 Gy) live attenuated VZV vaccine as antigen. Horizontal lines represent the median, boxes represent interquartile range (IQR), and whiskers represent the range of values. PBMC: peripheral blood mononuclear cells; SFU: spot-forming units; VZV: varicella-zoster virus.

**Figure 2.3 Effect of depletion of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells on the frequency of IFN- $\gamma$ -producing cells as measured using IFN- $\gamma$  ELISpot.** Depletion of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells and VZV-specific IFN- $\gamma$  ELISpot were performed as described under Protocol Text using PBMC from a control volunteer and serial dilutions of  $\gamma$ -irradiated (10,000 Gy) live attenuated VZV vaccine as antigen. Data represent the mean of duplicate measurements

and error bars represent the standard error of the mean. PBMC: peripheral blood mononuclear cells; SFU: spot-forming units; VZV: varicella-zoster virus.

**Figure 2.4 Representative ELISpot wells.** VZV-specific IFN- $\gamma$  ELISpot was performed as described under Protocol Text using PBMC from five control volunteers and serial dilutions of  $\gamma$ -irradiated (10,000 Gy) live attenuated VZV vaccine as antigen. First row: negative controls (AIM-V medium supplemented with 2% v/v IHS); second row: positive controls (anti-CD3 monoclonal antibody); third row: VZV antigen. Numbers in the upper corners represent SFU per well as measured using an automated spot counter. PBMC: peripheral blood mononuclear cells; SFU: spot-forming units; VZV: varicella-zoster virus; IHS: inactivated human serum.

**Tableau 2 1 Additional troubleshooting**

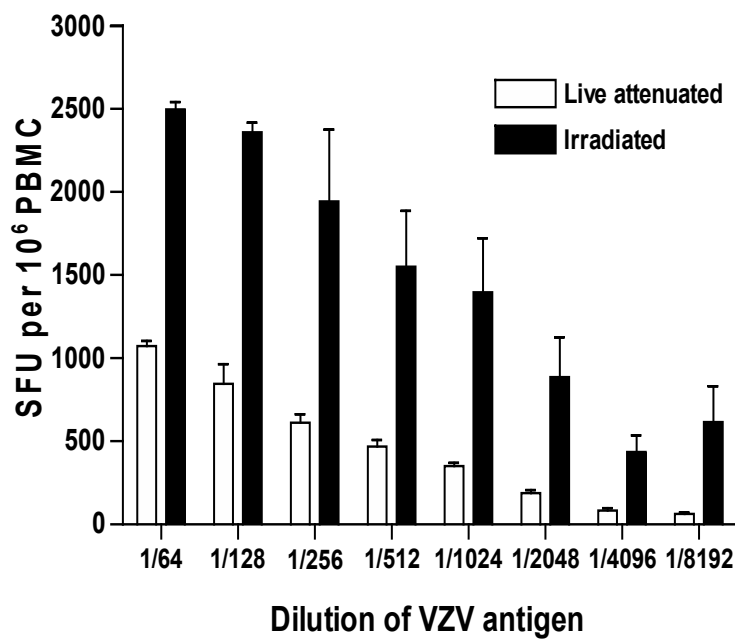
High background/Poorly-defined or confluent spots	High numbers of dead cells.	Assess cell viability before culture set-up and stimulation.
	Inadequate membrane pre-wetting steps.	Make sure to respect pre-wetting time and that membrane turn to gray after 1 min. 35%ethanol should be prepared immediately before use.
	Plates moved during the incubation period.	Do not move plates to avoid poorly-defined snail trail spots.
	Wash steps.	Manual wash is more efficient than plate washers.
	Formation of protein aggregates.	Filter both capture and detection antibodies to reduce background and false positive spots.
	Secondary and detection antibody concentration.	Adjust biotinylated secondary/detection antibody concentration to reduce background.
	Cold developing reagents.	Bring substrate to room temperature to avoid underdevelopment.
No spots/Blank wells	Poorly defined spots.	Do not stack plates during incubation period to have a homogeneous temperature in the different wells.
	Stimulation substrate not well prepared.	Bring the peptide mixture aliquot to room temperature for 15 min to avoid crystal formation.
	Cell clumping.	Resuspend cells into single-cell suspension to avoid underestimation of spot-forming units.
	Cells not stimulated appropriately.	Use a polyclonal activator as a positive control.
	Inhibition of enzyme reaction by tween-20.	Wash plates with PBS before adding BCIP/NBT substrate solution.



	Wrong antibody pairs.	Make sure that the capture and detection antibodies react with different antigenic epitopes.
--	-----------------------	--

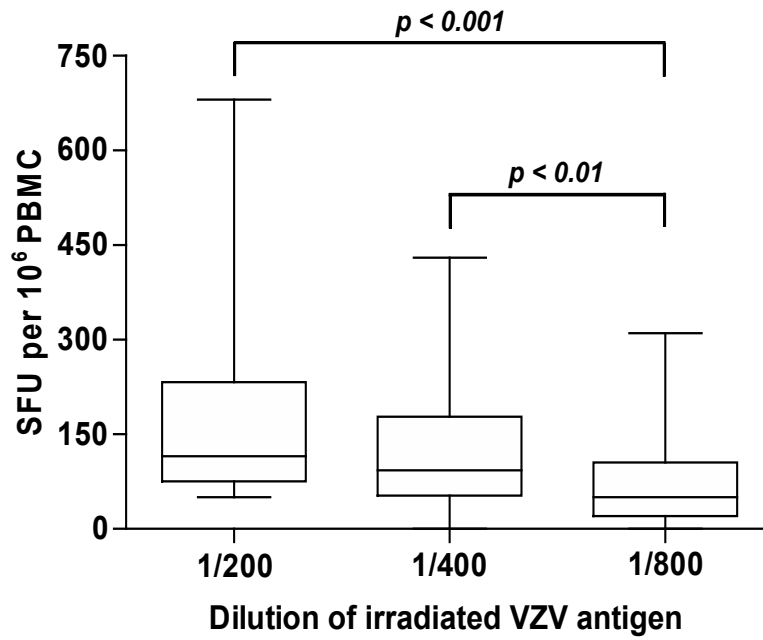
*Figure 2. 1 Effect of  $\gamma$ irradiation of live inactivated VZV vaccine on the frequency of IFN- $\gamma$ producing cells as determined using IFN- $\gamma$ ELISpot*

**Figure 1. Salem Fourati et al.**



*Figure 2. 2 Quantification of VZV-specific cell-mediated immune responses in children with documented evidence of previous infection with VZV*

**Figure 2. Salem Fourati et al.**



*Figure 2. 3 Effect of depletion of CD4+ or CD8+ cells on the frequency of IFN- $\gamma$  producing cells as measured using IFN- $\gamma$ ELISpot*

**Figure 3. Salem Fourati et al.**

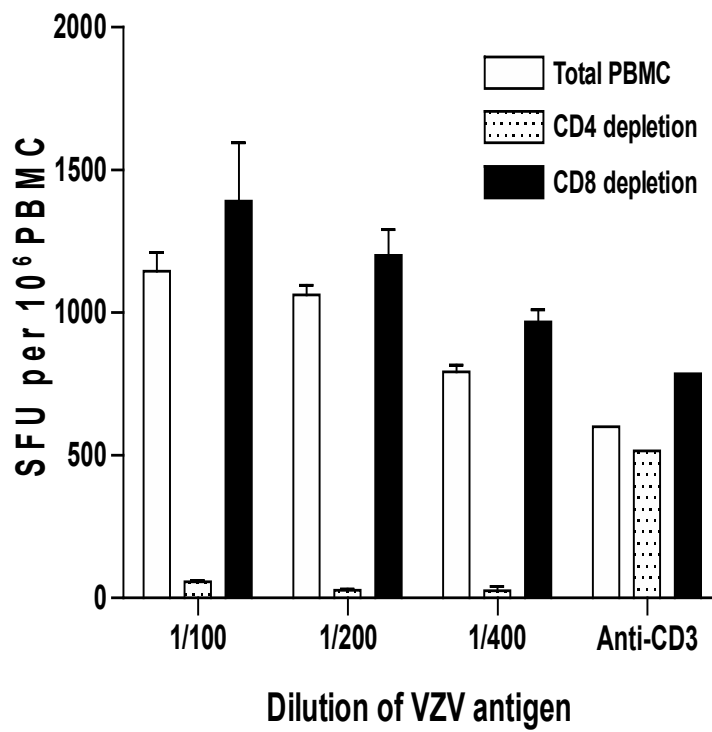
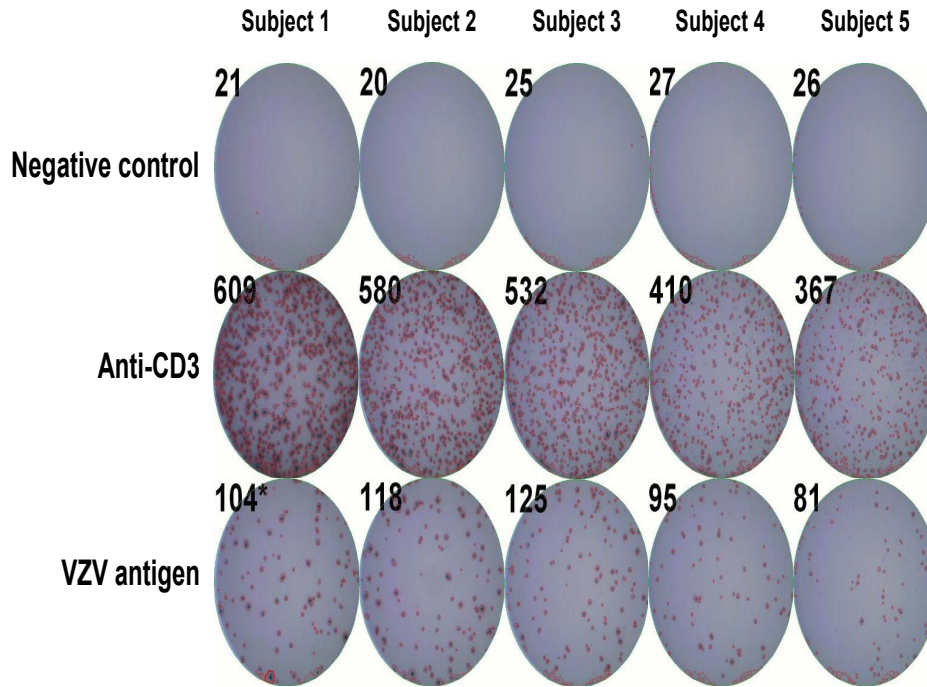


Figure 2. 4 Representative ELISpot wells

Figure 4. Salem Fourati et al.



## **Chapitre 3 Deuxième article**

### 3.1 Mise en contexte et contribution au deuxième article

Nous avons développé et validé un test ELISpot-VZV-IFN- $\gamma$  permettant de suivre la reconstitution de l'immunité cellulaire anti-VZV chez les receveurs de TSCO, laquelle demeure à ce jour mal caractérisée. Il est donc important de répondre à des questions de fond concernant : *i*) la reconstitution immunitaire antivirale suite à la TSCO, *ii*) le pouvoir à la fois fonctionnel et protecteur des lymphocytes T antigène-spécifiques issus de voie thymus-indépendante et thymus dépendante, *iii*) les facteurs cliniques et virologiques influençant le développement de telle réponses. Constituant l'une des causes majeures de morbidité et de mortalité chez les receveurs de TSCO, les réponses des lymphocytes T spécifiques à CMV seront également étudiées.

Ma contribution à l'article est évaluée à 40% et consiste en la réalisation de 20% des ELISpots pour CMV et 50% de ceux pour VZV (Figure 3.2, Figure 3.3, Figure 3.5, Figure 3.6), l'analyse des résultats se rapportant aux réponses IFN- $\gamma$  détectées par ELISpot, la participation à la collecte des données cliniques (Tableau 3.1), la participation à la révision de l'article avant et après soumission au *Journal of Immunology*.

**Reconstitution of protective immune responses against CMV and VZV does not require disease development in paediatric recipients of umbilical cord blood transplantation<sup>1</sup>**

**Running title:** Reconstitution of CMV- and VZV-specific responses.

Natacha Merindol<sup>\*†‡</sup>, Insaf Salem Fourati<sup>\*†‡</sup>, Rose-Marie Brito<sup>†§</sup>, Anne-Julie Grenier<sup>\*†‡</sup>, Emily Charrier<sup>†¶||</sup>, Paulo Cordeiro<sup>†¶</sup>, Martine Caty<sup>\*</sup>, Samira Mezziani<sup>†#</sup>, Brigitte Malette<sup>‡§</sup>, Michel Duval<sup>†¶###</sup>, Carolina Alfieri<sup>†‡</sup>, Philippe Ovetckine<sup>†\*\*\*†</sup>, Françoise Le Deist<sup>†‡§\*\*</sup>, and Hugo Soudeyns<sup>\*†‡\*\*</sup>.

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

*Status: published in Journal of immunology: J Immunol. 2012 Nov 15;189(10):5016-28*

### 3.2 Abstract

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 were assessed using IFN- $\gamma$  ELISPOT in 28 children who underwent UCBT to treat haematological or inherited disorders. Barely detectable in the first 3 mo post-transplantation, CMV- and VZV-specific T cell responses were observed in 30.4% and 40.3% of study subjects after 36 mo of follow-up. Four of 5 CMV-seropositive subjects developed CMV DNAemia, and 5 of 17 VZV-seropositive patients experienced herpes zoster during the post-transplant period. Four CMV-seronegative subjects developed IFN- $\gamma$  responses against CMV, and 4 subjects developed a VZV-specific IFN- $\gamma$  response without clinical signs of infection. No CMV- or VZV-related events were observed in study subjects following the development of CMV- or VZV-specific responses  $>150$  spot-forming units (SFU) per  $10^6$  peripheral blood mononuclear cells, consistent with T cell-mediated protection. Finally, 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 2 non-zoster subjects. Monitoring of CMV- and VZV-specific cell-mediated immunity could inform immunocompetence and guide initiation and cessation of antiherpetic prophylaxis in UCBT recipients.



### 3.3 Introduction

As an alternative to unrelated bone marrow (BM) transplantation (BMT), umbilical cord blood (UCB) transplantation (UCBT) has been used for over two decades to treat paediatric patients suffering from various haematological disorders. T lymphocytes contained in UCB exhibit similar subset distribution as those found in adult peripheral blood. However, they display a mostly naïve phenotype, show reduced alloreactivity and heightened susceptibility to apoptosis (reviewed in ref. 1). Furthermore, the T lymphocyte compartments found in UCB and BM allograft *inoculums* differ extensively from one another in quantitative and qualitative terms. Numbers of CD3<sup>+</sup> cells are approximately 6 times lower in a typical UCBT graft as compared to a BMT inoculum, and the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cell ratio is significantly higher (3.0 versus 1.4) (2). In addition, UCB is a rich source of CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells that possess potent suppressor function in mixed lymphocyte reactions (3). That likely explains the specific pattern of clinical outcomes associated with UCBT in comparison with BMT. Major advantages of UCBT include a low incidence of graft-versus-host disease (GvHD) (4) and an efficient graft-versus-leukaemia effect (5). Main disadvantages include delayed engraftment, late reconstitution of the CD8<sup>+</sup> T cell subset, and a higher incidence of opportunistic infections (OI) in the first 3 to 6 mo post-transplantation that results in higher rates of morbidity and mortality relative to BMT during this period (6-8). In particular, 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 (9,10).

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 pneumonia, gastroenteritis, and, less commonly, retinitis, hepatitis, and encephalitis (11). Between 50% and 100% of patients that are CMV-seropositive prior to transplantation will experience clinical symptoms of CMV infection and/or detectable viral replication by day 100 post-UCBT (12-14). Ganciclovir prophylaxis does not fully suppress CMV reactivation and is associated with myelosuppression that limits its use in children (7,15-17). Pre-emptive treatment based on monitoring by weekly pp65-specific PCR assays during the first 6 mo following transplantation reduces the incidence of CMV disease down to 5%-20% at day 100 (14,18,19). However, late-onset ( $> 6$  mo) CMV disease can still occur and is associated with a high rate of mortality, particularly in CMV-seropositive recipients (20-22). Moreover, the high sensitivity of PCR detection may lead to overtreatment of patients who would not have otherwise progressed to overt CMV disease (23). 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 (24,25). 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 (26,27) but not in others (28,29), studies in which only a few paediatric UCBT recipients were enrolled.

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 central nervous system (30-32). VZV reactivation is common following HSCT, with 13%-55% of patients developing VZV-associated complications in the first year (31). VZV reactivation is more frequent (63%), more severe, and occurs later following UCBT as compared to BMT (9). For this reason, long-term prophylaxis with acyclovir or valaciclovir was recommended to prevent VZV-related complications in HSCT recipients (33). Famciclovir is used for the same indication in our clinical center. However, there are concerns whether this prophylactic strategy may also lead to over-treatment and/or development of antiviral drug resistance. In addition, because long-term protection from CMV and VZV infections critically depends on the reconstitution of a functional antiviral T cell repertoire (34-38), concerns were raised that effective antiviral prophylaxis might impair of virus-specific immune reconstitution (39,40). Indeed, using IFN- $\gamma$  production as a marker of T cell function, Distler *et al.* 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 efficient antiviral T cell responses (41).

With this in mind, the objectives of the present study were fourfold: a) to define and compare the kinetics of reconstitution of CMV-specific and VZV-specific T cell-mediated immune responses following UCBT; b) to determine whether CMV- or VZV-associated complications are required for reconstitution of cognate cell-mediated immune

responses; c) to determine whether these responses protect the graft recipient against CMV- and VZV-associated complications; and d) to examine if the development of these responses is influenced by antiherpetic prophylaxis. To do this, the reconstitution of CMV- and VZV-specific T cell responses was monitored using ELISPOT between 1 and 36 mo post-transplantation in a group of 28 children who underwent UCBT for the treatment of haematological malignancies (n = 24) or other haematological or metabolic disorders (n = 4). Results indicate that CMV- and VZV-specific IFN- $\gamma$  responses are restored with similar kinetics, that an important proportion of subjects developed CMV- and VZV-specific IFN- $\gamma$  responses without manifesting symptoms of the diseases, that emergence of robust 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.

### **3.4 Materials and methods**

#### ***Patients' characteristics***

This research protocol was approved by the Institutional Ethics Review Board of CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada, where the study was conducted. Twenty eight subjects who underwent either single unrelated UCBT (n = 26) or double unrelated UCBT (n = 2) were enrolled between 10/2004 and 06/2010. Patients P1-P26 were the subject of a recent report focused on reconstitution of T cell responses directed against the Melan-A tumor antigen following UCBT (42). Median age at transplantation was 65 mo (range: 4-211 mo). Venous blood samples (2-10 ml) were obtained from transplant

recipients at 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24, and 36 mo post-transplantation. 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. Clinical and socio-demographic characteristics of study subjects are summarized in Table 1. Detailed transplant procedures were described elsewhere (43). Briefly, UCB units, procured 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. The conditioning regimen included total-body irradiation (TBI) or busulfan. Graft inoculums were not *in vitro* T cell depleted. GvHD prophylaxis consisted of cyclosporine A and corticosteroids for 1 month, and serotherapy with 2 mg/kg antithymocyte globulin (Thymoglobulin; Sangstat, Mississauga, ON, Canada) on day -2, -1, +1, and +2. Subjects were also treated with filgrastim (Neupogen; Amgen, Mississauga, ON, Canada) until 5 d post neutrophil recovery. Intravenous immunoglobulin (500 mg/kg; multiple suppliers) were administered weekly to all subjects from transplant to day +100, then every month for 6 mo. 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.

### ***Monitoring, antiviral prophylaxis, and treatment of CMV and VZV infections***

Pre-transplant CMV serological positivity in the graft recipients (IgG antibodies to CMV late antigens) was confirmed using 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 (44). An

in house real-time PCR method based on detection of pp65 was then implemented starting in 2005 (primer sequences available upon request). Monitoring was performed on a weekly basis until 6 mo post-transplantation or longer if immunosuppression persisted. Ganciclovir treatment (5 mg/kg/12 hours) was initiated upon positive NASBA or detection of >3,000 CMV DNA copies/ml plasma and discontinued upon disappearance of viremia. The term « CMV DNAemia » will be used in the text to denote detection of CMV using either NASBA or PCR-based methods. 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 Ig (VZIG; Cangene Corporation, Winnipeg, AB, Canada) were administered to one subject (P5) at 18 mo post-transplant following possible VZV exposure. Since 2007, VZV-seropositive subjects 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 occurred after 12 mo post-transplantation, subjects were treated with intravenous acyclovir for 3 d (500 mg/m<sup>2</sup> 3 times per day), followed by 10 d treatment with famciclovir (250 mg 3 times per day in children weighting 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 were mentioned, all monoclonal Abs (mAbs) were purchased from BD Biosciences (San Diego, CA). The following mAbs were used: PE- or APC- conjugated anti-CD8 (RPA-T8), PE-Cy7- conjugated anti-CCR7 (3D12), and FITC-conjugated anti-CD45RA (HI100) (45); or APC-conjugated anti-CD4 (SK3), PE-conjugated anti-CD45RA (ALB11; Beckman Coulter, Indianapolis, IN) and FITC- conjugated anti-CD31 (PECAM-1, clone WM59) (46). mAbs for cell-surface staining were added, and cells were incubated for 30 min at room temperature for CD8<sup>+</sup> T cells. In the case of CD4<sup>+</sup> T cells, incubation was on ice for 20 minutes, after which erythrocytes were lysed using 10% v/v BD FACS Lysing Solution. The human CMV pp65<sub>495-503</sub> (NLVPMVATV) HLA-A2 tetramer was obtained from the CANVAC Core Facility and used following 1 wk of PHA stimulation, as previously described (42,47). 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. Acquisition was performed on a BD FACSCalibur flow cytometer (CD8<sup>+</sup> T cells) or on a BD FACSCanto II (CD4<sup>+</sup> T cells), and analysis was completed using BD FACSDiva and FlowJo software packages (Tree Star Inc., Ashland, OR).

## ***ELISPOT***

Frozen PBMC were thawed in the presence of Benzonase Nuclease (Novagen, Madison, WI) and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 20% v/v FBS and 50 µg/ml gentamicin (Invitrogen). Cells were incubated overnight 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-γ capture Ab (NIB42; BD Biosciences) diluted 10 µg/ml in PBS (Invitrogen). Plates were blocked for 2 h at 37°C with RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. PBMC were diluted at a final concentration of  $2 \times 10^6$  cells/ml in AIM-V (Invitrogen) supplemented with 2% v/v inactivated human serum (IHS; Wisent, St-Jean-Baptiste, QC, Canada). 100 µl suspension (200,000 cells) was added to each well, combined with 100 µl of VZV Ag (10,000 Gy irradiated Varivax III; 1,350 plaque forming units/ml; Merck Frosst, Kirkland, QC, Canada) diluted 1/200 in AIM-V, or with 1 µg of an equimolar mixture of 138 15-mer peptides based on the amino-acid sequence of CMV pp65 (Pepmix HCMVA pp65; JPT Peptide Technologies, Berlin, Germany) (48-50). Anti-CD3 mAb (OKT3; Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) was used as positive control (0.5 µg/ml) while cells incubated with AIM-V 2% IHS and 0.5% DMSO were used as negative control. Plates were incubated for 22-24 h and developed by the addition of 0.5 µg/ml of biotinylated anti-IFN-γ 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 assays were performed in duplicates. Spots were enumerated using a CTL ImmunoSpot S4 UV Analyser (Cellular Technology Limited, Shaker Heights, OH). Background 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 SFU was  $>50$  per  $10^6$  PBMC and 2 SD 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 and the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test were used to test differences between continuous variables, whereas the Chi-square test was used for categorical measurements. Correlations between variables were tested using Spearman's rank correlation test. 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).

## **3.5 Results**

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

A total of 28 children with haematological disorders were enrolled in this study, most of whom were diagnosed with malignant diseases (Table 1). Twenty six were transplanted with a single UCB unit and 2 with double UCB units. Nine subjects (32.1%) died during the 36 mo follow-up. Five subjects (17.9%) had detectable anti-CMV antibody titres (CMV-seropositive) and 17 (60.7%) had measurable anti-VZV antibody titres (VZV-seropositive) prior to transplantation. In all, 14 subjects (50.0%) developed at least 1 complication related to infection with herpesviruses, including 11 (39.3%) during the first

100 d post-transplantation. These early complications involved HSV-1 (n = 4), CMV (n = 4), EBV (n = 2), VZV (n = 2), and human herpes virus 6 (HHV-6; n = 1). Two recurrences of zoster and 3 additional VZV reactivations occurred 1-2 years post-transplantation (Table 1).

### ***Reconstitution of CD4<sup>+</sup> and CD8<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 mo post-transplantation. While CD4<sup>+</sup> T cells counts doubled between 2 and 3 mo (median = 25 cells/mm<sup>3</sup> and median = 52 cells/mm<sup>3</sup> at 2 and 3 mo post-transplantation, respectively), CD8<sup>+</sup> T cells counts remained stable (median = 16.3 cells/mm<sup>3</sup> and median = 18 cells/mm<sup>3</sup>, respectively). Median CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts remained below normal values at 6 mo post-transplantation, although some subjects had already attained normal T lymphocytes counts (Figure 1A) (51,52). The vast majority of subjects recovered levels of T cells consistent with normal values by 12 mo post-transplantation (median = 928 cells/mm<sup>3</sup> and median = 435 cells/mm<sup>3</sup> for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, respectively) (Figure 1A). The contribution of thymopoiesis to T cell reconstitution was evaluated based on the frequency of naïve CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> (45) and CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> T cells (46) (Figure 1B and 1C). Frequencies of naïve CD8<sup>+</sup> T cells remained close to baseline in the first 3 mo post-transplantation, did not increase between 2 and 3 mo (median = 1.74%, 4.22%, and 4.61% at 1, 2, and 3 mo, respectively), and then rose progressively between 6 and 18 mo (median = 23.8%, 69.8%, 74.3%, and 74.8% at 6, 12, 18, and 24 mo, respectively) (Figure 1B). Naïve CD4<sup>+</sup> T cells were barely detectable at 1 mo post-transplantation (median = 0.40%), but their frequency increased

slowly between 2 and 6 mo (median = 1.30%, 3.60%, and 10.0% at 2, 3, and 6 mo, respectively). Between 9 and 24 mo post-transplantation, roughly half of the CD4<sup>+</sup> T cell subset was comprised of naïve cells (median = 39.5%, 49.0%, and 54.0% at 9, 12, and 24 mo, respectively) (Figure 1C).

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

Five of 28 subjects (17.9%) were CMV-seropositive before transplantation and 4 of them (80%) developed CMV DNAemia. One subject (P7) died of CMV-associated interstitial pneumonia. Another (P12) developed an ophthalmic infection and later died of leukaemic 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 23 of 28 subjects (9,45-47). No responses were detected at 1 mo post-UCBT and the frequency of CMV-specific T cell was significantly lower at 2 mo post-UCBT than that observed in healthy controls ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test) (Figure 2A). From 2 to 36 mo, CMV-specific immune reconstitution was steady and progressive, increasing from a mean of 29.2 SFU per 10<sup>6</sup> PBMC to 307 SFU per 10<sup>6</sup> PBMC at 2 and 36 mo post-transplant (Figure 2A). IFN- $\gamma$  responses were heterogeneous, with high SFU values observed at all time points. There was no statistically significant difference between the frequency of CMV-specific T cells measured between 12 and 36 mo post-transplantation and that measured in healthy adult controls ( $p > 0.05$ , Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test). In Kaplan-Meier analysis, only 3.57% of study subjects had recovered significant anti-CMV immunity at 2 and 3 mo post-

transplantation. At 6 and 12 mo, 11.6% and 16.3% of subjects produced detectable IFN- $\gamma$  in response to CMV. Finally, at 36 mo (end of follow-up), 33.5% of subjects tested had developed anti-CMV cell-mediated immunity (Figure 2B).

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 mo post-UCBT, when CMV DNAemia reached 90,000 copies per ml, and his anti-CMV IFN- $\gamma$  response was not assessed. However, the 3 other CMV-seropositive subjects (*i.e.* P9 and P12 and P26) exhibited strong IFN- $\gamma$  responses ( $\geq 150$  SFU/ $10^6$  PBMCs) at all time points post-DNAemia and did not develop clinical symptoms nor recurrent DNAemia following CMV-specific immune reconstitution (Figure 3A). The sole CMV-seropositive subject in whom CMV DNAemia was not detected (P11) was 5 mo old at the time of serologic typing, hence the possible presence of maternal antibodies, and did not reconstitute CMV-specific cell-mediated immunity in terms of IFN- $\gamma$  production (data not shown).

Overall, 4 cases (21.1%) of spontaneous reconstitution of CMV-specific IFN- $\gamma$  production were observed in 19 CMV-seronegative recipients with no concurrent or previously documented evidence of CMV DNAemia (P4, P5, P13, P21) (Figure 3B). The 4 patients in question were subject P4, who underwent UCBT for the treatment of acute myeloid leukemia (AML) at age 10 yrs 7 mo and exhibited 140 and 590 CMV-specific SFU per  $10^6$  PBMC at 12 and 18 mo post-transplant, respectively; subject P5, who underwent UCBT for the treatment of myelodysplastic syndrome (MDS) at age 4 yrs 11

mo, and exhibited 1135 CMV-specific SFU per  $10^6$  PBMC at 18 mo post-transplant; subject P13, who underwent UCBT for the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) at age 17 yrs and exhibited 75 CMV-specific SFU per  $10^6$  PBMC at 36 mo post-transplant; and subject P21, who underwent UCBT to treat MDS at 12 mo of age and exhibited 460, 715, 717, and 2000 CMV-specific SFU per  $10^6$  PBMC at 2, 3, 6, and 12 mo post-transplant, respectively. These responses were considerably higher than the mean response observed at that particular time point (Figure 3B). Study subjects who did not respond to pp65 peptides in IFN- $\gamma$  ELISpot were also unresponsive to peptides derived from the CMV IE-1 protein (data not shown), an antigen against which responses were shown by others to correlate with protective immunity (24). CMV-specific T cell responses were confirmed by staining with HLA-A2-pp65<sub>495-503</sub> peptide MHC tetramers in HLA-A2<sup>+</sup> subjects (Figure 4).

### ***CMV-specific cell-mediated immune responses and thymopoiesis***

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 2). During the first 6 mo post-transplantation, the frequency of T cells that produced IFN- $\gamma$  in response to CMV antigens was associated with absolute CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts ( $p = 0.0471$ ,  $p = 0.0419$ , and  $p = 0.0364$ , respectively, Spearman's rank correlation test). The magnitude of the CMV-specific IFN- $\gamma$  response was also positively correlated with the frequency of naïve CD8<sup>+</sup> T cells ( $p = 0.0152$ , Spearman's rank correlation test) (Table 2). These results suggest that both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells participate in the

generation of IFN- $\gamma$  in response to CMV-derived peptides in UCBT recipients, and that the emergence of naive CD8<sup>+</sup> T cells via thymopoiesis leads to stronger responses.

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

Seventeen subjects (60.7%) exhibited a positive VZV serologic status prior to transplantation, including 9 subjects who were treated for 12 mo with famciclovir prophylaxis. Five of 17 (29.4%) VZV-seropositive subjects developed zoster-associated clinical symptoms, one of whom (P2) later died as a result of leukaemic relapse. There was a higher relative risk of developing VZV disease in VZV-seropositive subjects ( $p = 0.0236$ , 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). Reconstitution of VZV-specific T cell responses was examined in 24 study subjects using IFN- $\gamma$  ELISPOT and Varivax III as a source of VZV Ag. This reconstitution was progressive, going from a mean of 11 SFU per 10<sup>6</sup> PBMC at 3 mo post-transplantation to 243 SFU per 10<sup>6</sup> PBMC at 36 mo. The frequency of VZV specific-T cells was significantly lower during the first 3 mo in comparison to 36 mo and to healthy controls ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test). There was no statistically significant difference between the frequency of VZV-specific T cells measured between 12 and 36 mo post-transplantation and that measured in healthy adults ( $p > 0.05$ , Kruskal-Wallis test with Dunn' multiple comparisons test). Similar to CMV-specific immune reconstitution, heterogeneous SFU values were observed (Figure 5A). However, the magnitude of VZV-specific responses was significantly smaller than that of CMV-specific responses ( $p = 0.0273$ ; Wilcoxon rank-sum test) (Figure 2A, 2C,

5A, 5C). In Kaplan-Meier analysis, 0.00% and 3.85% of subjects developed VZV-specific IFN- $\gamma$  responses above the detection threshold at 2 and 3 mo post-transplantation, respectively. This proportion increased to 15.9% and 20.5% at 6 and 12 mo. Finally, at 36 mo, 38.5% of subjects tested had developed anti-VZV cell-mediated immunity in terms of IFN- $\gamma$  production (Figure 5B). This proportion was higher than that observed with CMV-specific responses (Figure 2B), but this difference was not statistically significant ( $p = 0.7372$ , logrank test). In all, 7 of 17 (41.2%) VZV-seropositive subjects, including 4 who were under famciclovir prophylaxis and 4 who came down with zoster, developed a VZV-specific IFN- $\gamma$  response at any time post-UCBT (Figure 5A).

Subjects P2, P5 and P13 did not receive famciclovir prophylaxis and developed zoster at 1.5 mo, 19 mo, and 1 mo post-transplantation, respectively. In the case of P2, zoster was chronic, with recurrences of symptoms at 6 and 18 mo post-UCBT and no significant VZV-specific IFN- $\gamma$  responses (Figure 6A). At 20 mo post-UCBT, P2 died of leukaemic relapse. Subject P5, who received anti-VZV IgG and famciclovir at 18 mo post-UCBT, developed a response of 320 SFU per  $10^6$  PBMC and no recurrence of clinical symptoms was reported (Figure 6A). Subject P13 received famciclovir for a year after the first clinical manifestation of zoster 3 mo post-UCBT. The disease reappeared at 18 mo post-transplantation, at which time treatment by famciclovir was reintroduced. However, clinical symptoms reappeared at 28 mo. P13 developed a VZV-specific IFN- $\gamma$  response of 208 SFU per  $10^6$  PBMC at 36 mo, after which no further recurrences of zoster were reported (follow-up has now reached 60 mo). Subjects P15 and P17 received famciclovir for one year post-UCBT and developed zoster after discontinuation of treatment at 21 and 13 mo post-transplantation, respectively whereas they did not develop VZV-specific

IFN- $\gamma$  responses. P15 was vaccinated against VZV at 30 mo post-transplantation and P17 developed a VZV-specific IFN- $\gamma$  response at 21 mo post-UCBT (150 SFU per  $10^6$  PBMC). Neither developed further symptoms of VZV infection.

A total of 10 VZV-seropositive subjects did not develop any detectable IFN- $\gamma$  responses against VZV Ag, including 6 subjects who did not receive prophylactic treatment (data not shown). 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 mo post-transplantation ( $n = 16$ ,  $p = 0.5000$ ; Chi-square test) or with respect to the median 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 17 (17.6%) VZV-seropositive subjects (P11, P18 and P20) and in 1 of 7 VZV-seronegative subjects (P21, transplanted at 5 mo of age) (Figure 6B). Subject P11 underwent UCBT for the treatment of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHLH) at age 5 mo and exhibited 178, 358, 630, 435, and 860 VZV-specific SFU per  $10^6$  PBMC at 6, 12, 18, 21, and 36 mo post-transplant, respectively; subject P18 underwent UCBT to treat ALL at age 7 yrs and exhibited 150, 243, and 215 VZV-specific SFU per  $10^6$  PBMC at 3, 12, and 18 mo post-transplant, respectively; subject P20 underwent UCBT at age 2 yrs for the treatment of AML and exhibited 520 VZV-specific SFU per  $10^6$  PBMC at 6 mo post-transplant; and subject P21 (see above) exhibited 168 and 418 VZV-specific SFU per  $10^6$  PBMC at 6 and 12 mo post-transplant, respectively. VZV-seropositive subjects were more likely to reconstitute anti-VZV immunity than VZV-seronegative patients ( $p = 0.0136$ , Chi-square



test) (Figure 6). VZV-specific IFN- $\gamma$  responses were associated with VZV-seroconversion only in patients who experienced zoster (Table 3). Finally, the 5 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 (*i.e.* P11, P18, P20, P21) developed responses  $\geq 150$  SFU per  $10^6$  PBMC ( $p = 0.0013$ ; Chi-square test) (Figure 6).

### ***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 recipients from our study group (Table 2). During the first 6 mo, VZV-specific IFN- $\gamma$  SFU numbers were significantly associated with absolute CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts ( $p = 0.0398$ ,  $p = 0.0169$ , and  $p = 0.0335$ , respectively, 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 ( $p = 0.0132$ , 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.

### 3.6 Discussion

To better define the kinetics of reconstitution of CMV- and VZV-specific T cell-mediated immune responses in paediatric HSCT recipients, the progressive recovery of CMV- and VZV-specific T lymphocytes was examined over a post-transplantation period of 3 years in 28 UCBT recipients. In lymphodepleted HSCT recipients, thymus-independent (homeostatic proliferation) and thymus-dependent (thymopoiesis) pathways mediate the reconstitution of the T cell compartment. During the first 100-200 days post-HSCT, graft-derived naïve T lymphocytes expand peripherally by undergoing lymphopenia-induced proliferation (LIP) and acquire a both effector and memory markers (reviewed in ref. 53). These processes are also active following UCBT, where naïve T cells differentiate into a population of short-lived effectors enriched in cells that express the programmed-death 1 (PD-1) inhibitory receptor (42). *De novo* T-cell production becomes progressively detectable from day 100 onward and the level of thymus-derived T cells takes 1-2 years to reach the normal range (54). In agreement with other studies (8), the first 3 mo post-transplantation were characterized by persistently low CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts, as well as by the almost total absence of naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. These results confirm that homeostatic expansion of graft-derived T lymphocytes is unable to supply the periphery with significant levels of T cells (52) and that the replenishment of the T cell repertoire is ultimately dependent on thymopoiesis.

The dynamics of reconstitution of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets in the first 3 mo post-UCBT was mirrored by the reconstitution of the CMV- and VZV-specific T cell repertoires. Indeed, at 1 mo post-transplantation, none of the study subjects had

reconstituted anti-CMV or anti-VZV responses. At 3 mo, CMV-specific responses were observed in 2 subjects, while only one had regained VZV-specific responses. Such an absence of IFN- $\gamma$  production in response to these viruses is consistent with the high risk of developing opportunistic viral infections in the first 100 days post-transplantation and with the high frequency of T cells that express PD-1 during this period (42). The correlations observed between levels of CMV- and VZV-specific T cells, total CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts, and naïve CD8<sup>+</sup> T cell frequencies during the early post-transplantation period indicate 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 significantly contributes to the regeneration of the antiviral T cell repertoire. Higher levels of IFN- $\gamma$  production are associated with polyfunctionality of CD8<sup>+</sup> T cells and better control of chronic viral infection (55). As a result, the association between the frequency of naïve CD8<sup>+</sup> T cells and the magnitude of anti-CMV and anti-VZV responses in the first 6 mo post-UCBT implies that *de novo* production of CD8<sup>+</sup> T cells by thymopoiesis (as opposed to UCB-derived T cell expansion) may be required to develop protective responses. These results are in accordance with a recent study showing that thymopoiesis was necessary for the development of strong and protective responses against CMV (29).

Moving away from the 100 days window, the intermediate to late (6-36 mo) post-transplant period was characterized by a gradual increase in levels of T lymphocytes. Reflecting T cell reconstitution, the number of subjects in whom CMV- and VZV-specific responses were detectable rose between 6 and 36 mo post-transplantation, but 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, perhaps reflecting differential efficacy of cell-mediated immunity at controlling these two particular pathogens (8,9,12-14,31).

Next, we sought to determine whether manifestations of CMV- or VZV-associated complications were required for reconstitution of virus-specific cell-mediated immune responses, and whether T cell responses directed against CMV or VZV Ags were capable of protecting graft recipients against these infections. Four UCBT recipients experienced CMV DNAemia, including 2 cases of symptomatic reactivation. In all instances, DNAemia occurred in the first 6 mo post-UCBT. In 3 subjects, IFN- $\gamma$  ELISPOT performed after the DNAemia episode showed the presence of anti-CMV T cell responses in terms of IFN- $\gamma$  production. Similar results were obtained whether pp65-specific or IE-1 specific responses were examined. 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 CMV DNAemia promotes the development of CMV-specific immunity and that these responses are associated with protection from subsequent CMV-associated complications in UCBT recipients. Frequencies of CMV-specific T cells that produce IFN- $\gamma$  in response to pp65 peptides range between 0.04% and 4.5% in healthy seropositive individuals, and such frequencies are generally considered to be protective against viral reactivation (56-58). In the present study, the median frequency of CMV-specific T cells measured in healthy adult controls was 453 SFU per  $10^6$  PBMC (Figure 2).

Five of 28 subjects developed herpes zoster during the study. The window during which VZV reactivation was observed was wider than that of CMV, extending out from 1 mo (P13) to 21 mo (P15). One subject (P2) never developed IFN- $\gamma$  responses above the detection threshold and experienced several recurrences of zoster. Another (P13) experienced zoster despite the presence of VZV-specific responses at levels above the detection threshold ( $\geq 50$  SFU per  $10^6$  PBMC). However, attainment of IFN- $\gamma$  responses  $\geq 150$  SFU per  $10^6$  PBMC was associated with absence of any further recurrences of herpes zoster. These results suggest that symptomatic reactivation of VZV does not always lead to the development of VZV-specific responses, and that IFN- $\gamma$  production is protective only beyond a certain threshold ( $\geq 150$  SFU per  $10^6$  PBMC). In the case of VZV, frequencies of T cells that produce IFN- $\gamma$  in response to IE-62 or IE-63 peptide mixes or VZV culture lysate are known to range between 0.03% and 2.75%, and these levels are also thought to be protective (38,59,60). In the present study, the median frequency of VZV-specific T cells measured in healthy adult controls was 134 SFU per  $10^6$  PBMC (Figure 5).

Importantly, reconstitution of CMV- and VZV-specific T cell responses in absence of clinical symptoms or episodes of DNAemia was observed in both seropositive and seronegative subjects, though less frequently in the latter. This is consistent with previous observations by Cohen *et al.* (61), though these investigators only relied on proliferative responses that do not necessarily reflect the presence of functional virus-specific T cells. Here, development of anti-CMV responses in the absence of detectable viral replication was confirmed by staining with MHC-peptide tetramers. Reports have shown that CMV infection can occur in CMV seronegative patients receiving CMV-seronegative grafts,

with an incidence ranging from 1.2 to 12% in the first 3 mo post-transplantation (10,13,22,62). However, to our knowledge, kinetics of antiviral immune reconstitution were never assessed in CMV seronegative patients receiving CMV-seronegative grafts. *De novo* infection with CMV (*i.e.* post-transplantation) cannot be excluded as an explanation for the recovery of CMV-specific responses, particularly in the case of subjects P4, P5, and P13, who were older at the time they underwent UCBT. Alternatively, these responses might have arisen as a result of localized intestinal CMV infection, which is sometimes not detected by PCR in peripheral blood (63). Another explanation is that the subjects were falsely seronegative, perhaps as a result of immunosuppression associated with the underlying blood disorders, of borderline antibody titers (64), or of recently-acquired or occult CMV infection (65-67). Interestingly, the magnitude of the reconstitution of CMV-specific IFN- $\gamma$  responses in these 4 CMV-seronegative subjects was roughly inversely proportional to their age at the time of transplant. Even though this number of subjects is too small to draw solid conclusions, it is tempting to speculate that the magnitude of this spontaneous reconstitution of CMV-specific T cell responses was somehow correlated with the extent of residual thymopoiesis in these children, consistent with the existence, generation, and selection of a public CMV-specific T cell repertoire (68,69).

Following primary infection, VZV is known to remain latent in trigeminal and dorsal root ganglia (70) and its dissemination is thought to be kept in check by host cell-mediated immune responses. In the case of VZV-seropositive subjects P11, P18 and P20, subclinical VZV reactivation might have led to rapid expansion of VZV-specific T cells, thereby preventing the ensuing appearance of herpes zoster. In the case of VZV-

seronegative subject P21, it is possible that reconstitution of the VZV-specific T cell repertoire was caused by recently-acquired or occult VZV infection or resulted from discordant serologic and cell-mediated immune responses (71-73). Another possibility would be that the observed responses are due to antigenic cross-reactivity with another herpes virus (74-77). Alternatively, 3 of these 4 subjects were younger than 2 yrs of age, again suggesting that thymopoiesis might have played an important part in the spontaneous reconstitution of the VZV-specific T cell compartment. Reconstitution of T cell-mediated IFN- $\gamma$  responses directed against VZV in the absence of clinical symptoms in contradiction with a recent report on recipients of T cell-depleted BMT (41). However, 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 (78). Others showed that VZV-specific T lymphocyte proliferation was detectable in BMT recipients irrespective of whether or not they developed symptomatic recurrences of VZV (79), and that subclinical VZV viremia can be controlled by T cell-mediated immune responses (80). 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. Spontaneous reconstitution was associated with comparatively strong IFN- $\gamma$  responses (>150 SFU per  $10^6$  PBMC), suggesting that UCBT recipients can recover potentially protective CMV and VZV-specific T cell responses in the absence of symptomatic infection or reactivation. Reports have shown that CD8<sup>+</sup> T cell reconstitution was more prompt in paediatric BMT recipients as compared to UCBT recipients (52). Further

studies should assess potential differences between BMT and UCBT with respect to the dynamics of reconstitution of antiviral cell-mediated immune responses.

Finally, we sought to determine whether antiherpetic prophylaxis influenced the development of VZV-specific immunity. In the present study, 4 of 7 VZV-seropositive subjects who exhibited above-threshold frequencies of IFN- $\gamma$ -producing T cells following stimulation with VZV Ags had been administered famciclovir prophylaxis. In two of them (P15, P17), zoster developed only after interruption of prophylaxis. Thus, famciclovir did not actually prevent the development of herpes zoster but delayed its onset. Levels  $>150$  SFU per  $10^6$  PBMC were attained in one non-zoster VZV-seropositive subject (P18; 170 SFU per  $10^6$  PBMC) during the course of prophylaxis. Therefore, famciclovir prophylaxis did not strictly prevent the reconstitution of the VZV-specific T cell repertoire. Long-term use of famciclovir could have led to the emergence of antiviral drug resistance and ensuing viral replication, potentially leading to the reconstitution of VZV-specific T cell responses in the face of anti-herpetic treatment (33). Unfortunately, monitoring of VZV viral load was not performed during follow-up in any of our study subjects. 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 view of the results presented herein, a reasonable strategy might involve administration of 12 mo of famciclovir prophylaxis to postpone VZV infection/reactivation, followed by vaccination if CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts are within normal range (51). Cessation of treatment could potentially be considered when levels of CMV- and VZV-specific T cells reach  $\geq 150$  SFU per  $10^6$  PBMC.



In summary, the present study documents for the first time the simultaneous reconstitution of functional CMV- and VZV-specific T cell-mediated immune responses in UCBT recipients over a period of 3 years. The pattern of antiherpetic immune reconstitution shows that the development of antiviral responses is rapid and efficient in some subjects, reaching a magnitude observed in adults as early as 2-3 mo post-UCBT. However, reconstitution of antiviral immune responses is slow in the majority of UCBT recipients. Our results revealed that reconstitution of CMV- and VZV-specific T cell responses can also take place in subjects who do not develop CMV or VZV disease, and even in pre-transplant seronegative subjects. Both in the case of CMV and VZV, reconstitution above 150 SFU per  $10^6$  PBMC appeared to be protective, as it was associated with absence of subsequent viral replication and clinical symptoms. IFN- $\gamma$  ELISPOT is a powerful tool to assess antiviral immune reconstitution in HSCT recipients and could provide guidance for clinical management of UCBT recipients. The heterogeneity observed in CMV-specific (81) and VZV-specific T cell responses suggests that immunological monitoring of antiviral immune responses in HSCT recipients could yield key information for the adjustment of immunosuppressive regimens and antiviral prophylaxis.

### **3.7 Acknowledgements**

N.M., I.S.F., R.M.B., A.J.G., E.C., P.C., and M.C. performed research; S.M. and B.M. provided essential reagents and tools; N.M., M.D., and H.S. designed the research study; N.M. and H.S. analyzed data; N.M., M.D., C.A., P.O., F.L.D., and H.S. wrote the manuscript. The authors wish to thank Dr. Réjean Lapointe and members of his team for

use of their automated ELISpot analyzer, and Serge Sénéchal and Dr. Bader Yassine-Diab for excellent technical assistance.

### 3.8 References

1. Lin, S.J., D.C. Yan, Y.C. Lee, H.S. Hsiao, P.T. Lee, Y.W. Liang, and M.L. Kuo. 2012. Umbilical cord blood immunology-relevance to stem cell transplantation. *Clinic. Rev. Allerg. Immunol.* 42: 45-57.
2. Theilgaard-Mönch, K., K. Raaschou-Jensen, H. Palm, K. Schjødt, C. Heilmann, L. Vindeløv, 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.

6. 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.

7. Barker, J.N., R.E. Hough, J.A. van Burik, T.E. DeFor, M.L. MacMillan, M.R. O'Brien, and J.E. Wagner. 2005. Serious infections after unrelated donor transplantation in 136 children: impact of stem cell source. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 11: 362-370.

8. Merindol, N., E. Charrier, M. Duval, and H. Soudeyns. 2011. Complementary and contrasting roles of NK cells and T cells in pediatric umbilical cord blood transplantation. *J. Leukoc. Biol.* 90: 49-60.

9. 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.

10. 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.

11. Ljungman, P., M. Hakki, and M. Boeckh. 2010. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 24: 319-337.

12. 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.
13. 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.
14. 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, S. Taniguchi. 2008. Umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning for elderly patients with hematologic diseases. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14: 583-590.
15. 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. Int. Med.* 118: 173-178.
16. 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.
17. 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.

18. Boeckh, M., W.G. Nichols, G. Papanicolaou, R. Rubin, J.R. Wingard, and J. Zaia. 2003. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 9: 543-558.
19. Matsumura, T., H. Narimatsu, M. Kami, K. Yuji, E. Kusumi, A. Hori, N. Murashige, Y. Tanaka, K. Masuoka, A. Wake, S. Miyakoshi, Y. Kanda, and S. Taniguchi. 2007. Cytomegalovirus infections following umbilical cord blood transplantation using reduced intensity conditioning regimens for adult patients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13: 577-583.
20. Boeckh, M., and W.G. Nichols. 2004. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood* 103: 2003-2008.
21. Hebart, H., and H. Einsele. 2004. Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. *Hum. Immunol.* 65: 432-436.
22. Walker, C.M., J.A. van Burik, T.E. De For, and D.J. Weisdorf. 2007. Cytomegalovirus infection after allogeneic transplantation: comparison of cord blood with peripheral blood and marrow graft sources. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13: 1106-1115.
23. Zaia, J.A. 2002. Prevention of cytomegalovirus disease in hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 35: 999-1004.
24. Gratama, J.W., M. Boeckh, R. Nakamura, J.J. Cornelissen, R.A. Brooimans, J.A. Zaia, S.J. Forman, K. Gaal, K.R. Bray, G.H. Gasiior, C.S. Boyce, L.A. Sullivan, and P.C. Southwick. 2010. 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* 116: 1655-1662.

25. Pastore, D., M. Delia, A. Mestice, T. Perrone, P. Carluccio, F. Gaudio, A. Giordano, A.R. Rossi, A. Ricco, M. Leo, V. Liso, and G. Specchia. 2011. Recovery of CMV-specific CD8(+) T cells and Tregs after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 17: 550-557.

26. Tormo, N., C. Solano, I. Benet, M.A. Clari, J. Nieto, R. de la Cámara, J. López, N. López-Aldeguer, J.C. Hernández-Boluda, M.J. Remigia, A. Garcia-Noblejas, C. Gimeno, and D. Navarro. 2010. Lack of prompt expansion of cytomegalovirus pp65 and IE-1-specific IFN $\gamma$  CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> 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.* 45: 543-549.

27. Tormo, N., C. Solano, I. Benet, J. Nieto, R. de la Cámara, J. López, A. Garcia-Noblejas, B. Muñoz-Cobo, E. Costa, M.A. Clari, J.C. Hernández-Boluda, M.J. Remigia, and D. Navarro. 2011. 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.* 46: 1437-1443.

28. Barron, M.A., D. Gao, K.L. Springer, J.A. Patterson, M.W. Brunvand, P.A. McSweeney, C. Zeng, A.E. Barón, and A. Weinberg. 2009. Relationship of reconstituted adaptive and innate cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses with CMV viremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 49: 1777-1783.

29. 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.
30. Feldman, S., W.T. Hughes, and C.B. Daniel. 1975. Varicella in children with cancer: Seventy-seven cases. *Pediatrics* 56: 388-397.
31. Arvin, A.M. 2000. Varicella-Zoster virus: pathogenesis, immunity, and clinical management in hematopoietic cell transplant recipients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 6: 219-230.
32. Wiegering, V., J. Schick, M. Beer, B. Weissbrich, S. Gattenlöhner, H.J. Girschick, J. Liese, P.G. Schlegel, and M. Eyrich. 2011. Varicella-zoster virus infections in immunocompromised patients - a single centre 6-years analysis. *BMC Pediatrics* 11: 31.
33. Tomblyn, M., T. Chiller, H. Einsele, R. Gress, K. Sepkowitz, J. Storek, J.R. Wingard, J.A. Young, M.J. Boeckh, Center for International Blood and Marrow Research, National Marrow Donor program, European Blood and Marrow Transplant Group, American Society of Blood and Marrow Transplantation, Canadian Blood and Marrow Transplant Group, Infectious Diseases Society of America, Society for Healthcare Epidemiology of America, Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada, Centers for Disease Control and Prevention. 2009. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 15: 1143-1238.
34. Burke, B.L., R.W. Steele, O.W. Beard, J.S. Wood, T.D. Cain, and D.J. Marmer. 1982. Immune responses to varicella-zoster in the aged. *Arch. Int. Med.* 142: 291-293.

35. Quinnan, G.V., N. Kirmani, A.H. Rook, J.F. Manischewitz, L. Jackson, G. Moreschi, G.W. Santos, R. Saral, and W.H. Burns. 1982. 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.* 307: 7-13.
36. 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.
37. Levin, M.J., J.G. Smith, R.M. Kaufhold, D. Barber, A.R. Hayward, C.Y. Chan, I.S. Chan, D.J. Li, W. Wang, P.M. Keller, A. Shaw, J.L. Silber, K. Schlienger, I. Chalikonda, S.J. Vessey, and M.J. Caulfield. 2003. Decline in varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity with increasing age and boosting with a high-dose VZV vaccine. *J. Infect. Dis.* 188: 1336-1344.
38. Jones, L., A.P. Black, G.N. Malavige, and G.S. Ogg. 2007. Phenotypic analysis of human CD4<sup>+</sup> T cells specific for immediate-early 63 protein of varicella-zoster virus. *Eur. J. Immunol.* 37: 3393-3403.
39. Ljungman, P., H. Wilczek, G. Gahrton, A. Gustavsson, G. Lundgren, B. Lönnqvist, O. Ringdén, and B. Wahren. 1986. Long-term acyclovir prophylaxis in bone marrow transplant recipients and lymphocyte proliferation responses to herpes virus antigens in vitro. *Bone Marrow Transplant.* 1: 185-192.
40. Selby, P.J., R.L. Powles, D. Easton, T.J. Perren, K. Stolle, B. Jameson, A.P. Fiddian, Y. Tryhorn, and H. Stern. 1989. The prophylactic role of intravenous and long-



term oral acyclovir after allogeneic bone marrow transplantation. *Br. J. Cancer* 59: 434-438.

41. Distler, E., E. Schnürer, 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.

42. Merindol, N., M.A. Champagne, M. Duval, and H. Soudeyns, H. 2011. CD8<sup>+</sup> T cell reconstitution in recipients of umbilical cord blood transplant and characteristics associated with leukemic relapse. *Blood* 118: 4480-4488.

43. 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: 605-601.

44. Renoult, E., M.J. Clermont, V. Phan, C. Buteau, C. Alfieri, and B. Tapiero. 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. *Ped. Transplant.* 12: 420-425.

45. 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.

46. Kimmig, S., G.K. Przybylski, C.A. Schmidt, K. Laurisch, B. Möwes, 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.

47. 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.
48. Kern, F., N. Faulhaber, C. Frömmel, E. Khatamzas, S. Prösch, C. Schönemann, 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.
49. Landolfo, S., M. Gariglio, G. Gribaudo, and D. Lembo. 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol. Ther.* 98: 269-297.
50. 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.
51. Shearer, W.T., H.M. Rosenblatt, R.S. Gelman, R. Oyomopito, S. Plaeger, E.R. Stiehm, D.W. Wara, S.D. Douglas, K. Luzuriaga, E.J. McFarland, R. Yogev, M.J. Rathore, W. Levy, B.L. Graham, and S.A. Spector; Pediatric AIDS Clinical Trials Group. 2003. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112: 973-980.
52. Rénard, 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.

53. Surh, C.D., and J. Sprent. 2008. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 29: 848-862.

54. Krenger, W., B.R. Blazar, and G.A. Holländer. 2011. Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 117: 6768-6776.

55. 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.

56. Kern, F., E. Khatamzas, I. Surel, C. Frömmel, P. Reinke, S.L. Waldrop, L.J. Picker, and H.D. Volk. 1999. Distribution of human CMV-specific memory T cells among the CD8pos. subsets defined by CD57, CD27, and CD45 isoforms. *Eur. J. Immunol.* 29: 2908-2915.

57. Gamadia, L.E., R.J. Rentenaar, P.A. Baars, E.B. Remmerswaal, S. Surachno, J.F. Weel, M. Toebes, T.N. Schumacher, I.J. ten Berg, and R.A. van Lier, R.A. 2001. Differentiation of cytomegalovirus-specific CD8 (+) T cells in healthy and immunosuppressed virus carriers. *Blood* 98: 754-761.

58. Kern, F., T. Bunde, N. Faulhaber, F. Kiecker, E. Khatamzas, I.M. Rudawski, A. Pruss, J.W. Gratama, R. Volkmer-Engert, R. Ewert, P. Reinke, H.D. Volk, and L.J. Picker. 2002. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J. Infect. Dis.* 185: 1709-1716.

59. 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.

60. Frey, C.R., M.A. Sharp, A.S. Min, D.S. Schmid, V. Loparev, and A.M. Arvin. 2003. Identification of CD8<sup>+</sup> T cell epitopes in the immediate early 62 protein (IE62) of varicella-zoster virus, and evaluation of frequency of CD8<sup>+</sup> T cell response to IE62, by use of IE62 peptides after varicella vaccination. *J. Infect. Dis.* 188: 40-52.

61. 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.

62. Montesinos, P., J. Sanz, S. Cantero, I. Lorenzo, G. Martín, S. Saavedra, J. Palau, M. Romero, A. Montava, L. Senent, J. Martínez, I. Jarque, M. Salavert, J. Córdoba, L. Gómez, S. Weiss, F. Moscardó, 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.

63. Ruell, J., C. Barnes, K. Mutton, B. Foulkes, J. Chang, J. Cavet, M. Guiver, L. Menasce, M. Dougal, and R. Chopra. 2007. Active CMV disease does not always correlate with viral load detection. *Bone Marrow Transplant.* 40: 55-61.

64. Sester, M., B.C. Gärtner, U. Sester, M. Girndt, N. Mueller-Lantzsch, and H. Köhler. 2003. Is the cytomegalovirus serologic status always accurate? A comparative analysis of humoral and cellular immunity. *Transplantation* 76: 1229-1230.

65. Benz, C., O. Utermöhlen, A. Wulf, B. Villmow, V. Dries, T. Goeser, U. Koszinowski, and D.H. Busch. 2002. Activated virus-specific T cells are early indicators

of anti-CMV immune reactions in liver transplant patients. *Gastroenterology* 122: 1201-1215.

66. Ziemann, M., S. Krueger, A.B. Maier, A. Unmack, S. Goerg, and H. Hennig. 2007. High prevalence of cytomegalovirus DNA in plasma samples of blood donors in connection with seroconversion. *Transfusion* 47: 1972-1983.

67. Farnault, L., H. Chambost, C. Zandotti, F. Mallet, V. Barlogis, C. Galambrun, G. Michel, and D. Olive. 2012. Early recovery of immunity after cord-blood transplantation in children: qualitative features and impact of cytomegalovirus infection. *Acta Haematol.* 128: 7-16.

68. Venturi, V., H.Y. Chin, T.E. Asher, K. Ladell, P. Scheinberg, E. Bornstein, D. van Bockel, A.D. Kelleher, D.C. Douek, D.A. Price, and M.P. Davenport. 2008. TCR beta-chain sharing in human CD8<sup>+</sup> T cell responses to cytomegalovirus and EBV. *J. Immunol.* 181: 7853-7862.

69. 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.

70. Kennedy, P.G., E. Grinfeld, and J.W. Gow. 1998. Latent varicella-zoster virus is located predominantly in neurons in human trigeminal ganglia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95: 4658-4662.

71. Ludwig, B., F.B. Kraus, R. Allwinn, S. Keim, H.W. Doerr, and S. Buxbaum. 2006. Loss of varicella zoster virus antibodies despite detectable cell mediated immunity after vaccination. *Infection* 34: 222-226.
72. Dobec, M., W. Bossart, F. Kaeppli, and J. Mueller-Schoop. 2008. Serology and serum DNA detection in shingles. *Swiss. Med. Wkly* 138: 47-51.
73. Baiker, A., R. Haase, J. Eberle, M.G. Vizoso Pinto, K.I. Pfrepper, A. Petrich, L. Deml, H. Campe, H. Nitschko, and G. Jaeger. 2010. Early detection of varicella-zoster virus (VZV)-specific T-cells before seroconversion in primary varicella infection: case report. *Viol. J.* 7: 54.
74. Vafai, A., Z. Wroblewska, and L. Graf. 1990. Antigenic cross-reaction between a varicella-zoster virus nucleocapsid protein encoded by gene 40 and a herpes simplex virus nucleocapsid protein. *Virus Res.* 15: 163-174.
75. Kitamura, K., J. Namazue, H. Campo-Vera, T. Ogino, and K. Yamanishi. 1986. Induction of neutralizing antibody against varicella-zoster virus (VZV) by VZV gp3 and cross-reactivity between VZV gp3 and herpes simplex viruses gB. *Virology* 149: 74-82.
76. Edson, C.M., B.A. Hosler, R.A. Respass, D.J. Waters, and D.A. Thorley-Lawson. 1985. Cross-reactivity between herpes simplex virus glycoprotein B and a 63,000-dalton varicella-zoster virus envelope glycoprotein. *J. Virol.* 56: 333-336.
77. Sandalova, E., D. Laccabue, C. Boni, A.T. Tan, K. Fink, E.E. Ooi, R. Chua, B. Shafaeddin Schreve, C. Ferrari, and A. Bertoletti. 2010. Contribution of herpesvirus specific CD8 T cells to anti-viral T cell response in humans. *PLoS Pathog.* 6: e1001051.
78. Malavige, G.N., L.T. Rohanachandra, L. Jones, L. Crack, M. Perera, N. Fernando, D. Guruge, and G.S. Ogg. 2010. IE63-specific T-cell responses associate with control of

subclinical varicella zoster virus reactivation in individuals with malignancies. *Br. J. Cancer* 102: 727-730.

79. 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.

80. Wilson, A., M. Sharp, C.M. Koropchak, S.F. Ting, and A.M. Arvin. 1992. Subclinical varicella-zoster virus viremia, herpes zoster, and T lymphocyte immunity to varicella-zoster viral antigens after bone marrow transplantation. *J. Infect. Dis.* 165: 119-126.

81. Abate, D., S. Cesaro, S. Cofano, M. Fiscon, A. Saldan, S. Varotto, C. Mengoli, M. Pillon, E. Calore, M.A. Biasolo, R. Cusinato, L. Barzon, C. Messina, M. Carli, and G. Palù. 2012. Diagnostic utility of human cytomegalovirus-specific T-cell response monitoring in predicting viremia in pediatric allogeneic stem-cell transplant patients. *Transplantation* 93: 536-542.

### **3.9 Figure legends**

**Table 3.1 Clinical characteristics of study subjects.** ALL: acute lymphoblastic leukemia; MDS: myelodysplastic syndrome; AML: acute myeloid leukemia; FHLH: familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; 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 3.2 Association between frequencies of CMV- or VZV-specific cells producing IFN- $\gamma$ , absolute CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> T cell counts, and frequencies of naïve CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells during the first 6 months post-UCBT.** 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 cell 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; UCBT: umbilical cord blood transplantation.

**Table 3.3 Comparison between VZV-specific IFN- $\gamma$  and antibody production.** 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<sup>6</sup> 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 3. 1 Reconstitution of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in study subjects. 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 (51). The frequency of thymic naïve T cells among CD4<sup>+</sup> T cells (CD45RA<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>) (46) over the post-transplant period was determined by flow cytometry. C. The frequency of naïve T cells among CD8<sup>+</sup> T cells (CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) (45) over the post-transplant period was determined by flow cytometry.

**Figure 3.2 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 3.3 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. B. Reconstitution of total CD3<sup>+</sup> T cells and CMV-specific T cell responses in terms of IFN- $\gamma$  production in 4 subjects who were pre-transplant CMV-seronegative. CD3<sup>+</sup> T cell counts (closed bars) were measured by flow cytometry and frequencies of cells producing IFN- $\gamma$  in response to CMV antigens (open bars) were measured using

IFN- $\gamma$  ELISPOT and expressed as SFU per  $10^6$  PBMC, as described under Materials and Methods. Horizontal arrows represent the periods of time during which patients experienced episodes of positive CMV DNAemia (tested using real-time PCR) and were treated with ganciclovir. CMV: cytomegalovirus; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; ELISPOT: enzyme-linked immunospot assay; SFU: spot-forming units; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; PCR: polymerase chain reaction; nd: not determined.

**Figure 3.4 CMV-specific T cell responses in HLA-A2<sup>+</sup> subjects.** Analysis of CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses was performed HLA-A2-pp65<sub>495-503</sub> peptide-MHC tetramers and flow cytometry, as described under Materials and Methods (42,47). A. Representative dot plots of patients who exhibited both detectable CMV-specific IFN- $\gamma$  production and CMV DNAemia. B. Representative dot plots of patients who exhibited CMV-specific IFN- $\gamma$  production in absence of CMV DNAemia. C. Representative dot plots of patients who neither exhibited CMV-specific IFN- $\gamma$  production nor CMV DNAemia. D. Representative dot plots of healthy controls (left panel: CMV-negative; right panel: CMV-positive). Tetramer staining were performed on microcultures of PBMC after 7-9 days of PHA stimulation in the presence of IL-2, IL-7 and feeder cells, except for healthy controls, in which case tetramer staining was performed on un-manipulated PBMC. CMV: cytomegalovirus; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; MHC: major histocompatibility complex; HLA: human leukocyte antigen; PBMC: peripheral blood mononuclear cells.

**Figure 3.5 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 3.6 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. B. Reconstitution of total CD3<sup>+</sup> T cells and VZV-specific T cell responses in terms of IFN- $\gamma$  production in 4 subjects who did not experience herpes zoster during the post-transplantation period. CD3<sup>+</sup> T cell counts (closed bars) were measured by flow cytometry and frequencies of cells producing IFN- $\gamma$  in response to VZV antigens (open bars) were measured using IFN- $\gamma$  ELISPOT and expressed as SFU per  $10^6$  PBMC, as described under Materials and Methods. Horizontal arrows represent periods of time during which subjects were treated with famciclovir prophylaxis. 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; nd: not determined.

**Tableau 3 1 Clinical characteristics of study subjects**

		n	%	Patient reference ID number
<b>Gender</b>	XX	11	39.3	1,5,7,8,11,12,20,21,22,23,25
	XY	17	60.7	2,3,4,6,9,10,13,14,15,16,17,18,19,24,26,27,30
<b>Hematologic malignancies</b>	ALL	12	42.9	1,3,8,10,13,14,15,17,18,23,27,30
	MDS	8	28.6	5,6,7,9,12,21,22,24
	AML	4	14.3	2,4,20,25
<b>Others</b>	FHLH	1	3.6	11
	Farber disease	1	3.6	16
	Hurler syndrome	1	3.6	19
	WAS	1	3.6	26
<b>UCB graft</b>	1 UCB unit	26	92.9	All but 19,24
	2 UCB units	2	7.1	19,24
<b>HLA disparity</b>	0	8	28.6	1,4,5,6,12,14,23,25
	1	11	39.3	2,3,8,10,11,16,19,20,21,27,30
	2	9	32.1	7,9,13,15,17,18,22,24,26
<b>Prophylaxis</b>	1 yr famciclovir	9	32.1	14,15,17,18,20,22,23,25,27
<b>Outcome</b>	Death	9	32.1	1,2,7,8,12,14,19,23,30
	CMV DNAemia	4	14.3	7,9,12,26
	Zoster (VZV)	5	17.9	2,5,13,15,17
	Other herpetic complications	9	32.1	9,10,11,12,13,15,21,25,27
	Leukemic relapse	9	37.5	1,2,8,12,14,20,22,23,30
	Acute GvHD	4	14.3	17,18,22,24
	Chronic GvHD	1	3.6	21
	Graft failure	3	10.7	1,6,19

**Tableau 3. 2 Association between frequencies of CMV- or VZV-specific cells producing IFN- $\gamma$  absolute CD3+, CD4+, and CD8+ T cell counts, and frequencies of naïve CD8+ and CD4+ T cells during the first 6 months post-UCBT**

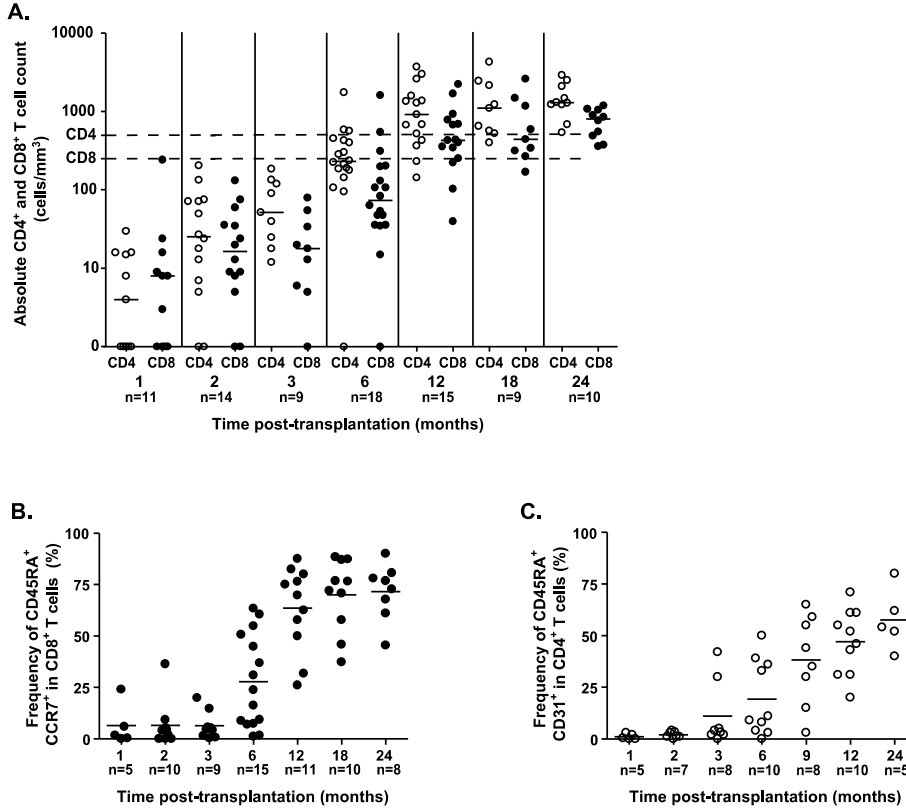
	Absolute CD3+	Absolute CD4+	Absolute CD8+	Naïve CD4+	Naïve CD8+
<b>CMV</b>	p = 0.0471 r = 0.3059 (n=15)	p = 0.0419 r = 0.3210 (n=15)	p = 0.0364 r = 0.3381 (n=15)	p = 0.4737 (n=8)	p = 0.0152 r = 0.4171 (n=14)
<b>VZV</b>	p = 0.0398 r = 0.3369 (n=15)	p = 0.0169 r = 0.4095 (n=15)	p = 0.0335 r = 0.3576 (n=15)	p = 0.1447 (n=7)	p = 0.0132 r = 0.4432 (n=13)

**Tableau 3. 3 Comparison between VZV-specific IFN- $\gamma$  and antibody production**

	Positive IFN- $\gamma$	Positive IgG
P13*	12-36 months	12-36 months
P15*	36 months	24-36 months
P16	Negative	Negative
P17*	6-36 months	12-36 months
P18	3-18 months	Negative
P26	Negative	Negative
P27	negative	21-36 months

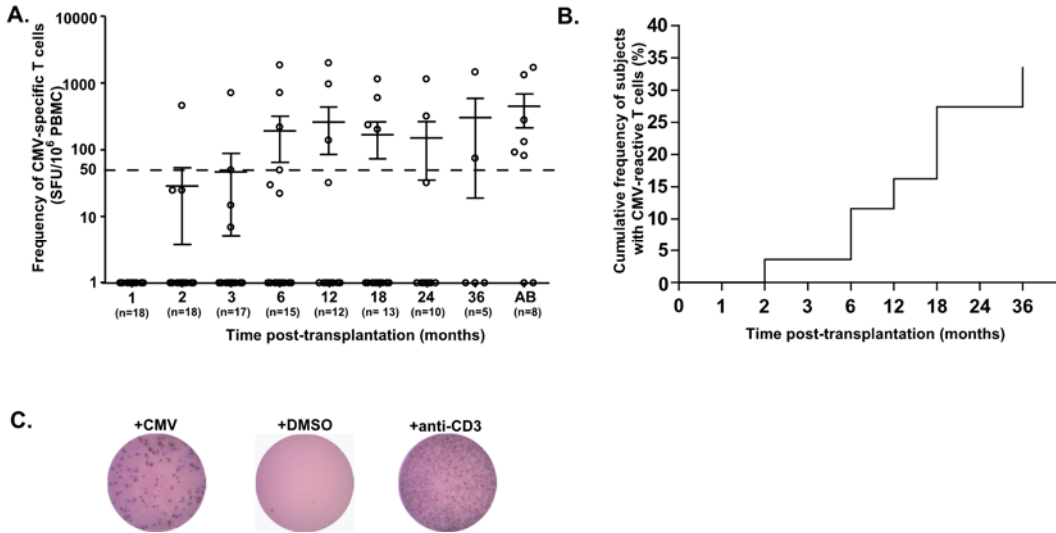
**Figure 3. 1 Reconstitution of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in study subjects**

Merindol *et al.* Figure 1



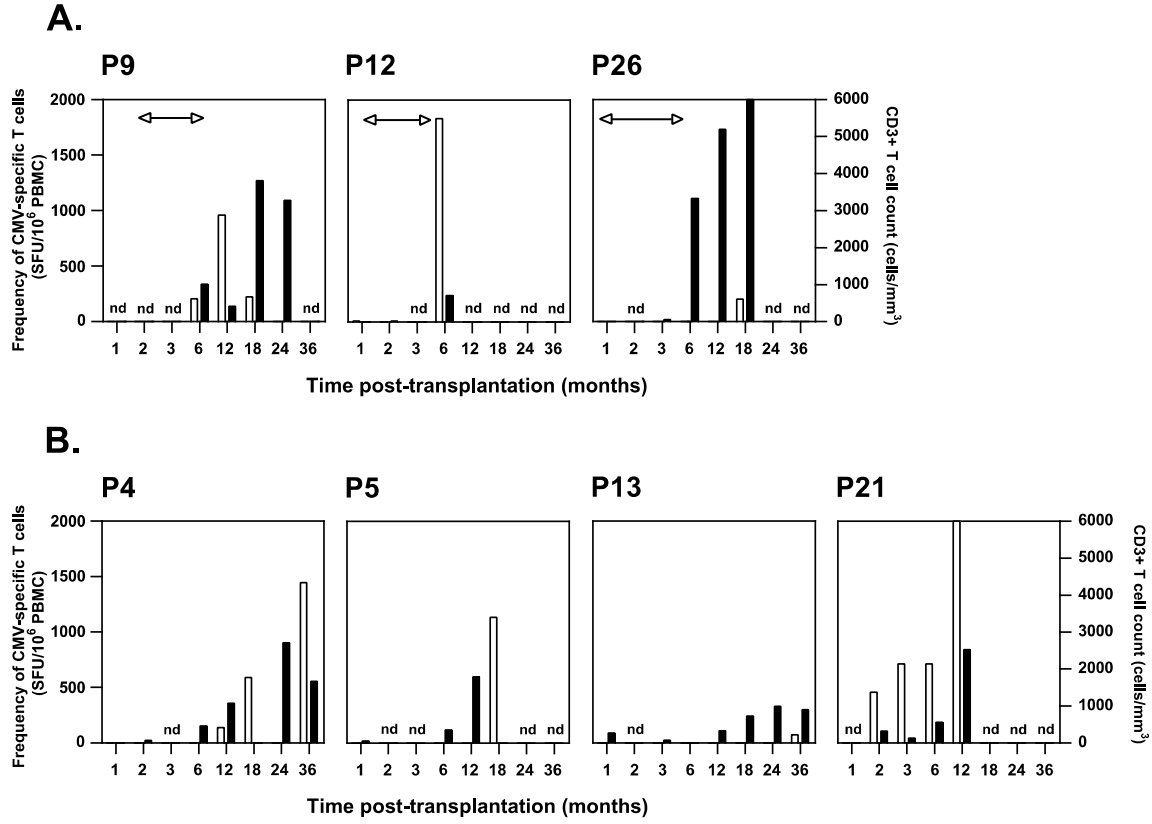
**Figure 3. 2 Reconstitution of CMV-specific T cells over the post-transplant period**

Merindol *et al.* Figure 2



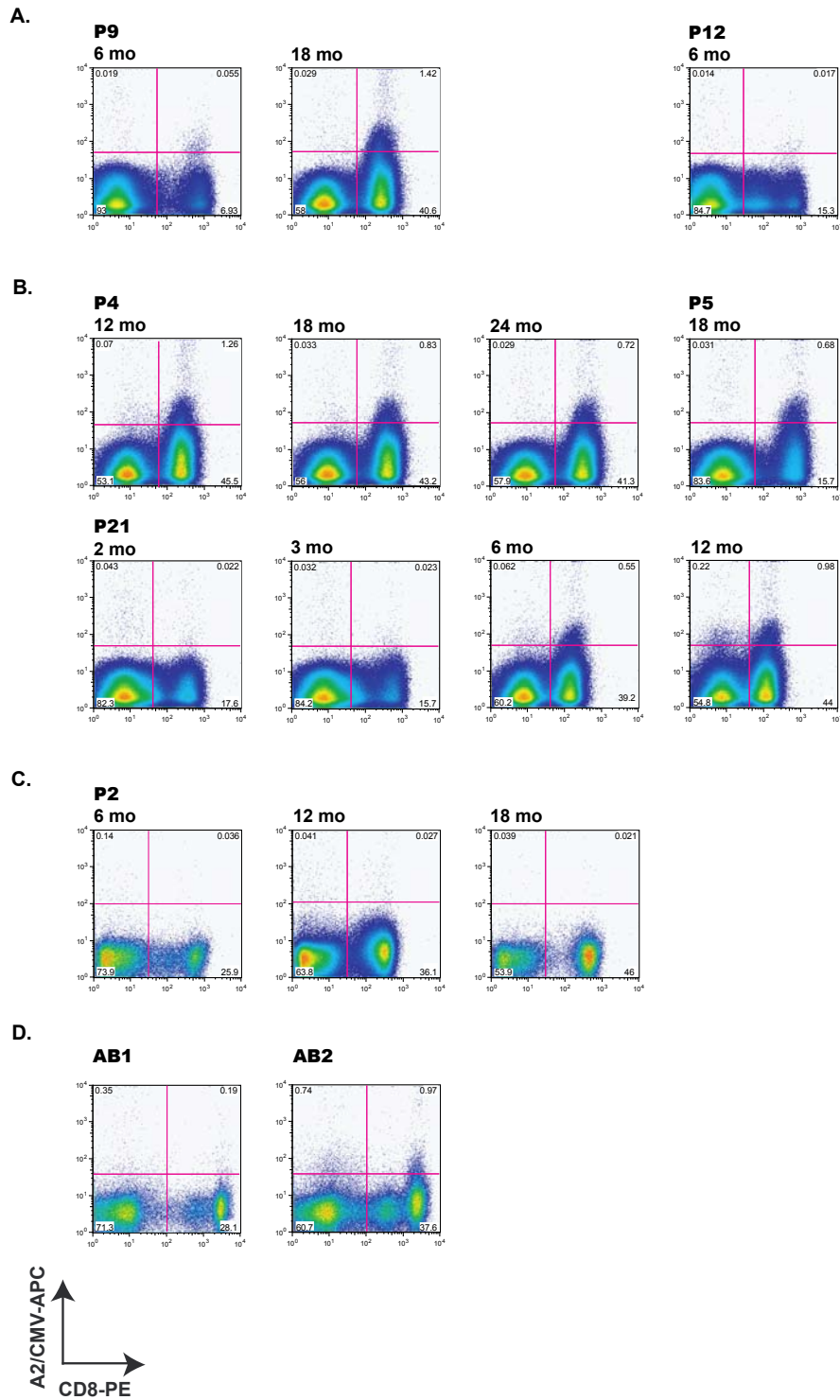
**Figure 3. 3 Reconstitution of CMV-specific T cell responses in recipient of umbilical cord blood transplantation**

Merindol *et al.* Figure 3



**Figure 3. 4 CMV-specific T cell responses in HLA-A2<sup>+</sup> subjects**

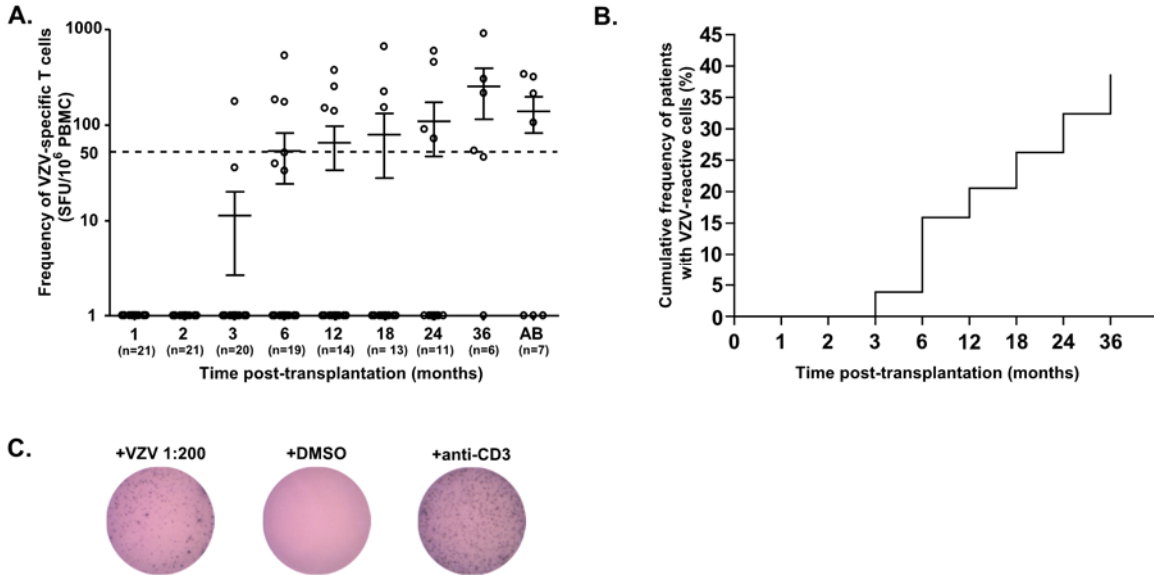
Merindol *et al.* Figure 4





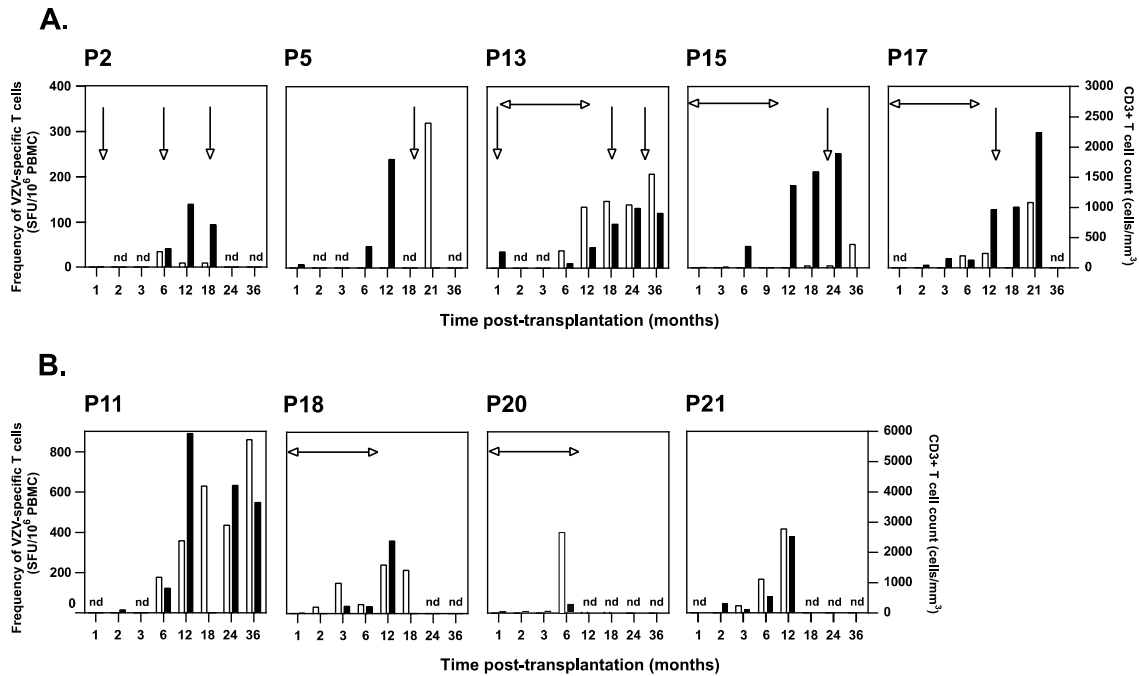
**Figure 3. 5 Reconstitution of VZV-specific T cells over the post-transplant period**

Merindol et al. Figure 5



**Figure 3. 6 Reconstitution of VZV-specific T cell responses in recipient of umbilical cord blood transplantation**

Merindol et al. Figure 6



## **Chapitre 4 Troisième article**

#### **4.1 Mise en contexte et contribution au troisième article**

Nous avons démontré que des réponses antivirales spécifiques au CMV et au VZV pouvaient se développer pendant les 100 premiers jours suivant la TSCO et que des réponses des réponses protectrices en termes de réactivation virale et de développement de la maladie ont été développées chez 10-15% des patients à 6 mois post-TSCO. L'émergence progressive de réponses antivirales renseigne sur la restauration du potentiel fonctionnel des lymphocytes T chez la majorité des patients à 12 mois post-TSCO, qui s'accompagne d'une augmentation de la fréquence des lymphocytes T naïfs. Notre étude a également révélé une réponse suite à une stimulation antigénique chez seulement moins de 5 % des patients. Cette faible fréquence pourrait refléter un dysfonctionnement des lymphocytes T du SCO dans un contexte de lymphopénie profonde qui règne tôt suivant la transplantation. Dans ce troisième article, en accord avec Dr Soudeyns, j'ai émis l'hypothèse de l'expression concomitante de récepteurs inhibiteurs associés à l'épuisement clonal l'épuisement par les lymphocytes T du SCO. J'ai par ailleurs caractérisé la cinétique de leur expression pendant la période de suivi post-greffe de SCO et de MO. J'ai également évalué l'impact de leur expression sur les capacités prolifératives et les fonctions effectrices des lymphocytes T.

Ma contribution à l'article est évaluée à 80% et consiste en la réalisation de toutes les expériences (toutes les figures), l'analyse des résultats, la collecte des données cliniques (Tableau 4.1), l'écriture de l'article, lequel a été révisé par mon directeur de recherche. Des modifications majeures ont été apportées en tenant compte des commentaires donnés par les réviseurs lors de la soumission au *Biology of Blood and Marrow Transplantation*.

**PD-1 expression is associated with CD8<sup>+</sup> T cell dysfunction and clinical outcomes in pediatric recipients of hematopoietic stem cell transplantation.**

Insaf Salem Fourati,<sup>1,3,5</sup> Catherine Gravel,<sup>1,3,5</sup> Natacha Merindol,<sup>1,3,5,7</sup> Martine Caty,<sup>1</sup> Samira Mezziani,<sup>1,2</sup> Armelle Le Campion,<sup>1,3,5</sup> Michel Duval,<sup>2,3,4,6</sup> and Hugo Soudeyns<sup>1,3,5,6</sup>

<sup>1</sup>Unité d'immunopathologie virale, <sup>2</sup>Service d'héματο-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>Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC H3C 3J7, Canada; <sup>8</sup>Héma-Québec, St-Laurent, QC H4R 2W7, Canada; <sup>7</sup>Laboratoire de rétrovirologie, Department of Medical Biology, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC, G9A 5H7, Canada.

**KEY POINTS**

1. High frequencies of CD8<sup>+</sup> T cells expressing combinations of inhibitory receptors are observed after umbilical cord blood transplantation.
2. This was not observed following bone marrow transplantation and was not related to transplantation-associated clinical complications.

## 4.2 Abstract

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is used to treat hematologic and neoplastic disorders in children. It was previously shown that high frequencies of CD8<sup>+</sup> T cells expressed the PD-1 exhaustion marker during the early phases of immune reconstitution in pediatric UCBT recipients and that higher frequencies of PD-1<sup>+</sup> T cells were associated with leukemic relapse. Here, the expression of additional inhibitory receptors known to be associated with CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion, including CTLA-4, 2B4, TIM-3, BTLA and LAG-3, was examined ex vivo using flow cytometry in pediatric patients who underwent UCBT (n=24) or BMT (n=17) over a 24-months follow-up period. All inhibitory receptors tested were expressed at very low levels in UCB graft inoculums. However, a transient increase in the frequency of CD8<sup>+</sup> T cells that expressed PD-1 was observed during the first 100 days post-UCBT. This was barely observed for expression 2B4, BTLA, or LAG-3, or co-expression of multiple inhibitory receptors. In addition, proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells expressing PD-1 was reduced as compared to control cells following stimulation. The phenotypically exhausted T cells, exhibited a reduced cytokine production. These results indicate that expression of exhaustion markers by CD8<sup>+</sup> T cells in UCBT and BMT recipients during the early post-transplant period modulates the activity of these cells, leading to functional impairment.

### 4.3 Introduction

Initially recognized in chronic viral infections, first in mice and then in humans,<sup>1,2</sup> clonal exhaustion is characterized by an ordered, progressive loss of function of T lymphocytes that includes: (i) reduced proliferative capacity; (ii) reduced or absent production of IL-2 and IFN- $\gamma$ ; (iii) loss of the capacity to degranulate and/or kill target cells; and (iv) physical disappearance *per se* of exhausted T cell clones.<sup>3</sup> Driven in part by high levels of cognate antigen,<sup>1,4-6</sup> clonal exhaustion is thought to contribute to the pathogenesis of HIV-AIDS,<sup>7-10</sup> hepatitis B,<sup>11</sup> hepatitis C,<sup>12-14</sup> and cancer.<sup>15-18</sup> T cells undergoing clonal exhaustion exhibit particular cell surface phenotypes, including expression of inhibitory receptors. These regulate various cellular functions (activation, proliferation, cell cycle progression) and exert an active control over the process of clonal exhaustion.<sup>3</sup> Of particular relevance are PD-1 (programmed death 1; CD279),<sup>19-21</sup> CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4; CD152),<sup>22,23</sup> LAG-3 (lymphocyte activation gene 3; CD223),<sup>24-26</sup> TIM-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 3),<sup>27-30</sup> 2B4 (natural killer cell receptor 2B4; CD244),<sup>31,32</sup> and BTLA (B and T lymphocyte attenuator; CD272),<sup>33-37</sup> though other inhibitory receptors (*e.g.* CD160, CD200R) are known to participate in exhaustion to varying degrees.<sup>38</sup> Combinations of inhibitory receptors are commonly co-expressed by cells undergoing exhaustion, leading to more severe functional defects.<sup>3,13,39-43</sup>

Studies in mice and humans showed that antigen persistence, expression of inhibitory receptors (« intrinsic mechanisms »), production of immunosuppressive cytokines (« extrinsic mechanisms »), lack of help from CD4<sup>+</sup> T cells and/or disruption of lymphoid structures are required for the transition to an exhausted phenotype.<sup>44,45</sup> Since all of these

factors are known to be present in the setting of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), whether T cells are pushed towards exhaustion under these conditions should be comprehensively examined. Little is known on inhibitory receptor expression and repertoire early after HSCT and on how these affect T cell proliferation and cytokine production. We and others have provided evidence of high frequencies of CD8<sup>+</sup> T cells expressing PD-1 during the first months following umbilical cord blood (UCB) transplantation (UCBT) or allogeneic HSCT, and that these high levels of PD-1 expression were strongly associated with leukemic relapse.<sup>46,47</sup> Here, phenotypic and functional characterization, including measurement of expression of PD-1, 2B4, BTLA, LAG-3, TIM-3, and CTLA-4, was performed on CD8<sup>+</sup> T cells from the peripheral blood of pediatric patients who received allogeneic HSCT as part of the treatment of malignant or non-malignant blood disorders. Potential associations between inhibitory receptor expression and post-transplant complications (i.e. opportunistic infections [OI]; graft-versus-host disease [GVHD]; graft failure; leukemic relapse) were examined. We report that PD-1 expression by CD8<sup>+</sup> T lymphocytes was associated with a significantly lower capacity of these cells to proliferate and to produce cytokines following polyclonal activation, compatible with the presence of a significant degree of functional impairment.

#### **4.4 Patients, materials, and methods**

**Study subjects.** This study was conducted according to the regulatory standards described in the Helsinki Declaration of 1975 (revised in 2000), and approved by the Institutional Review Board of Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine,

Montreal, Quebec, Canada. Full informed consent was obtained from all study participants, their parents and/or legal guardians. Clinical characteristics of study subjects are summarized in Table 1. Forty one pediatric subjects who underwent single umbilical cord blood (UCB) transplantation (UCBT; n = 20), double unrelated UCBT (n = 4), or bone marrow (BM) transplantation (BMT; n = 17) were enrolled at CHU Sainte-Justine between 2009 and 2015. Median age at transplantation was 9 years (range = 0.6 - 17.4 years). Grafts were not *in vitro* T cell depleted. All UCB units were required to show 4/6 or greater allele-level matches (HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1) with the patient and with each other in the case of double UCBT. For BMT, a match of 9/10 or greater was required (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQ). HSCT recipients received either myeloablative or reduced intensity conditioning regimens. GvHD prophylaxis consisted of cyclosporin A (CsA) and anti-thymocyte globulin (ATG; Thymoglobulin, Genzyme, Cambridge, MA). UCB and venous blood samples (2-10 ml) were obtained from graft inoculums and transplanted subjects at 2, 3, 6, 9, 12, 18 and 24 months after UCBT or BMT. UCB mononuclear cells (UCBMC) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated on Ficoll-Hypaque gradients (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) and cryopreserved in 90% FBS (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Graft failure was defined on the basis of donor chimerism (<5%) and the absolute neutrophil count (<0.5 × 10<sup>9</sup> cells/l at 3 or more consecutive time points). Acute and chronic graft-versus-host disease (GvHD) were diagnosed based on clinical observations in patients with sustained engraftment.<sup>48</sup> Leukemic relapse was defined on the basis of presence of more than 5% blasts in the BM or the presence of leukemic cell at another anatomic site.<sup>49</sup> Subjects who



experienced graft failure or leukemic relapse were withdrawn from the study, and data were censored at the time of the event.

**T cell immunophenotyping.** Phenotypic analysis of CD8<sup>+</sup> T was performed using cryopreserved UCBMC and PBMC without prior culturing. Cells were thawed in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 20% FBS and benzonase nuclease (25 U/ml; Novagen, Madison, WI). Except where mentioned, all antibodies were purchased from BD Biosciences (San Diego, CA). Cells were stained using Alexa Fluor-700 conjugated anti-CD3 (UCHT1), Horizon-V450 (RPA-T8) or APC-H7 (SK1) conjugated anti-CD8, PerCP Cy5.5 conjugated anti-PD-1 (EH1 2.1), PE conjugated anti-BTLA (Biolegend, Burlington, ON, Canada; MIH26), FITC conjugated anti-2B4 (2-69), APC conjugated anti-LAG-3 (R&D systems, Minneapolis, MN), APC conjugated anti-TIM-3 (F38-2E2), PE conjugated anti-CTLA-4 (BNI3), PE-Cy7-conjugated anti-CCR7 (clone 3D12), and Horizon V450-conjugated anti-CD45RA (clone HI100). Antibodies were added and cells were incubated for 30 min at 4°C. Lymphocytes were gated according to forward and side scatter. Compensations were performed using single fluorochromes and logical gates were set using isotype control and fluorescence minus one (FMO) stainings. Events were sequentially gated on CD8<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> T cells (Figure 1A). Acquisition was performed on a BD LSR II flow cytometer using the BD FACSDiva software package (BD Biosciences, San Jose, CA). Analysis was completed using FACSDiva and FlowJo (TreeStar, Ashland, OR).

**Intracellular cytokine staining and degranulation assay.** For assessment of cytokine production and degranulation,  $1 \times 10^6$  PBMC were stimulated with 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of human T-Activator CD3/CD28 Dynabeads (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) and incubated for 1 hour before addition of a mixture of brefeldin A and monensin (eBioscience, San Diego, CA). Cells were incubated for 5 hours at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, were stained for CD3, CD8 and PD-1, and were fixed and permeabilized with Cytotfix/Cytoperm reagents (BD Biosciences). Cells were stained using Alexa Fluor 700-conjugated anti-IFN- $\gamma$  (B17), APC-conjugated anti-IL-2 (MQ1-17H12), and PE-conjugated anti-TNF- $\alpha$  (eBioscience; MAb11) overnight at 4°C, and were then washed twice in Perm/Wash buffer (BD Biosciences). Background frequencies measured in the absence of stimulation were subtracted from each subpopulation. FITC-conjugated anti-human CD107a (H4A3) was added at the beginning of the stimulation. Analysis was completed using FACSDiva and FlowJo. Data on multifunctionality were also analyzed using SPICE version 5.3 (Vaccine Research Center, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, MD).<sup>50</sup>

**Proliferation assays.** To assess T cell proliferative capacity,  $10 \times 10^6$  cells/ml were stained with 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, eBioscience) at a final concentration of 4  $\mu\text{M}$  for 8 min at room temperature. After quenching and washing, cells were incubated for 5 days in presence of 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Human T-Activator CD3/CD28 Dynabeads. Expression of inhibitory receptors was then analyzed in CD8<sup>+</sup> T cells that had diluted the CFSE using flow cytometry. The CFSE dilution factor (f) was estimated as the ratio of the CFSE mean fluorescence intensity (MFI) in non-divided cells (cycle 0) over the CFSE MFI of the entire CFSE<sup>+</sup> subset. Because intracellular amounts

of CFSE are halved during each cell cycle, the average number of cell cycles (A) was calculated using the formula:  $A = \log_2(f)$ .<sup>51</sup>

**Statistical analysis.** Data were presented as median and interquartile range (IQR). The Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test were used to assess the statistical significance of differences between continuous variables. Correlations between variables were tested using the Spearman rank correlation test. p values < 0.05 were considered statistically significant. All analyses were performed using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## 4.5 RESULTS

### *Expression patterns of inhibitory receptors by CD8<sup>+</sup> T cells following HSCT.*

The expression patterns of 6 inhibitory receptors associated with CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion was analyzed in a group of pediatric HSCT recipients (n = 41) during the post-transplantation period (Table I). In all cases, frequencies of cells expressing inhibitory receptors within the CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cell subset were very low in UCB grafts, with 6.40% of CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells expressing PD-1 (IQR = 4.10 - 12.9), 5.25% expressing 2B4 (IQR = 2.25 - 8.70), 0.50% expressing BTLA (range = 0.50 - 1.50), 7.70% expressing LAG-3 (range = 5.00 - 8.10) (Figure 1B, 1C, 1D, 1E), 0.25% expressing TIM-3 (range = 0.00 - 0.50), and 0.40% expressing CTLA-4 (range = 0.10 - 1.90) (Supplemental Figure 1A, 1B). During the first 3 months post-HSCT, a statistically significant increase in the frequency of cells expressing PD-1 within the CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cell subset was consistently observed (p < 0.0001) (Figure 1B). In the case of 2B4, BTLA, and LAG-3, a transient increase in expression was likewise noted but it did not reach statistical significance (p =

0.22,  $p = 0.31$ , and  $p = 0.51$  respectively for 2B4, BTLA, and LAG-3) (Figure 1C, 1D, 1E). In contrast, increased expression of TIM-3 and CTLA-4 was not observed (Supplemental Figure 1C, 1D). Based on these results, subsequent analyses were primarily focused on PD-1 expression. At 3 months post-HSCT, PD-1 was expressed by a sizable proportion of CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells (median = 42.7%, IQR = 29.7 - 65.1). However, statistically significant differences in inhibitory receptor expression in terms of mean fluorescence intensity (MFI) were not observed during the follow-up period ( $p > 0.05$ ) (Supplemental Figure 2A, 2B, 2C, 2D). An important parameter known to influence the fate of CD8<sup>+</sup> T cells is the persistent co-expression of multiple inhibitory receptors.<sup>3,39-43,52</sup> In the present study, co-expression of PD-1 and 2B4, PD-1 and BTLA, and PD-1 and LAG-3 was observed in CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells from HSCT recipients (Supplemental Figure 1A, 1B, 1C). In addition, transient increases in the frequencies of these cells were seen in the early post-transplant period, although observed increases did not meet the statistical significance threshold (Supplemental Figure 2). When aggregating patient data over the entire study period, expression of PD-1 in CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells was inversely correlated with CD8<sup>+</sup> T-cell counts ( $P = 0.057$ ,  $r = 0.3936$ ), which highlights the association between lymphopenia and CD8<sup>+</sup> T cell dysfunction in the first months after HSCT (Figure 1F). Three months after HSCT, the frequency of PD-1<sup>+</sup> cells in the CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> subset was higher in recipients of UCBT than BMT, higher in recipients of unrelated as compared to related HSCT, and higher in patients who did not experience acute GVHD, but none of these differences reached statistical significance (Figure 1G). Reinforcing previous findings,<sup>46,47</sup> the frequency of PD-1<sup>+</sup> cells in the CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> gate was also higher in patients who experienced opportunistic viral infections during the first

3 months post-transplant, as compared with those who did not ( $p = 0.05$ ), and in patients who experienced leukemic relapse ( $p = 0.05$ ).

***PD1 is preferentially expressed on  $T_{EM}$  cells in the first 100 days post-transplantation.***

Cell surface expression of CD45RA and CCR7 was analyzed in CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells during the post-transplantation period, allowing the stratification of CD8 T cells into: 1) naive ( $T_N$ ; CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>); 2) central memory ( $T_{CM}$ ; CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>); 3) effector memory ( $T_{EM}$ ; CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>), and 4) terminally differentiated effectors (effector memory RA;  $T_{EMRA}$ ; CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) (Figure 2A).<sup>53</sup> Low frequencies of  $T_N$  cells (median = 2.8%, IQR = 2.1 – 6.7) and high frequencies of  $T_{EM}$  and  $T_{EMRA}$  (median = 32.2%, IQR = 22.4 – 48.5) and median = 17.7%, IQR = 6.7 – 39.7, respectively) were observed during the first 100 days post-transplantation (Figure 2B). The peak frequency of PD-1 expression was observed in  $T_{EM}$  cells (median = 7.6%, IQR = 1.92 – 16.99), significantly higher than what was observed in  $T_N$  cells (median = 1.7%, IQR = 0.63 – 4.61) ( $p < 0.0001$ , Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test) (Figure 2B). Differences in the maturational state were also observed between PD-1<sup>-</sup> and PD-1<sup>+</sup> subsets of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells. As shown in Figure 2B and 2C, CD8<sup>+</sup> T cells expressing PD-1 were retained in the  $T_{EM}$  subset as compared to PD-1<sup>-</sup> cells, which differentiated into  $T_{EMRA}$  (35.3% for PD-1<sup>-</sup> cells versus 4.48 % for PD-1<sup>+</sup> cells;  $p > 0.05$ ). Our results therefore indicate that differentiation of the circulating T cell compartment along the naïve-effector-memory pathway is skewed towards an increased proportion of phenotypically exhausted CD8<sup>+</sup> T lymphocytes during the first 100 days following HSCT. Finally, no significant difference was observed between the frequency of PD-1-expressing cells in the  $T_{EM}$  subset following UCBT or BMT (Figure 2E), suggesting that

the association between PD-1 expression and the skewed maturation of memory CD8<sup>+</sup> cells might be attributed to acquired rather than intrinsic properties of UCB-derived T cells following their placement into a lymphopenic environment, as compared to their BM-derived counterparts. Moreover, PD-1<sup>+</sup> cells do not co-express CD69, suggesting that PD-1 signaling interferes with TCR stimulation.

***Impact of inhibitory receptor expression on proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells following HSCT.***

Because expression of inhibitory receptors is a marker of CD8<sup>+</sup> T cells exhaustion in chronic viral infection and cancer, the functional relevance of PD-1 expression was examined during follow-up in pediatric HSCT recipients. To do this, PBMC from study subjects were stained with CFSE and stimulated for 5 days with CD3/CD28 Dynabeads (Figure 3A). Frequencies of CD8<sup>+</sup> T cells that achieved at least one cycle of proliferation were then compared in terms of PD-1 expression, and numbers of proliferation cycles were computed. Results showed that the proliferation index of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes was significantly lower in PD-1<sup>+</sup> cells as compared to PD-1<sup>-</sup> cells ( $p = 0.04$ ) (Figure 3B). Finally, no statistically significant differences were noted when proliferation indexes were compared between PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells from UCBT and BMT recipients ( $p = 0.43$ ) (Figure 3C). These results indicate that PD-1 expression reduces the proliferative capacity of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in pediatric HSCT recipients independent of the source of the graft inoculum. Similar results were obtained when expression of BTLA, and LAG-3 was examined using an identical experimental procedure (Figure 3A). Therefore, the expression of PD-1 and other inhibitory receptors during the post-transplantation period could be an indicator of reduced functional competence compatible with an

ongoing T cell exhaustion process.

***Expression of PD-1 affects the ability of CD8<sup>+</sup> T cells to produce cytokines during the early post-transplantation period.***

Sustained expression of PD-1 has been correlated with hierarchical dysfunction of their proliferative capacity, loss of effector functions, and increased apoptosis.<sup>54</sup> Hence, to ascertain whether expression of PD-1 by CD8<sup>+</sup> T lymphocytes during the early post-transplant period leads to functional impairment, we assessed the ability of these cells to degranulate and to produce IL-2, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  in response to polyclonal stimulation with CD3/CD28 Dynabeads (Figure 4A). Much lower frequencies of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells produced IFN- $\gamma$ , IL-2, and TNF- $\alpha$  compared to PD-1<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (0.5% versus 3.5% for IFN- $\gamma$ ; 0.12% versus 1.0% for IL-2; 1.8% versus 6.75% for TNF- $\alpha$ ) (Figure 4B). In addition, a larger frequency of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells retained the capacity to degranulate as compared to production of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and, lastly, IL-2. In contrast, equivalent frequencies of PD-1<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were capable of degranulation, IFN- $\gamma$  production and TNF- $\alpha$  production, while less produced IL-2 (Figure 4B). Monofunctional, bifunctional, and trifunctional CD8<sup>+</sup> T cells were observed in both the PD-1<sup>+</sup> and PD-1<sup>-</sup> subpopulations, (Figure 4C). However, the proportions of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells that expressed 1 function or 2 functions were lower than those observed in PD-1<sup>-</sup> cells the first 3 months post-transplantation ( $p > 0.05$ ) (Figure 4D). Therefore, PD-1 expression is associated with impaired degranulation, cytokine production, and polyfunctionality of CD8<sup>+</sup> T cells following HSCT.

## 4.6 Discussion

Over the last decade, several studies have linked expression of immune checkpoint molecules to T cell exhaustion both in mouse models and patients in various pathological conditions. Sustained expression of different inhibitory receptors has been associated not only with phenotypic changes but also with functional defects of CD8<sup>+</sup> T cells.<sup>3,54</sup> Importantly, studies on T cell exhaustion have been largely focused on viral infections and cancer, and there is a paucity of knowledge regarding inhibitory receptor expression and its consequences following HSCT. The aim of the present study was to identify exhaustion biomarkers or combinations thereof that are expressed by CD8<sup>+</sup> T cells during the post-transplant period and could predispose patients to develop clinical complications. Several original observations were reported that shed new light on the T cell exhaustion process following HSCT. (1) All inhibitory receptors tested were expressed at very low levels in graft inoculums, although we did not have consistent access to these samples in the case of the BMT procedures. (2) A transient increase in the frequency of CD8<sup>+</sup> T cells that expressed PD-1 was observed during the first 100 days post-HSCT. Although similar kinetics of expression were also observed in the case of 2B4, BTLA, and LAG-3, these variations were not statistically significant. (3) The frequencies of CD8<sup>+</sup> T<sub>N</sub> and T<sub>EMRA</sub> were lower in the PD-1<sup>+</sup> subset as compared with PD-1<sup>-</sup> T cells. The paucity of PD-1<sup>+</sup> T<sub>N</sub> cells is compatible with the role of PD-1 in T cell activation, hence transition of these cells out of the naïve pool. The comparatively low frequency of PD-1<sup>+</sup> T<sub>EMRA</sub> suggests that cells are lost at the T<sub>EM</sub> stage or that there is a blockage in the T<sub>EM</sub>-T<sub>EMRA</sub> transition. These data are also compatible with a rapid loss of cells once they enter the T<sub>EMRA</sub> stage. Examining antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell subpopulations instead of total CD8<sup>+</sup> T cells and



tracking discrete T cell receptor clonotypes throughout the naïve-effector-memory differentiation process<sup>55</sup> could allow us to distinguish between these two possibilities. (4) PD-1 expression was found to negatively influence the proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells. In addition, PD-1<sup>+</sup> cells in the CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> gate produced low levels of IL-2, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , as compared with PD-1<sup>-</sup> cells. The polyfunctionality of PD-1<sup>+</sup> cells was likewise reduced, with frequencies of monofunctional and bifunctional cells being significantly lower than those found in their PD-1<sup>-</sup> counterparts. These observations and measurements are fully consistent with these cells having entered the clonal exhaustion process. (5) High frequency of CD8<sup>+</sup> cells expressing PD-1 was not associated with the incidence of acute GVHD, a major, often hard to treat complication of HSCT. However, high frequencies of PD-1 expression in CD8<sup>+</sup> T cells was associated with the occurrence of opportunistic viral infections and leukemic relapse in the post-HSCT period. Taken together, these results suggest that expression of PD-1 and possibly other inhibitory receptors and combinations thereof leads to functional impairment of CD8<sup>+</sup> T cells in pediatric HSCT recipients. In turn, this functional impairment, which involves key functions of CD8<sup>+</sup> T cells such as secretion of effector cytokines and degranulation, compromises virus-specific and antitumoral cell-mediated immunity in these patients, leading to adverse clinical outcomes.

There are several limitations to the present study. First of all, we were only able to examine a small group of subjects (n = 41), even though this is arguably a sizable number when compared to other recent studies in the field.<sup>47</sup> Second, BMT and UCBT recipients were grouped together in the analysis, while it is well-established that BM and UCB are intrinsically different as sources of HSC, and that the two procedures exhibit different

characteristics in terms of engraftment, immune reconstitution, and post-transplant complications, including opportunistic infections, graft rejection, and GVHD.<sup>56</sup> In addition, there was significant heterogeneity between subjects in terms of underlying medical conditions, conditioning (myeloablative vs non-myeloablative; administration of ATG), GVHD prophylaxis, HLA disparity, and post-transplantation complications and outcomes. Additional studies will be required to sort out the effects associated with these potential confounders. Third, the study was conducted using bulk PBMC and explored the entire CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cell subset rather than examining antigen-specific subpopulations. Fourth, while we were able to assess expression frequencies of six different inhibitory receptors that are arguably capable of mediating important biologic functions, other molecules of interest could not be examined, including CD160, CD200R,<sup>38</sup> VISTA,<sup>57</sup> TIGIT,<sup>58</sup> and CD112R.<sup>59</sup>

In summary, the present study provides for the first time a detailed documentation on the expression patterns of major inhibitory receptors by CD8<sup>+</sup> T cells following HSCT. A more thorough understanding of the involvement of these molecules in T cell dysfunction following HSCT may provide a rationale for blocking multiple inhibitory receptors with the aim of improving T cell-mediated immune responses, particularly those directed against viruses and tumors, while avoiding graft rejection and/or induction of GVHD. Many components of the post-HSCT microenvironment in the host would also merit examination, including the role additional soluble factors (IL-10, TGF- $\beta$ ) and regulatory T cells. Finally, identifying the basis of the differences in behavior between UCB-derived and BMT-derived CD8<sup>+</sup> T cells in the post-transplant period could lead to a better understanding of T cell development and immune reconstitution in humans.

## 4.6 Acknowledgements

1Supported by grants from le Fonds de la recherche du Québec-santé (FRQS) (M.D., H.S.), la Fondation Centre de cancérologie Charles-Bruneau (M.D., H.S.), and The Leukemia & Lymphoma Society of Canada (LLSC) (M.D., H.S.). I.S.F. was the recipient of scholarships from la Fondation CHU Sainte-Justine and FRQS. C.G. was the recipient of a scholarship from FRQS. N.M. was the recipient of scholarships from the Cole Foundation, la Fondation CHU Sainte-Justine and FRQS.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

I.S.F., C.G., M.C., and N.M. performed research; S.M. provided essential reagents and tools; I.S.F., M.D., and H.S. designed research; I.S.F., A.L.C., and H.S. analyzed data and wrote the manuscript.

## 4.7 References

1. Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 1993;362(6422):758-761.
2. Pantaleo G, Soudeyns H, Demarest JF, et al. Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cell clones during primary HIV infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1997;94(18):9848-9853.
3. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 2011;12(6):492-499.

4. Mitchison NA. Induction of immunological paralysis in two zones of dosage. *Proc. R. Soc. London* 1964;161:275-292.
5. Fuller MJ, Zajac AJ. Ablation of CD8 and CD4 T cell responses by high viral loads. *J. Immunol.* 2003;170(1):477-486.
6. Mueller SN, Ahmed R. High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2009;106(21):8623-8628.
7. 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.
8. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat. Med.* 2006;12(10):1198-1202.
9. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell survival in HIV infection. *J. Exp. Med.* 2006;203(10):2281-2292.
10. Zhang JY, Zhang Z, Wang X, et al. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8<sup>+</sup> T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood* 2007;109(11):4671-4678.
11. Schurich A, Khanna P, Lopes AR, et al. Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-prone CD8 T cells in persistent hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2011;53(5):1494-1503.

12. Radziewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML, et al. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J. Virol.* 2007;81(6):2545-2553.
13. Bengsch B, Seigel B, Ruhl M, et al. Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8<sup>+</sup> T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *PLoS Pathog.* 2010;6(6):e1000947.
14. Raziorrouh B, Ulsenheimer A, Schraut W, et al. Inhibitory molecules that regulate expansion and restoration of HCV-specific CD4(+) T cells in patients with chronic infection. *Gastroenterology* 2011;141(4):1422-1431.
15. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 2009;114(8):1537-1544.
16. Fourcade J, Kudela P, Sun Z, et al. PD-1 is a regulator of NY-ESO-1-specific CD8<sup>+</sup> T cell expansion in melanoma patients. *J. Immunol.* 2009;182(9):5240-5249.
17. Mumprecht S, Schurch 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.
18. Kim YJ, Park SJ, Broxmeyer HE. Phagocytosis, a potential mechanism for myeloid-derived suppressor cell regulation of CD8<sup>+</sup> T cell function mediated through programmed cell death-1 and programmed cell death-1 ligand interaction. *J. Immunol.* 2011;187(5):2291-2301.

19. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992;11(11):3887-3895.
20. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2008;26:677-704.
21. 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.
22. Bour-Jordan H, Esensten JH, Martinez-Llordella M, Penaranda C, Stumpf M, Bluestone JA. Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunol. Rev.* 2011;241(1):180-205.
23. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995;3(5):541-547.
24. Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J. Exp. Med.* 1990;171(5):1393-1405.
25. Huard B, Mastrangeli R, Prigent P, et al. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1997;94(11):5744-5749.

26. Sierro S, Romero P, Speiser DE. The CD4-like molecule LAG-3, biology and therapeutic applications. *Expert Opin. Ther. Targets* 2011;15(1):91-101.
27. Geng H, Zhang GM, Li D, et al. Soluble form of T cell Ig mucin 3 is an inhibitory molecule in T cell-mediated immune response. *J. Immunol.* 2006;176(3):1411-1420.
28. Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 2008;205(12):2763-2779.
29. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* 2005;6(12):1245-1252.
30. Hafler DA, Kuchroo V. TIMs: central regulators of immune responses. *J. Exp. Med.* 2008;205(12):2699-2701.
31. Kambayashi T, Assarsson E, Chambers BJ, Ljunggren HG. Cutting edge: Regulation of CD8(+) T cell proliferation by 2B4/CD48 interactions. *J. Immunol.* 2001;167(12):6706-6710.
32. Liu D, Krummey SM, Badell IR, et al. 2B4 (CD244) induced by selective CD28 blockade functionally regulates allograft-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses. *J. Exp. Med.* 2014;211(2):297-311.
33. Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* 2003;4(7):670-679.
34. Murphy KM, Nelson CA, Sedý JR. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nat. Rev. Immunol.* 2006;6(9):671-681.

35. M'Hidi H, Thibault ML, Chetaille B, et al. High expression of the inhibitory receptor BTLA in T-follicular helper cells and in B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 2009;132(4):589-596.
36. Hobo W, Norde WJ, Schaap N, et al. B and T lymphocyte attenuator mediates inhibition of tumor-reactive CD8<sup>+</sup> T cells in patients after allogeneic stem cell transplantation. *J. Immunol.* 2012;189(1):39-49.
37. Fourcade J, Sun Z, Pagliano O, et al. CD8(+) T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res.* 2012;72(4):887-896.
38. Crawford A, Wherry EJ. The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* 2009;21(2):179-186.
39. Jin HT, Anderson AC, Tan WG, et al. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010;107(33):14733-14738.
40. Zhou Q, Munger ME, Veenstra RG, et al. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8<sup>+</sup> T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood* 2010;117(17):4501-4510.



41. Vezys V, Penaloza-Macmaster P, Barber DL, et al. 4-1BB Signaling synergizes with programmed death ligand 1 blockade to augment CD8 T cell responses during chronic viral infection. *J. Immunol.* 2011;187(4):1634-1642.
42. Buggert M, Tauriainen J, Yamamoto T, et al. T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8<sup>+</sup> T cells in HIV infection. *PLoS Pathog.* 2014;10(7):e1004251.
43. Yamamoto T, Price DA, Casazza JP, et al. Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell exhaustion in HIV infection. *Blood* 2011;117(18):4805-4815.
44. Zeng M, Smith AJ, Wietgreffe SW et al. Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections. *J Clin Invest.* 2011;121(3):998-1008.
45. Crawford A, Angelosanto JM, Kao C et al. Molecular and transcriptional basis of CD4<sup>+</sup> T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity.* 2014 ; 20;40(2):289-302.
46. Merindol N, Champagne MA, Duval M, Soudeyns H. CD8(+) T-cell reconstitution in recipients of umbilical cord blood transplantation and characteristics associated with leukemic relapse. *Blood* 2011;118(16):4480-4488.
47. Kong Y, Zhang J, Claxton DF, et al. PD-1(hi)TIM-3(+) T cells associate with and predict leukemia relapse in AML patients post allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cancer J.* 2015;5:e330.

48. Vigorito AC, Campregher PV, Storer BE, Carpenter PA, Moravec CK, Kiem HP, Fero ML, Warren EH, Lee SJ, Appelbaum FR, Martin PJ, Flowers ME. Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD. *Blood*. 2009 ;114(3):702-8.
49. 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):605-611.
50. Roederer M1, Nozzi JL, Nason MC. SPICE: exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytometry A*. 2011;79(2):167-174.
51. Le Campion A, Pommier A, Delpoux A, et al. IL-2 and IL-7 determine the homeostatic balance between the regulatory and conventional CD4<sup>+</sup> T cell compartments during peripheral T cell reconstitution. *J. Immunol*. 2012;189(7):3339-3346.
52. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, et al. Coregulation of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol*. 2009;10(1):29-37.
53. 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.
54. Wherry EJ et al. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*. 2015 : (15)486–499.

55. 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.
56. Merindol N, Charrier E, Duval M, Soudeyans H. Complementary and contrasting roles of NK cells and T cells in pediatric umbilical cord blood transplantation. *J. Leukoc. Biol.* 2011;90(1):49-60.
57. Lines JL, Pantazi E, Mak J, et al. VISTA is an immune checkpoint molecule for human T cells. *Cancer Res.* 2014;74(7):1924-1932.
58. Chew GM, Fujita T, Webb GM3, et al. TIGIT marks exhausted T cells, correlates with disease progression, and serves as a target for immune restoration in HIV and SIV infection. *PLoS Pathog.* 2016;12(1):e1005349.
59. Zhu Y, Paniccia A, Schulick AC, et al. Identification of CD112R as a novel checkpoint for human T cells. *J. Exp. Med.* 2016;213(2):167-176.

## 4.8 Figure legends

**Table 4.1 Clinical characteristics of study subjects.** AML: Acute myeloid leukemia; ALL: Acute lymphoblastic leukemia; MDS: Myelodysplastic syndrome; WAS: Wiskott-Aldrich syndrome; UCB: Umbilical cord blood; GvHD: Graft versus host disease; CGD: Chronic granulomatous disease; AAS: Acute aortic syndrome; SCD: Sickle Cell Disease; ATG: Anti-thymocyte globulin

**Figure 4.1 Expression pattern of single inhibitory receptors by CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells in pediatric recipients of HSCT.** A. Flow cytometric analysis was performed as described under Materials and Methods. A. The lymphocyte gate was set based on forward (FSC) and side scatter (SSC). CD8<sup>hi</sup> cells were selected to exclude CD8<sup>+</sup> natural killer (NK) cells. CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> cells were retained for analysis. Gates for cells expressing PD-1, 2B4, BTLA and LAG-3 were set using fluorescence minus one (FMO) stainings and isotype control. Shown are results obtained with a single representative study subject. Frequencies of CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells expressing PD-1 (B), 2B4 (C), BTLA (D), LAG-3 (E) were measured *ex vivo* over 24 months of follow-up post-HSCT, as described under Materials and Methods. Statistical significance of differences between frequencies was tested using the Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons test. p values < 0.05 were considered statistically significant. n: number of subjects. G: graft inoculum. HC: healthy control subjects. F. Absolute CD8<sup>+</sup> T cell counts and frequencies of PD-1 in CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells expressing were measured *ex vivo* using flow cytometry over 24 months of follow-up post-UCBT. Statistical significance was tested using Spearman's correlation test. p values < 0.05 were considered statistically significant. G. Clinical outcomes were recorded in pediatric HSCT recipients over 3 months of follow-up relative to the time of transplantation, including graft-versus-host disease, viral infections, and leukemic relapse.

**Figure 4.2 PD-1 is preferentially expressed on T<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> T cells in pediatric recipients of HSCT during the first 100 days after transplantation.** A. Flow cytometric analysis was performed as described under Materials and Methods. Gates

were set using fluorescence minus one (FMO) stainings. Shown are results obtained with a single representative study subject during the first 100 days after transplantation. HSCT recipients had an increased frequency of T<sub>EM</sub> cells (B) and expression of PD-1 was highest on T<sub>EM</sub> subset and was lowest on T<sub>N</sub> cells and T<sub>CM</sub> at 100 days post-HSCT (Combined data of 10 patients) (B, C). Boxes represent the median and interquartile range (IQR). (D) CD8<sup>+</sup> T lymphocytes expressing PD-1 do not co-express CD69. p values < 0.05 were considered statistically significant. Pie charts represent frequencies of PD-1<sup>+</sup> and PD-1<sup>-</sup> cells on naïve, CM, EM and EMRA CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T cells measured *ex vivo* in HSCT recipients

**Figure 4.3 Expression of PD-1 affects the proliferative capacity of CD8<sup>+</sup> T cells following HSCT.** Measurement of PD-1 expression by flow cytometry, *in vitro* stimulation with anti-CD3/CD28 beads, and 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) staining were performed as described under Materials and Methods. (A) Typical density plots showing proliferation of CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells from UCBT recipients (top panels) or BMT recipients (bottom panels) expressing PD-1. Proliferation of cells from HSCT recipients was expressed as the relative frequency of CFSE<sup>low</sup> cells that expressed (+) or not (-) PD-1. Colored bars are proportional to the frequency of CFSE-positive cells having undergone discrete numbers of proliferation cycles. Numbers in parentheses represent time post-transplantation. (B, C) Comparison of proliferation index of PD-1<sup>+</sup> and PD-1<sup>-</sup> cells following UCBT and BMT.

**Figure 4.4 Expression of PD-1 impaired cytokine production of CD8<sup>+</sup> T cell following HSCT**

(A) Representative density plots of IFN- $\gamma$ , IL-2, and TNF- $\alpha$  and CD107a gated on PD-1<sup>+</sup> and PD-1<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells. Intracellular staining for IFN- $\gamma$ , IL-2, and TNF- $\alpha$  was performed on PBMC from HSCT recipients, during the first 100 days following transplantation, after stimulation with anti-CD3/anti-CD28 dynabeads. Background frequencies measured in the absence of cognate peptide were subtracted. (B, C) Frequencies of cells exhibiting one, two or 3 functions gated on CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> cells. (D) Frequencies of cells expressing IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  or CD107a gated on CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> cells. Boxes represent the median and interquartile range (IQR). Whiskers represent the range of values. Statistical significance of differences between frequencies was tested using the Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons test. p values < 0.05 were considered statistically significant.

**Figure 4.5 Supplemental Figure 1 Dual expression of inhibitory receptors and single expression of CTLA-4 and LAG-3 by CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells in pediatric recipients of umbilical cord blood transplantation (UCBT).** Frequencies of CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T cells expressing inhibitory receptors were measured *ex vivo* using flow cytometry over 24 months of follow-up post-UCBT, as described under Materials and Methods. A. PD-1 and 2B4. B. PD-1 and BTLA. C. PD-1 and LAG-3. D. Tim-3, E. CTLA-4. Boxes represent the median and interquartile range (IQR). Whiskers represent the range of values. Statistical significance of differences between frequencies was tested using the Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons test. p values < 0.05 were

considered statistically significant. n: number of subjects. G: graft inoculum. HC: healthy control subjects.

**Figure 4.6 Supplemental Figure 2 Mean fluorescence intensity of inhibitory receptors in pediatric recipients of umbilical cord blood transplantation (UCBT).**

Expression level of A. PD-1, B. 2B4, C. BTLA and, D. LAG-3 were measured *ex vivo* using flow cytometry over 24 months of follow-up post-UCBT, as described under Materials and Methods. Whiskers represent the range of values. Statistical significance of differences between frequencies was tested using the Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons test. p values < 0.05 were considered statistically significant. n: number of subjects. G: graft inoculum.

**Tableau 4. 1 Clinical characteristics of study subjects**

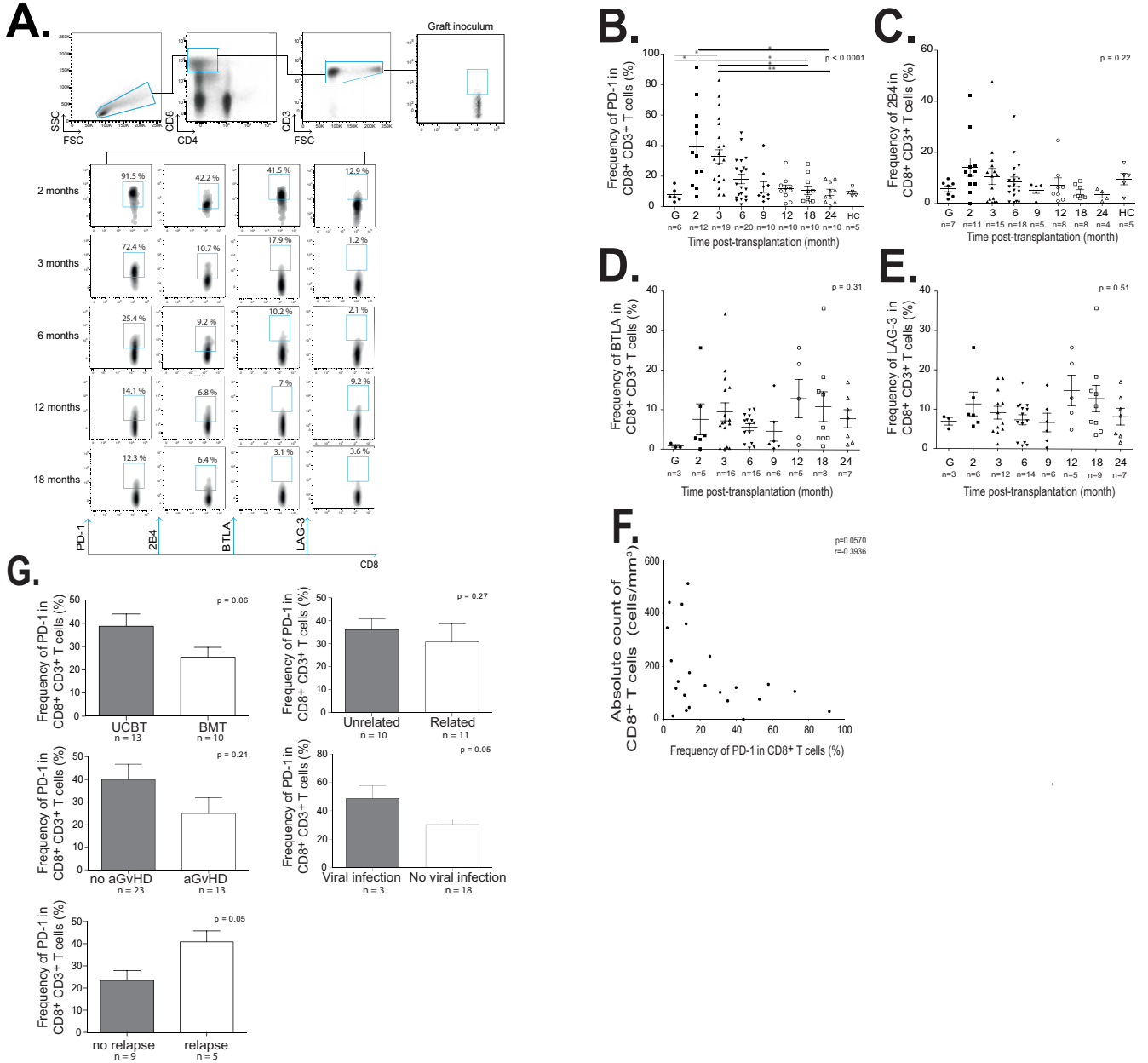
		<i>n</i>	%	<i>Patients ID</i>
<i>Graft type</i>	BMT	17	41	P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P28, P30, P36, P38, P39, P40, P41
	Single UCB unit	20	49	P1, P2, P3, P4, P5, P7, P9, P10, P11, P12, P13, P15, P16, P26, P27, P31, P32, P33, P34, P35, P37
	Double UCB unit	4	10	P6, P8, P14
	Related Graft	18	44	P17, P18, P19, P21, P22, P23, P24, P27, P28, P29, P32, P38, P39, P40, P41
	Unrelated Graft	23	63	P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P20, P25, P26, P30, P31, P33, P34, P35, P36, P37
<i>Gender</i>	XY	21	51	P6, P7, P8, P9, P10, P14, P17, P18, P20, P23, P24, P25, P27, P28, P29, P30, P32, P33, P37, P39, P40
	XX	20	49	P1, P2, P3, P4, P5, P11, P12, P13, P15, P16, P19, P21, P22, P26, P31, P34, P35, P36, P38, P41
<i>Indication</i>	AML	8	19	P1, P2, P4, P5, P15, P22, P24, P31, P40
	ALL	13	32	P6, P7, P10, P12, P16, P19, P25, P29, P30, P33, P34, P35
	MDS	3	7	P9, P11, P13
	Hurler disease	3	7	P3, P14, P15
	WAS	1	2	P9
	CGD	4	10	P17, P18, P20, P23
	AAS	2	5	P21, P39
	Thalasseмии	1	2	P36
	SCD	3	7	P26, P27, P32
	Other indications	3	7	P28, P38, P41
<i>ATG in conditioning</i>	Yes	24	58	P1, P2, P3, P4, P5, P11, P12, P13, P15, P16, P21, P25, P26, P27, P31, P32, P36, P39
	No	17	41	P17, P18, P19, P22, P23, P24, P28, P29, P30, P33, P34, P35, P37, P38, P40, P41
<i>HLA mismatch</i>	0	24	58	P1, P3, P4, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P31, P32, P36, P38, P39, P40, P41
	1	10	22	P2, P7, P8, P10, P11, P12, P14, P23, P30, P34
	2	7	25.0	P5, P9, P33, P37
<i>Outcome</i>	Acute GvHD	16	39	P6, P7, P8, P10, P11, P14, P18, P25, P26, P28, P30, P34, P35 P41
	Chronic GvHD	2	5	P34, P35
	Leukemic relapse	5	15	P12, P13, P16, P24, P34
	Graft Failure	3	7	P2, P5, P14
	Viral infection during the 100 days after HSCT	15	37	P1, P2, P4, P9, P10, P11, P15, P19, P20, P23, P27, P28, P32, P36, P41
	Mortality	3	5	P12, P13, P16

AML: Acute myeloid leukemia; ALL: Acute lymphoblastic leukemia; MDS: Myelodysplastic syndrome; WAS: Wiskott-Aldrich syndrome; UCB: Umbilical cord blood; GvHD: Graft versus host disease; CGD: Chronic granulomatous disease; AAS: Acute aortic syndrome; SCD: Sickle Cell Disease; ATG: Anti-thymocyte globulin



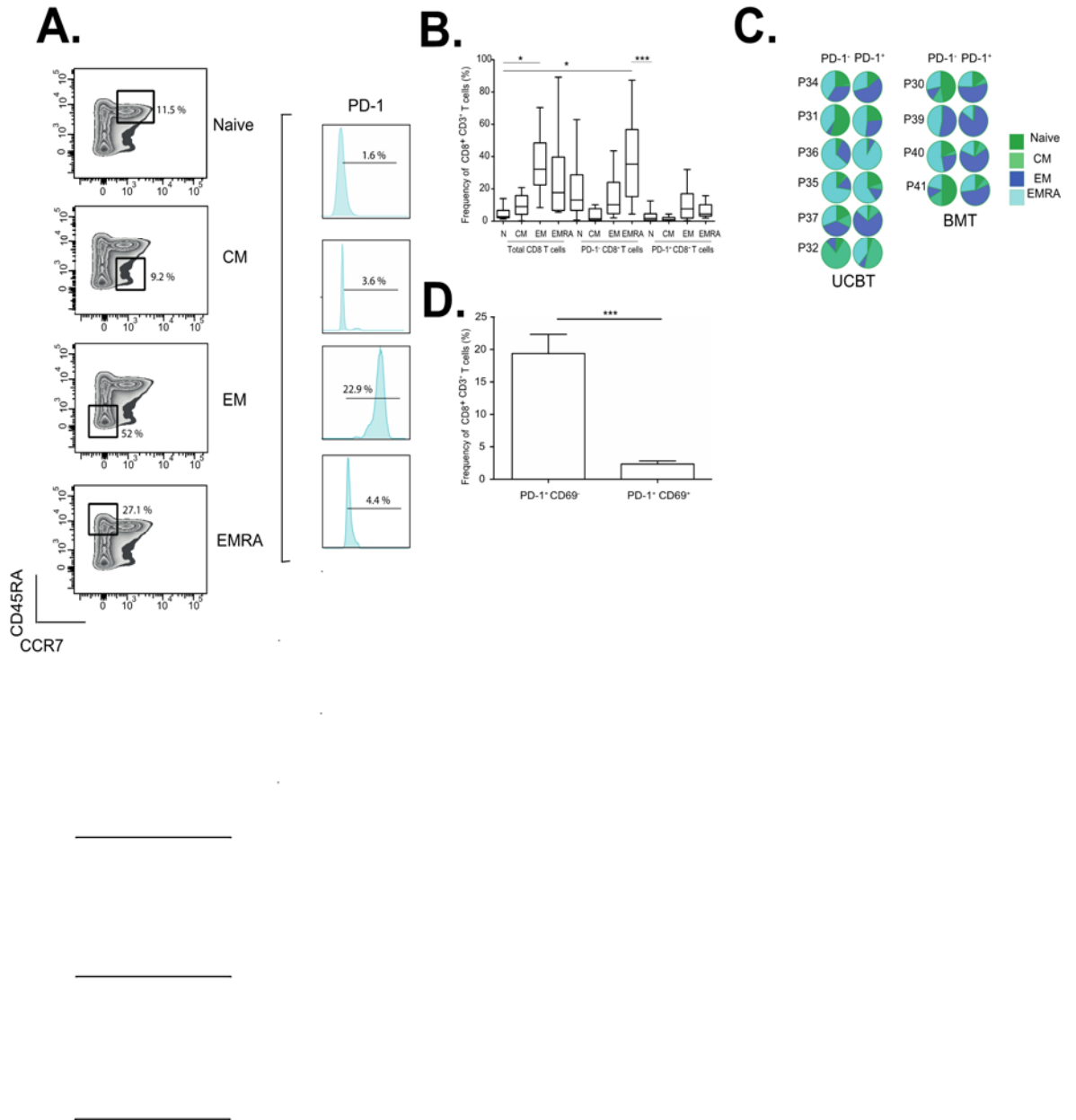
**Figure 4. 1 Expression pattern of single inhibitory receptors by CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells in pediatric recipients of HSCT**

Salem Fourati et al. Figure 1



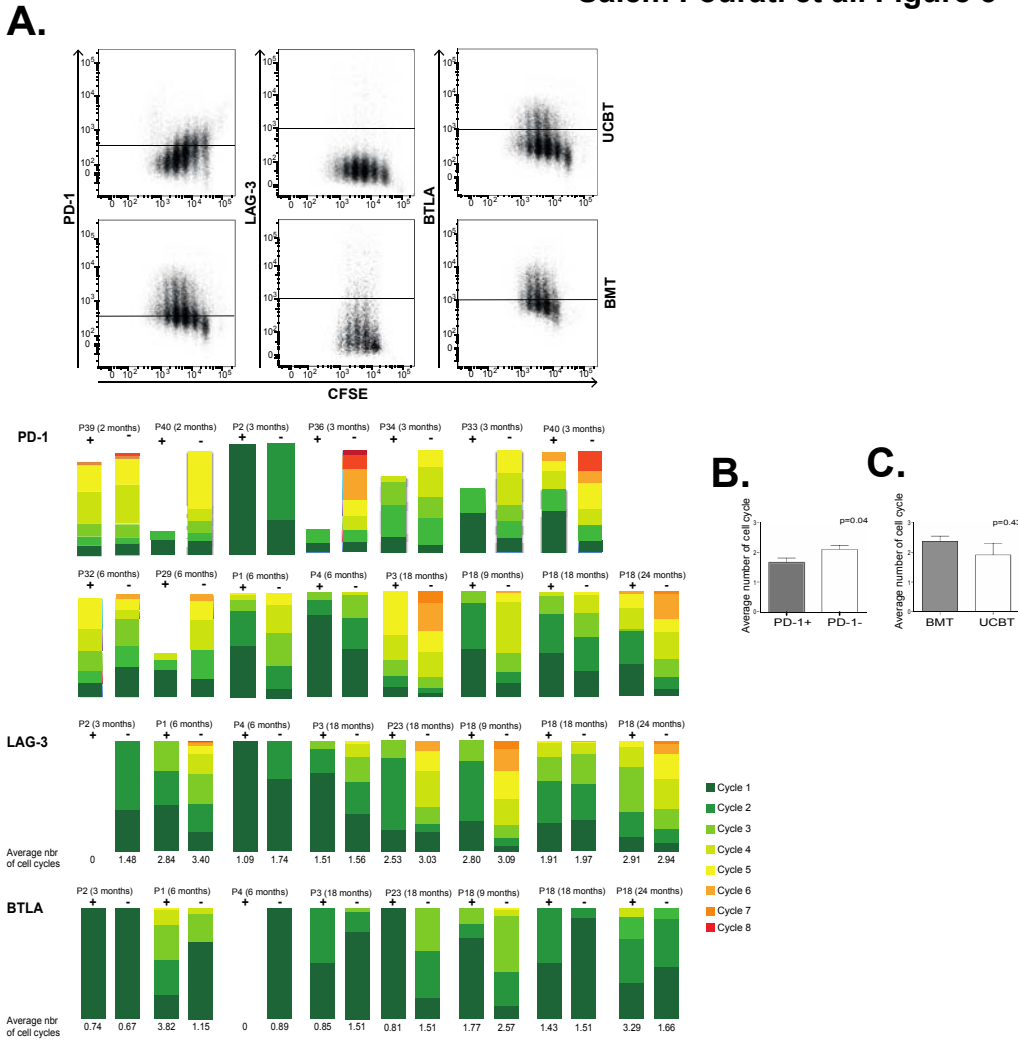
**Figure 4. 2 PD-1 is preferentially expressed on TEM CD8+ T cells in pediatric recipients of HSCT during the first 100 days after transplantation.**

Salem Fourati et al. Figure 2

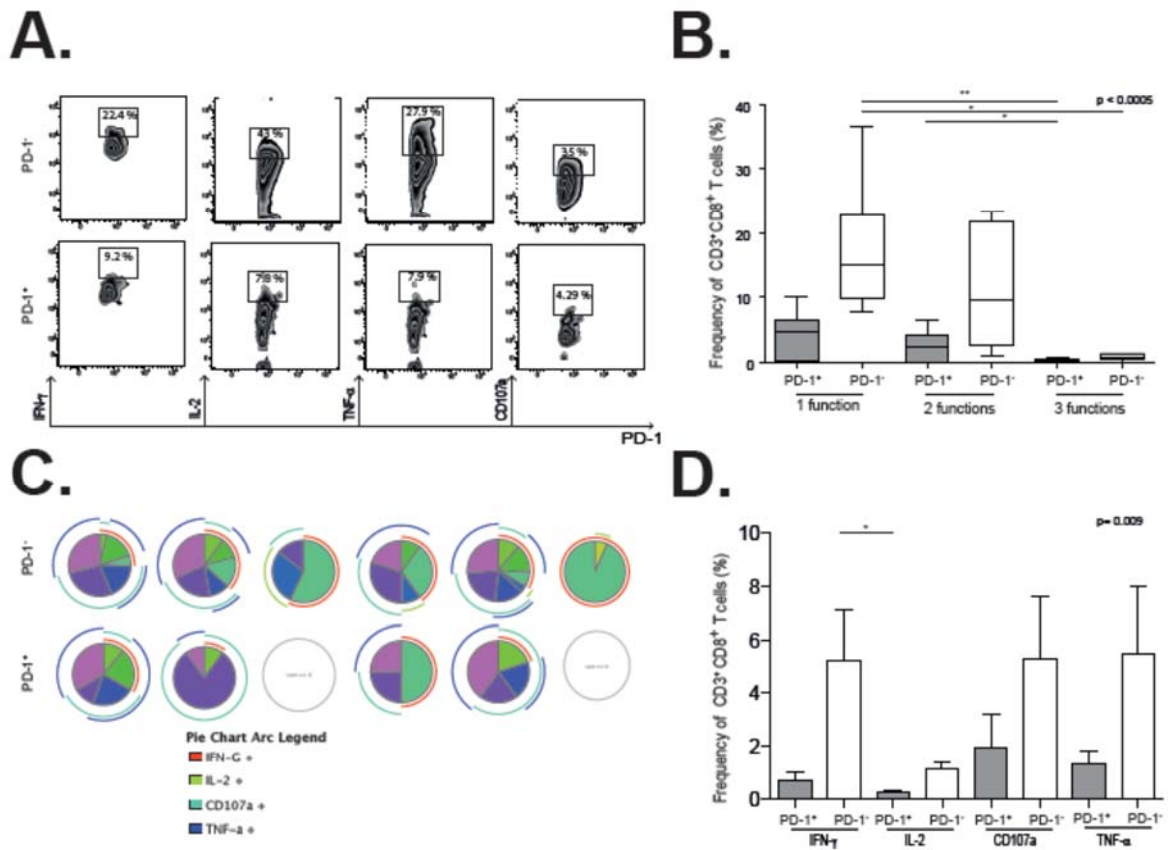


**Figure 4. 3 Expression of PD-1 affects the proliferative capacity of CD8+ T cells following HSCT**

Salem Fourati et al. Figure 3

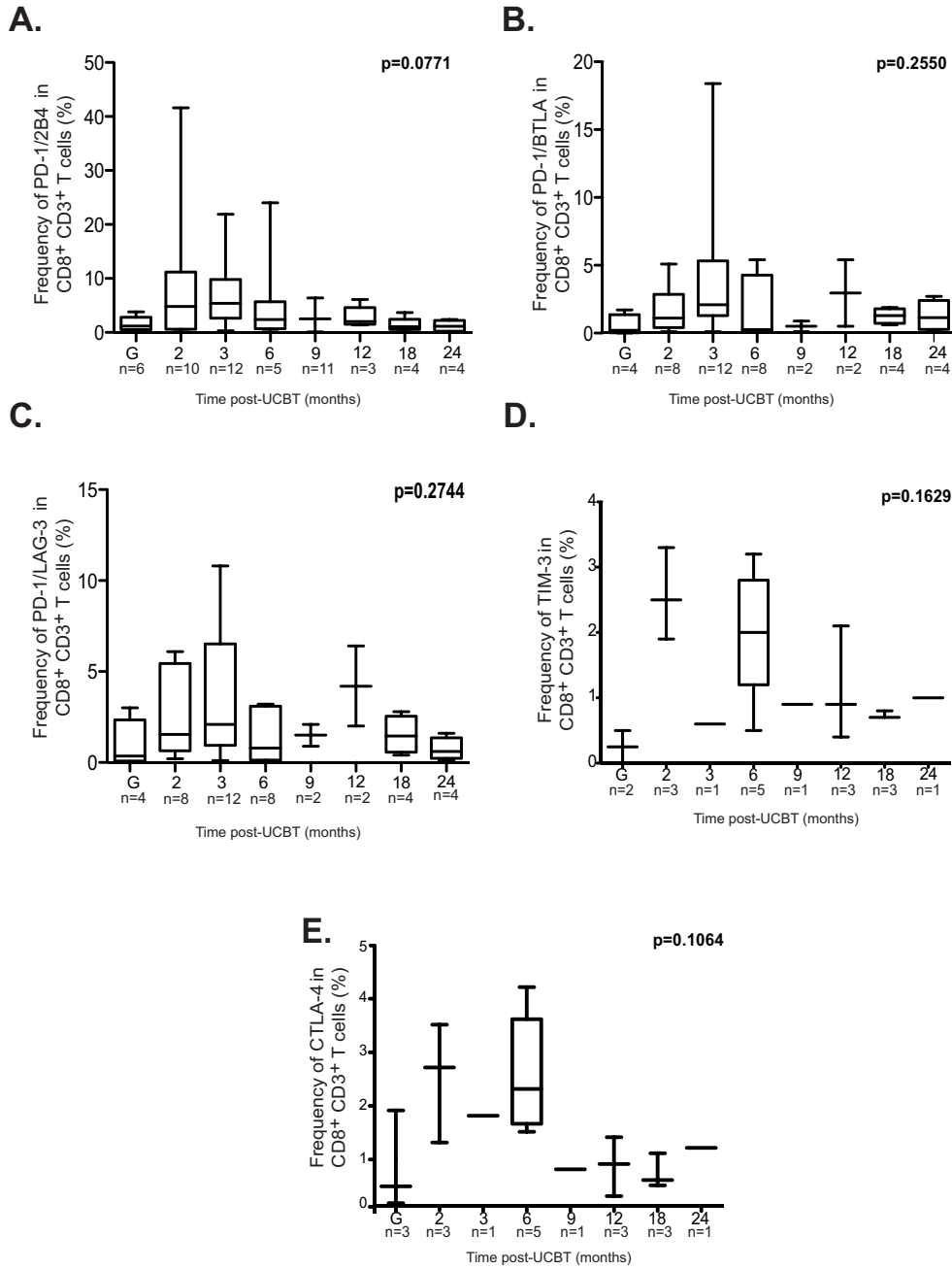


**Figure 4. 4 Expression of PD-1 impaired cytokine production of CD8+ T cell following HSCT**



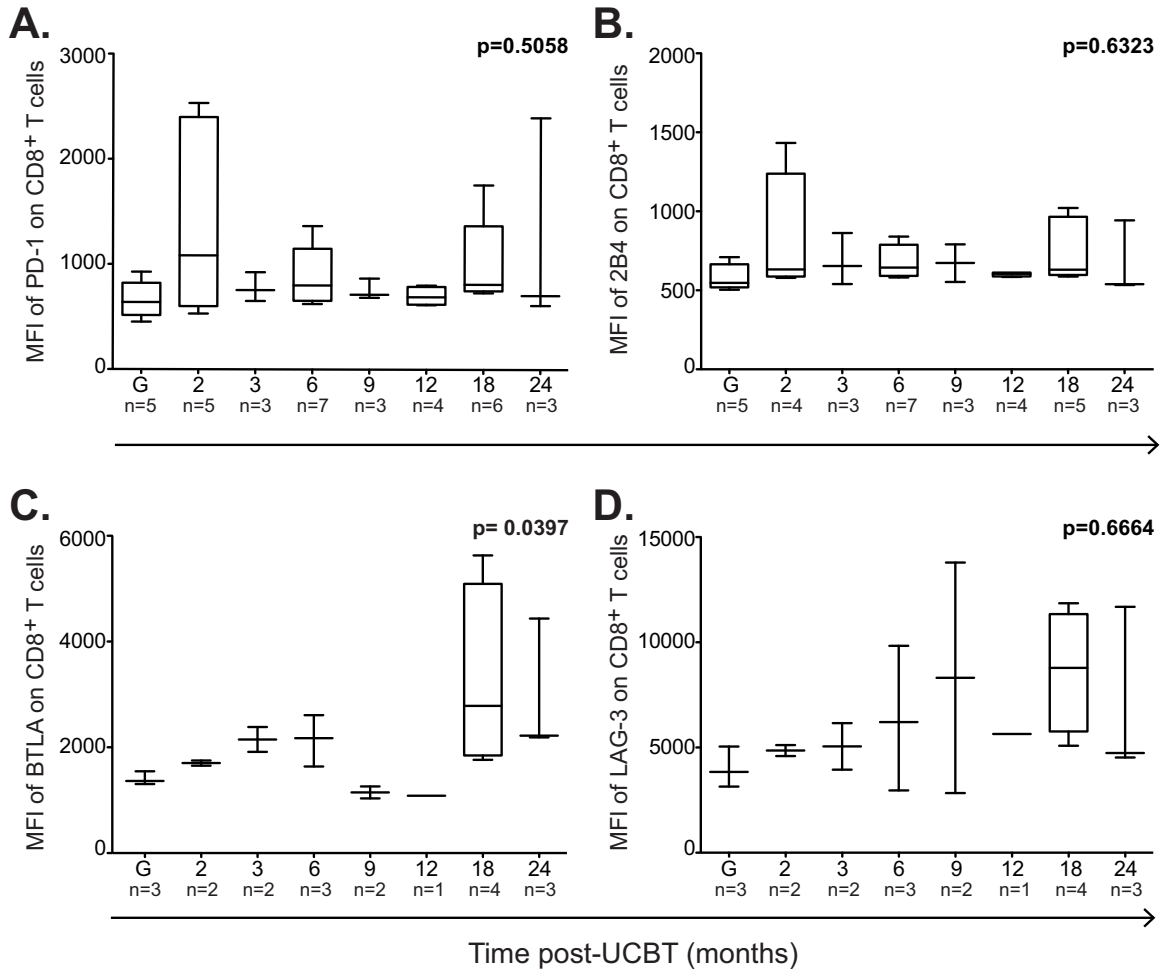
**Figure 4. 5 Supplemental Figure 1 Dual expression of inhibitory receptors and single expression of CTLA-4 and LAG-3 by CD8+CD3+ T cells in pediatric recipients of umbilical cord blood transplantation (UCBT)**

**Salem Fourati et al. Supplemental Figure 1**



**Figure 4. 6 Supplemental Figure 2 Mean fluorescence intensity of inhibitory receptors in pediatric recipients of umbilical cord blood transplantation (UCBT)**

**Salem Fourati et al. Supplemental figure 2**



## **Chapitre 5 Discussion**

Acteurs de l'immunité spécifique antivirale et anti-tumorale, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> constituent l'arme majeure dont dispose le système immunitaire pour maîtriser l'infection virale et éradiquer les cellules tumorales [403, 404]. La dynamique de reconstitution fonctionnelle de l'immunité antivirale spécifique au CMV et au VZV reste mal caractérisée suite à une TSCO. Le premier chapitre de cette thèse décrit le développement d'un test d'ELISpot IFN- $\gamma$  pour l'évaluation de la reconstitution immunitaire spécifique au VZV suite à la TSCO et évoque la pertinence d'associer une telle technique à la sélection fine et au suivi rapproché des patients nécessitant une thérapeutique médicamenteuse antivirale. Le deuxième chapitre adresse la question du pouvoir protecteur des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> provenant du SCO contre les infections virales et le développement des signes cliniques associées à ces dernières. Le troisième chapitre, quant à lui, pose la question de l'épuisement clonal des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> suite à la transplantation de CSH.

### **5.1 Pouvoir protecteur des lymphocytes T du SCO contre les infections au CMV et au VZV**

Nos résultats montrent que les trois premiers mois post-transplantation sont marqués par une profonde lymphopénie, dont témoignent des comptes de cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> très bas et une absence totale de lymphocytes T générés *de novo* CD4<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup> [122] et CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> [31]. Le suivi de la reconstitution de l'immunité spécifique au CMV et au VZV par ELISpot IFN- $\gamma$  a révélé une réponse suite à une stimulation antigénique chez seulement moins de 5 % des patients pendant les 100 premiers jours suivant la TSCO. Cette fréquence augmente considérablement à 6 mois, où des réponses protectrices en termes de réactivation virale et de développement de la maladie ont été



développées chez 10-15% des patients. L'émergence progressive de réponses antivirales renseigne sur la restauration du potentiel fonctionnel des lymphocytes T chez la majorité des patients à 12 mois post-TSCO, qui s'accompagne d'une augmentation de la fréquence des lymphocytes T naïfs. Ceci rend compte de l'importance de la reconstitution thymique pour restaurer, de façon durable, la diversité et la fonction des populations T.

### **5.1.1 Immunité antivirale pendant les 100 premiers jours suivant la TSCO: absence totale, défaut de prolifération, ou fonction altérée?**

Les données disponibles dans la littérature nourrissent d'abondantes controverses sur la question des facteurs de risque spécialement reliés aux infections à CMV suite à la TCSH. Alors que certaines études plaident en faveur d'une plus forte incidence après TSCO, d'autres ne soulèvent aucune différence significative comparativement aux autres sources de CSH [186, 187, 200]. Il est utile de mentionner que les données sur les infections à CMV et les maladies qui y sont reliées suivant une greffe pédiatrique ont été extrapolées majoritairement à partir d'études réalisées chez l'adulte, ce qui nous force à nous demander jusqu'à quel point les interprétations qui en découlent sont comparables. La nature clinique de ces études ajoute à la difficulté d'homogénéisation des variables confondantes liées au conditionnement pré-greffe, à l'âge, à la prophylaxie contre la GVHD et les infections opportunistes, et au degré de disparité HLA. Au vu des nombreux facteurs confondants, un lien de causalité entre la source de CSH et l'incidence des infections à CMV est difficile à établir. Toutefois, en dépit des discordances, toutes ces études se rejoignent clairement pour identifier le statut sérologique du receveur comme étant le principal facteur prédictif d'une maladie à CMV suivant la transplantation. Ceci

suggère que le SCO, en tant que source de CSH, peut influencer le risque d'infection par le CMV différemment selon que le receveur provienne d'une population à forte ou à faible séoprévalence pour le CMV [187, 200], menant ainsi plus facilement au développement de la maladie malgré la mise en place de stratégies préemptives. Compte tenu des différences fonctionnelles évidentes distinguant les lymphocytes T du SCO de leurs homologues provenant des autres sources de CSH [405], on comprend que la présence de cellules mémoires dans la MO de l'adulte ou dans le SP soit associée à un tableau de complications liées au CMV moins sévères comparativement à la TSCO, suite à laquelle les cellules T naïves requièrent plusieurs jours voire une semaine pour se différencier et monter une réponse antivirale efficace [406]. Dans notre cas, l'absence de réponse antigène-spécifique détectée par ELISpot IFN- $\gamma$  chez la majorité des patients n'exclut pas systématiquement la présence de lymphocytes T spécifiques au CMV et au VZV. Dans le cas du CMV, l'ELISpot IFN- $\gamma$  a été réalisée en utilisant un mélange de peptides spécifiques à la pp65 et/ou à l'IE-1, une approche limitée à des groupes présélectionnés de peptides qui pourrait sous-estimer la taille du compartiment effecteur [407, 408]. Une caractérisation plus rigoureuse de la reconstitution immunitaire de réponses antigène-spécifiques se ferait en présentant tous les peptides viraux potentiellement immunogènes générés par des cellules infectées. Dans notre cas, le faible nombre de cellules a été un facteur limitant, que ce soit pour cribler d'autres régions virales, ou encore relativement à l'utilisation d'une approche qui impliquerait l'isolement des APC autologues, leur infection par le virus et leur culture en présence des lymphocytes T du patient. De plus, certains peptides non-immunodominants peuvent être très importants et parfois suffisants pour induire une réponse T efficace [409]. Une autre

limite associée à l'ELISpot est reliée à la quantification des cellules secrétant l'IFN- $\gamma$ , une capacité que l'on sait être amoindrie dans le cas du SCO [172].

Nos résultats laissent entrevoir un déficit quantitatif et qualitatif de la réponse immunitaire à médiation cellulaire tôt après une TSCO. Ceci nous a amené à nous poser les questions suivantes : S'agit-il d'un défaut de prolifération des lymphocytes T antigène-spécifiques après TSCO? Présentent-ils un déficit fonctionnel ne leur permettant pas de contrôler l'infection virale et les manifestations cliniques qui en découlent? Ont-ils d'autres fonctions?

Récemment, McGoldrick *et al.* ont démontré que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> spécifiques au CMV sont présents tôt suivant la TSCO, toutefois à de faibles fréquences [410]. Nous avons également observé un défaut de prolifération des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> exprimant le récepteur PD-1. Le nombre de cycles de prolifération complétés par ces cellules au terme des 5 jours de stimulation polyclonale est moins important comparativement aux cellules qui sont PD-1<sup>-</sup>. L'absence de méthylation du gène *Pdcd1* rend peu probable la perte de l'expression de PD-1 pendant la stimulation qui se traduirait par une inversion du dysfonctionnement de ces cellules. De plus, la fréquence des cellules exprimant PD-1 ne peut pas être biaisée dans notre cas, étant donné que suite à une stimulation, l'expression de PD-1 atteint un pic à 24h avant de regagner son niveau basal à 5 jours [411]. Dans des expériences futures et afin de saisir plus précisément l'impact de l'expression de PD-1 sur la capacité proliférative des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, il faudrait trier les lymphocytes T PD-1<sup>+</sup> et les stimuler, ce qui permettrait également de cloner le TCR des populations PD-1<sup>+</sup> et suivre l'évolution de leur profil clonotypique suivant 5 jours en culture.

De plus, la différenciation terminale, caractérisée par le phénotype EMRA, observée chez les lymphocytes T issus du SCO suivant la stimulation *in vitro*, est associée à un défaut de production d'IL-2 et/ou d'IFN- $\gamma$  [412]. Merindol *et al.* ont démontré que dans un contexte de disparité HLA entre le donneur et le receveur, la stimulation antigénique menait à l'oligoclonalisation, voire même à la délétion clonale, phénomène pouvant expliquer l'absence de la réponse spécifique à l'antigène pendant les 100 premiers jours [413]. Nos résultats viennent, d'une part, appuyer ceux publiés par Merindol *et al.* et, d'autre part, mettre en relief le biais dans la différenciation des lymphocytes T effecteurs mémoires ( $T_{EM}$ ) vers un phénotype  $T_{EMRA}$  avec une nette prédominance de l'expression de PD-1 par les cellules  $T_{EM}$ . Pendant les 3 premiers mois post-TCSH, les cellules  $T_N$  et  $T_{CM}$  diminuent en fréquence au profit des cellules  $T_{EM}$  et  $T_{EMRA}$ . Le suivi de la distribution de l'expression de PD-1 par les différentes sous-populations naïves et mémoires du compartiment  $CD8^+$  a révélé que les cellules  $T_N$  et  $T_{CM}$  exprimaient des niveaux de PD-1 plus bas que les cellules  $T_{EM}$  et les  $T_{EMRA}$ . Ceci suggère que ces deux sous-populations, étant plus engagées dans le processus de différenciation, ont été en contact plus longtemps avec leur antigène. De plus, au sein même de ces deux sous-populations, nous avons noté une expression préférentielle de PD-1 par les lymphocytes  $T_{EM}$ , alors que ce biais de différenciation n'a pas été observé pour la population  $PD-1^-$ , qui se différencie en population  $T_{EMRA}$ . Ceci suggère soit une régulation dépendante de PD-1, qui maintient les cellules à un stade de différenciation plus précoce, soit une délétion clonale des cellules spécifiques à l'antigène exprimant PD-1 ayant atteint un état d'épuisement sévère et une plus grande susceptibilité à l'apoptose.

Comparativement au phénotype EMRA, le phénotype EM se caractérise par une expression élevée d'IFN- $\gamma$ , de perforine et de granzyme B [414, 415].

De surcroît, il ne faut pas perdre de vue le rôle non négligeable, et même parfois dominant, du compartiment T CD4<sup>+</sup> dans la réponse antivirale [416, 417]. Ainsi, l'amoinissement de la capacité proliférative est d'autant plus aigu que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> restent lourdement affectés et reconstituent lentement aussi bien dans leur diversité que dans leurs fonctions. Dans un environnement lymphopénique, ces cellules semblent être moins sensibles aux signaux homéostatiques [418] et n'atteignent des niveaux normaux qu'après la reprise de la thymopoïèse [419]. De plus, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> du SCO sont physiologiquement biaisés vers une polarisation Th2, produisent *in vitro* moins d'IFN- $\gamma$  comparativement à leurs homologues du SP et démontrent une hyperméthylation du promoteur du gène de l'IFN- $\gamma$  [420]. L'épuisement clonal des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> [421] peut également expliquer la reconstitution immunitaire fragilisée chez la majorité de nos patients. Au même titre que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, les cellules T CD4<sup>+</sup> expriment PD-1 de façon stable pendant les 3 premiers mois post-TSCO (données non montrées). Finalement, il est possible que la mesure de la qualité de la réponse antigène-spécifique en considérant un seul paramètre, bien qu'il soit un marqueur d'une bonne réponse cytotoxique, ne reflète pas complètement le potentiel fonctionnel des lymphocytes T, et laisse supposer une sous-estimation de la fréquence du compartiment effecteur et de son pouvoir protecteur [422]. Étant donné la pertinence tant clinique qu'immunologique des sous-populations lymphocytaires produisant de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2 [423, 424], nous avons réalisé un ELISpot double IFN- $\gamma$ -IL-2 (données non montrées) [425]. Les résultats n'étaient malheureusement pas concluants dans la mesure

où la séquestration de l'IL-2, produite suite à la stimulation, par les anticorps de capture affecte à la baisse la fréquence des lymphocytes T produisant l'IFN- $\gamma$  comparativement à l'ELISpot IFN- $\gamma$  [425]. Plusieurs questions restent en suspens: Est-ce qu'on peut s'attendre à ce que les cellules ne produisant pas l'IFN- $\gamma$  démontrent un pouvoir antiviral? Est-il possible d'avoir une reconstitution de populations dotées à la fois d'autres propriétés antivirales et de pouvoir protecteur [426]. Dans des projets futurs, il serait intéressant d'étudier le répertoire des populations antigène-spécifiques CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> afin de déterminer leur origine, suivre leur évolution en évaluant leur persistance et la stabilité des clones détectés, estimer leur diversité et caractériser leur fonction à court, moyen et long terme suivant la greffe.

### **5.1.2 Des réponses immunitaires antivirales en absence de signes de présence virale**

Des reconstitutions spontanées ont été détectées chez certains patients séronégatifs vis-à-vis du CMV ou du VZV en absence d'une répllication virale détectable, lesquelles ont été confirmées, dans le cas du CMV, par un marquage avec un tétramère CMH de classe I. Ce résultat à la fois pertinent et intrigant justifie d'investiguer davantage les mécanismes potentiels menant à de telles réponses. D'un point de vue clinique, l'infection à CMV peut se manifester sous une forme localisée au niveau des intestins, limitant ainsi la détection virale dans le SP par PCR [427]. Étant les premiers à étudier la reconstitution de l'immunité antivirale chez les patients CMV-séronégatifs, on ne connaît toujours pas comment et quand ces cellules sont générées, ainsi que les facteurs requis pour leur production et leur maintien. Il est possible que l'activation des réponses humorales et cellulaires ne se soit pas faite simultanément, bien que ce mécanisme soit

vraisemblablement peu probable chez tous les patients. Fait important, dotés d'une grande flexibilité au niveau de leurs sites de fixation, les TCR démontrent une forte propension aux réactivités croisées à différents antigènes [428, 429]. Une réaction croisée fortuite pourrait donc constituer également une explication complémentaire de cette observation [430]. Par convention, le développement de cellules T mémoires se fait subséquemment à la rencontre avec l'antigène [431]. Toutefois, les cellules T « *memory-like* » peuvent être générées par des mécanismes homéostatiques, en absence de l'engagement du TCR avec le complexe CMH-peptide [432, 433]. Dans un environnement lymphopénique, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires générées par la LIP partagent des caractères phénotypiques et fonctionnels avec les cellules mémoires conventionnelles, incluant leur capacité à contrôler efficacement l'infection [412]. Bien que la majorité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> présents dans les trois premiers mois soient en différenciation terminale [434], il n'en demeure pas moins que, pour les patients qui développent une immunité antivirale, ces cellules peuvent se différencier en « *memory-like* ». Il reste à progresser dans cette voie et caractériser le phénotype des cellules antigène-spécifiques.

La question essentielle et majeure est: y a-t-il des cellules souches capables de circuler ou d'être mobilisées? L'existence d'une population mémoire à savoir les TSCM (« *T stem cell memory* ») [435, 436], pourrait conférer une certaine flexibilité fonctionnelle aux cellules T. En d'autres termes, lorsque les cellules antigène-spécifiques les plus différenciées présentent un dysfonctionnement, on devrait avoir théoriquement davantage de différenciation des cellules TSCM pour assurer un meilleur contrôle de l'infection. Il serait intéressant de faire un phénotypage plus détaillé CD45RA/CCR7/CD27/CD95 sur

les cellules spécifiques au CMV et au VZV et également une étude du TCR pour voir si le contrôle de l'infection est la résultante de la différenciation des TSCM en cellules effectrices ou bien d'une simple inversion du dysfonctionnement des lymphocytes T, ou des deux. Ceci dit, l'influence des facteurs intrinsèques et extrinsèques sur ladite différenciation est très peu caractérisée. Est-ce que l'environnement post-TSCO supporte cette différenciation? Est-ce que les TSCM issus des cellules naïves du SCO ont les mêmes propriétés phénotypiques et fonctionnelles que celles de l'adulte? Toutes ces questions demeurent encore sans réponse.

### **5.1.3 L'ATG: une question de temps et de dose**

L'infection à CMV est d'autant plus fréquente que le déficit immunitaire est profond et que la reconstitution immunitaire du patient est lente. Le sérum anti-lymphocytaire (anti-thymocyte globulin; ATG) est administré quasi systématiquement avant la TSCO aux patients admis au Centre hospitalier universitaire Sainte-Justine dans le but de limiter les effets délétères liés à l'alloréactivité. Il s'agit d'un anticorps polyclonal, d'origine équine ou produit chez le lapin, spécifique aux antigènes des cellules T. De toute évidence, les études cliniques plaident en faveur du rôle aggravant de son utilisation en routine dans le conditionnement pré-greffe [437, 438]. En effet, sa faible spécificité et sa demi-vie sont telles qu'elles induisent une profonde déplétion des lymphocytes T et un retard au niveau de la reconstitution immunitaire, se traduisant par une incidence plus élevée d'infections opportunistes [439-441]. De plus, tel que démontré par l'étude menée par Admiraal *et al.* le temps d'administration et la dose d'ATG influencent le pronostic des patients pédiatriques receveurs de TSCO [439]. Un autre groupe s'est également intéressé à cette question, cette fois-ci chez l'adulte, et a encore une fois mis en relief l'importance



d'éloigner l'administration de l'ATG du moment d'infusion des CSH [442]. La détermination du meilleur schéma d'administration de l'ATG est donc particulièrement importante en raison de l'existence d'une frontière remarquablement ténue entre la protection contre les infections opportunistes, la rechute de leucémie, et la survenue de GvHD.

#### **5.1.4 Monitoring immunitaire pour une meilleure gestion des patients**

Si l'utilisation d'agent antiviraux reste jusqu'à aujourd'hui le traitement de référence en première ligne des infections à CMV et à VZV après la TCSH, son impact sur la reconstitution immunitaire a été largement débattu avec des résultats contradictoires dans la littérature. La prolongation des traitements antiviraux est tout aussi délétère que la déplétion *in vitro* des lymphocytes T, en termes de protection immunitaire contre les infections opportunistes. De plus, la question de la durée idéale de cette prophylaxie reste sans réponse [443-446]. Les données probantes issues de notre étude pourraient être utiles pour guider les cliniciens dans la prise de décisions éclairées en termes de gestion des infections virales. Le seuil minimal de reconstitution d'une immunité protectrice fixé dans notre cas à 150 SFU/million de PBMC implique inéluctablement une reconsidération des protocoles, non personnalisés, mis en place pour la gestion des infections liées au CMV et au VZV après TSCO. L'atteinte de ce seuil permettrait de sélectionner les patients dont l'immunité reconstituée est suffisamment efficace pour assurer leur protection en absence de développement de signes cliniques. Il sera important de confirmer avec un plus grand nombre de patients dans des projets futurs la validité de ce seuil. Particulièrement dans le cas du CMV, le monitoring immunitaire demeure une priorité dans un contexte où la prophylaxie faisant appel à la vaccination

pose un certain nombre de problèmes. L'évaluation des effets de la vaccination post-transplantation de CSH doit s'intéresser à la nature et à l'amplitude de la réponse immunitaire principalement à médiation cellulaire, plutôt qu'à la réduction du risque infectieux. Il est aisément compréhensible que l'utilisation de vaccin vivant atténué (vaccin CMV Towne) [447] ne constitue pas une option dans le cas du CMV, dont les infections surviennent à un stade d'immunosuppression majeure pendant les 3 premiers mois post-greffe, et dont la protection repose principalement sur la voie thymus-indépendante. Deux vaccins contre le CMV, l'un à ADN et l'autre contenant la glycoprotéine B du virus et l'adjuvant MF59, ont été testés récemment dans des essais cliniques de phase 2 chez les patients ayant reçu une TCSH et une transplantation d'organe respectivement [448, 449]. L'efficacité de ces deux vaccins est telle qu'elle ne permet pas une interruption complète de l'utilisation des agents antiviraux. Les obstacles auxquels se heurtent les essais de vaccination pour le CMV sont : i) l'immunogénicité des vaccins candidats, qui sont incapables de mimer la réponse immunitaire naturelle développée suite à une primo-infection par le CMV, laquelle implique simultanément les deux bras, humoral et cellulaire, de la réponse immunitaire; ii) la diversité de la réponse immunitaire, étant donné que les vaccins candidats ciblent un nombre limité d'antigènes dominants; et iii) la durabilité de la réponse immunitaire [351, 450]. La vaccination dans le cas du VZV est tout aussi importante que dans le cas du CMV. Malgré l'existence de plusieurs vaccins vivants atténués contre le VZV, leur utilisation après transplantation ne peut se faire qu'au-delà de 12 mois et l'appréciation des bénéfices liés à leur utilisation demeure difficile dans la mesure où la vaccination est pratiquée en dehors de la période à risque. Le monitoring immunitaire des lymphocytes T VZV-spécifiques par ELISpot

IFN- $\gamma$  permettrait de cibler le groupe de patients à risque devant faire l'objet de vaccination pour une protection à long-terme.

## **5.2 L'épuisement clonal des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> tôt suivant la TCSH**

Une suite logique de la première partie de la présente thèse de doctorat se veut d'étudier l'expression des récepteurs inhibiteurs associés à l'épuisement clonal dans les populations spécifiques au CMV et au VZV. Toutefois, la détection des clones T spécifiques au VZV ou au CMV est limitée par la faible fréquence de ces cellules, surtout tôt suivant la transplantation. La stimulation antigénique *in vitro* préalable des cellules CD8<sup>+</sup> pourrait biaiser l'expression des récepteurs inhibiteurs étudiés [249, 451]. La caractérisation de l'expression d'un ou plusieurs récepteurs inhibiteurs a été donc accomplie dans les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> totaux suite à la TSCO ou la TMO. Nos données ont révélé une augmentation significative de la fréquence des cellules T CD8<sup>+</sup> exprimant PD-1 pendant les trois premiers mois (environ 50 % des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>), des résultats qui viennent appuyer ceux publiés par Merindol *et al.* [249]. À l'exception de PD-1, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ne semblent pas co-exprimer les autres récepteurs (i.e. 2B4, BTLA, CTLA-4, TIM-3 et LAG-3) documentés comme étant impliqués dans l'épuisement clonal dans le contexte d'infections chroniques et de cancer [421]. L'augmentation non statistiquement significative, parfois négligeable, de la fréquence des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> exprimant ces corécepteurs inhibiteurs rend compte de la complexité de l'environnement post-greffe, probablement en termes de disponibilité des ligands respectifs et de l'influence de facteurs extrinsèques [452]. Fait encore plus intrigant, l'augmentation de l'expression de PD-1 dans les premiers mois post-greffe ne

semble pas être réservée exclusivement aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> provenant du SCO, mais a également été notée chez les patients transplantés de MO. Nos données nous poussent inéluctablement à évoquer les sources potentielles d'une telle similarité, pour le moins inattendue. En effet, en dépit des différences biologiques entre les deux sources, les lymphocytes T subissent dans les deux cas une expansion homéostatique massive dans un contexte lymphopénique conjointement à de nombreuses stimulations par des infections opportunistes causées par le CMV, par exemple. Toutefois, la mise en évidence d'une telle cinétique ne permet pas, par elle-même, de conclure à l'existence d'une relation causale entre l'expression de PD-1 et l'environnement, à la fois lymphopénique et inflammatoire, qui règne tôt suivant la transplantation, menant à l'acquisition de ce phénotype. Tout d'abord, l'existence d'une hétérogénéité clinique au sein du groupe d'étude pourrait expliquer la mise en évidence de ces résultats, notamment par le rôle confondant de la maladie sous-jacente, du régime de conditionnement, de la disparité HLA entre donneur et receveur et des complications post-greffe. L'expression de PD-1 ne représente qu'une composante de l'épuisement clonal parmi tant d'autres, et si l'intégration des signaux environnementaux se fait de la même façon par les deux sources cellulaires (SCO et MO) demeurent inconnu. En l'état actuel des connaissances, on ne connaît toujours pas le rôle de PD-1 dans l'initiation et/ou l'établissement de l'épuisement clonal. Odorizzi et *al.* ont démontré que l'épuisement clonal survient même en dépit de l'absence de PD-1 [452]. Une analyse globale du transcriptome, permettrait de ségréger les gènes peu ou pas exprimés de ceux qui le sont abondamment, menant ainsi à l'identification de certains facteurs de transcription, médiateurs potentiels impliqués dans l'épuisement clonal tôt suivant la transplantation [372]. D'autres récepteurs inhibiteurs,

n'ayant pas été étudiés mais largement admis comme étant associés à l'épuisement clonal, incluant TIGIT, VISTA et CD160 pourraient démontrer des patrons d'expression différents selon qu'il s'agisse de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> provenant du SCO ou de la MO [325, 453].

### **5.2.1 Expression de PD-1 par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> totaux**

Une association directe entre l'expression de PD-1 par les cellules antigène-spécifiques et la forte exposition à l'antigène a été largement établie dans le contexte d'infections chroniques ou de cancer. Toutefois, notre étude a été réalisée sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> totaux, et il reste donc à vérifier si les résultats reflètent en totalité ou en partie le phénotype des populations antigène-spécifiques. Les présentes hypothèses permettent de proposer une description intelligible, mais non exhaustive, des mécanismes non mutuellement exclusifs, pouvant mener à une telle augmentation en fréquence des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> exprimant PD-1.

- Tout d'abord, la population totale englobe les cellules antivirales, les cellules allogéniques et les cellules anti-tumorales, dans le cas où la TCSH est utilisée pour le traitement de pathologie hématologiques malignes. Au cours de notre étude, il nous a été possible d'associer l'expression de PD-1 avec l'occurrence d'événements particuliers, incluant les infections virales et la rechute de la leucémie. L'expression de PD-1 par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques au CMV a été démontrée dans plusieurs contextes d'immunosuppression, notamment chez les patients chroniquement infectés par le VIH-1 [454]. Suivant la transplantation, quelques groupes ont étudié [455, 456] une partie de cette question et ont démontré une association entre l'expression de PD-1, la charge virale élevée et la perte de fonction effectrice tant au niveau des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> que

CD4<sup>+</sup> spécifiques au CMV. Ces données sont à prendre avec une certaine réserve, étant donné que l'évaluation du phénotype a été réalisée suite à une stimulation antigénique ou polyclonale des cellules CMV-spécifiques, pratique qui biaise l'expression de PD-1. Il reste donc à vérifier si ces résultats auront une pertinence clinique égale en absence de stimulation préalable. Nous avons observé une fréquence significativement plus élevée de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> exprimant PD-1 pendant les 6 premiers mois post-TCSH chez les patients qui allaient faire une rechute de leucémie. Ceci rend compte du rôle-clé joué par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et de l'importance d'une reconstitution, tant en nombre qu'en fonction, du compartiment T dans la prévention de la rechute. Du fait de son impact sur la qualité de la réponse T et sur le pronostic du patient, le récepteur PD-1 constituerait un bon marqueur prédictif de rechute de leucémie [248, 457]. De plus, nos résultats ne démontrent pas de différence significative au niveau de la fréquence des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> exprimant PD-1 chez les patients qui font ou non une GvHD, ce qui laisse suggérer que la manipulation de l'axe PD-1/PD-L1 pourrait permettre l'inversion du dysfonctionnement tout en dissociant l'effet GvL de la GvHD. D'importantes questions restent en suspens concernant le bien fondé et la pertinence du blocage de l'interaction entre PD1 et PD-L1 tôt suivant une TCSH. Une nouvelle stratégie d'immunothérapie particulièrement prometteuse faisant appel à des anticorps bloquant les récepteurs impliqués dans l'épuisement clonal des lymphocytes T CD8 est au cœur des approches immunosuppressives actuelles utilisées en clinique pour la prise en charge des cancers et de certaines maladies infectieuses chroniques. Les résultats obtenus en études précliniques, validés par plusieurs études cliniques, démontrent le potentiel et le bien-fondé des immunorégulateurs de la nouvelle génération. En 2011, la *FDA* (« *US Food*

*and Drug Administration* ») a approuvé l'utilisation de l'ipilimumab, un anticorps monoclonal bloquant CTLA-4 et maintenant ainsi une réponses anti-tumorale durable pouvant atteindre 10 ans chez certains patients [458]. S'ensuit en 2014 l'approbation par la FDA de deux anticorps ciblant PD-1 (pembrolizumab et nivolumab), ce qui a marqué le début d'une nouvelle ère pour l'immunothérapie du cancer. Deux essais cliniques de phase III menés chez des patients atteints de mélanomes et comparant l'efficacité des inhibiteurs ciblant PD-1 ou CTLA-4 ont démontré un bénéfice clinique global supérieur par rapport à l'ipilimumab [459, 460]. De plus, à cette efficacité supérieure s'ajoute un profil de tolérance favorable, ce qui a mené à envisager son utilisation conjointement avec les traitements conventionnels anti-tumoraux ou avec d'autres anticorps bloquants. Une étude clinique randomisée de phase I a rapporté que l'administration simultanée des deux antagonistes permet d'atteindre des taux de réponses objectives plus élevés comparativement à l'administration de l'ipilimumab seul (61 % versus 11 %) [461]. Cette approche immunothérapeutique combinatoire permet de renforcer la réponse immunitaire en inhibant deux voies agissant en synergie et impliquées directement dans le dysfonctionnement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

### **5.3 Les récepteurs inhibiteurs au-delà de l'épuisement clonal après TCSH.**

Une question mérite d'être posée: l'expression de PD-1 est-elle la conséquence directe de l'activation des lymphocytes dans un contexte d'inflammation chronique caractérisant l'environnement post-greffe? Dans le but de dissocier PD-1, marqueur d'activation et PD-1, marqueur d'épuisement clonal, nous avons donc évalué l'expression concomitante de PD-1 et de CD69 par les lymphocytes T CD8, pendant les trois premiers mois suivant

la TCSH. Quel que soit la source de CSH (SCO ou MO), aucune corrélation n'a été observée entre l'expression de PD-1 et celle de CD69 dans le compartiment CD8. L'absence de co-expression peut être expliquée par le fait que les lymphocytes T CD8, ayant une fois acquis l'expression de PD-1, deviennent réfractaires à l'expression de CD69 ou, de façon plus générale, à la stimulation via le TCR [462]. Il est peu probable que l'expression de PD-1 ait évoluée de transitoire à stable uniquement pour rendre les lymphocytes T dysfonctionnels, puisqu'un tel résultat aurait pu être aisément atteint par la délétion clonale des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques à l'antigène. Il serait donc réducteur de limiter l'explication de l'apparition d'un tel phénotype suivant la TCSH uniquement à l'épuisement clonal. Dans ces conditions, l'expression stable de PD-1 maintenue pendant les 3 premiers mois chez la majorité des patients laisse entrevoir un mécanisme d'adaptation fonctionnelle à travers lequel les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> acquièrent un phénotype effecteur optimisé pour causer une inflammation et une immunopathologie moindres que les lymphocytes T effecteurs conventionnels. Un tel ajustement des propriétés fonctionnelles, conjointement à l'expression stable de PD-1, peut s'avérer d'une importance majeure tôt suivant la transplantation [452]. Récemment, il a été démontré que l'absence de PD-1 était associée à un déséquilibre en faveur d'une population épuisée ayant gardé uniquement une activité cytotoxique, soulignant son rôle dans la prévention de la surstimulation [256]. Certaines idées permettront d'élargir notre vision de ce qu'est l'épuisement clonal après TCSH. L'allo-tolérance est importante pour la réussite de la greffe, surtout à l'ère du conditionnement à intensité réduite impliquant un délai pour l'établissement d'un chimérisme complet. L'expression de PD-1 de façon continue pourrait représenter une réaction de défense mise en place par l'organisme face



à une réponse inflammatoire puissante passée à la chronicité, finement régulée et génératrice d'un phénotype spécialisé caractérisant le compartiment T CD8<sup>+</sup>. Dans le même sens, l'existence de cellules T biaisées vers la tolérance immunitaire provenant du foie fœtal pourrait fournir une explication complémentaire [27]. Récemment, il a été démontré que l'induction d'un phénotype épuisé suivant une exposition prolongée à de fortes doses virales protégeait les souris de l'immunopathologie, alors que des doses virales plus faibles, n'induisant pas l'apparition d'un tel phénotype, étaient à l'origine de pathologie substantielle [463]. Le remodelage de l'empreinte épigénétique, se traduisant par une déméthylation du locus *PDCDI*, notée aussi bien chez la souris dans le contexte d'une infection chronique par le LCMV clone-13 [383] que chez l'humain dans le contexte d'une infection par le VIH [384] et le VHC [464] met en relief l'extraordinaire complexité des processus impliqués et incite à axer davantage les recherches pour expliquer la stabilité du phénotype épuisé et les conséquences pathophysiologiques et cliniques qui en découlent. Il reste à progresser dans cette voie pour voir si les lymphocytes T caractérisés par un phénotype épuisé sont générés de façon constitutive à de faibles fréquences tôt suivant la transplantation et, dépendamment du spectre de complications post-greffe et du degré d'inflammation, subissent ou non une sélection préférentielle favorisant leur survie au dépens du phénotype conventionnel.

## **5.4 Conclusions et perspectives**

La TSCO a connu, depuis ses débuts, de profondes évolutions ayant conduit à l'augmentation de façon continue du nombre de receveurs, enfants et adultes, de cette thérapeutique. Toutefois, il n'en demeure pas moins que beaucoup reste à faire pour la caractérisation du potentiel fonctionnel et protecteur des lymphocytes T du SCO suivant la transplantation. Le but de cette étude était de cerner les mécanismes potentiels associés

à un spectre de complications distinguant la TSCO des autres alternatives de TCSH. Au cours du présent travail, nous avons pu démontrer que des réponses protectrices spécifiques au CMV et au VZV peuvent être développées suivant une TSCO. Les travaux de recherche effectués dans le cadre de cette thèse ont permis également d'identifier l'épuisement clonal comme mécanisme potentiel du dysfonctionnement des lymphocytes T après TSCO associé à une plus forte incidence d'infections opportunistes ainsi qu'à un risque de mortalité consécutive. Le résultat le plus intéressant et le plus novateur concerne certainement la mise en évidence de l'augmentation significative de la fréquence des lymphocytes T exprimant PD-1 tôt suivant la TSCO indépendamment de la source de CSH. Cette population, caractérisée majoritairement par un phénotype effecteur mémoire (EM) démontre une perte significative de la capacité proliférative et produit moins d'IFN- $\gamma$ , d'IL-2, de TNF- $\alpha$  et de CD107a. S'agit-il d'une question d'équilibre de signaux intégrés qui nous amènerait à des approches préventives personnalisées? PD-1 est un récepteur aux multiples facettes, et dont les effets biologiques – contexte-dépendants - sont à la hauteur de la complexité du phénomène d'épuisement clonal. Il serait donc intéressant et pertinent de caractériser l'expression de PD-L1. Il conviendrait également de trier les cellules PD-1<sup>+</sup> et de comparer les niveaux d'expression de facteurs de transcription clés associés l'épuisement clonal entre les patients qui font une rechute ou présentent de multiples épisodes de réactivation virale et les patients ne développant pas de complications post-greffe. Il conviendrait également de faire une étude du transcriptome sur les cellules T prélevées du SCO à la naissance et les mêmes cellules provenant du même individu, cette fois-ci de nombreuses années plus tard.

À l'issue de ces résultats, il serait particulièrement intéressant de soulever leur pertinence clinique ainsi que leur représentativité dans d'autres contextes de TCSH allogénique et autologue. En d'autres termes, l'épuisement clonal des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> peuvent-ils être extrapolés à toutes les conditions impliquant une lymphopénie pour la reconstitution du système immunitaire dans un but curatif? Les cellules T périphériques prolifèrent fortement après transfert à des hôtes immunodéficients, ce qui pourrait être à l'origine de l'expression de PD-1. Ce phénomène devrait s'appliquer dans la majorité, si ce n'est la totalité, des contextes de lymphopénie. Il reste toutefois à associer PD-1 à l'activation donc à la prolifération des cellules T ou plutôt à leur dysfonctionnement. On pourrait supposer que dans le contexte d'une TCSH autologue, telle que pratiquée dans le cas de la sclérose en plaque, la fréquence ainsi que le niveau d'expression de PD-1 par les cellules T CD8<sup>+</sup> soient moindres que dans le cas d'une greffe se faisant dans un contexte de disparité HLA entre donneur et receveur, lequel impliquant un environnement inflammatoire chronique. Dans le cas de la sclérose en plaque, l'expression de PD-1 par la sous-population lymphocytaire impliquée dans la maladie, serait à la fois favorable et recherchée, rendant ainsi les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> autoréactifs résiduels moins fonctionnels jusqu'à la reprise de la thymopoïèse. Le dilemme est toujours le même : faut-il favoriser ou au contraire bloquer l'interaction entre PD-1 et PD-L1.

## **Références bibliographiques**

1. Marcenaro, E., et al., *Bridging innate NK cell functions with adaptive immunity*. Adv Exp Med Biol, 2011. **780**: p. 45-55.
2. Leavy, O., *Innate immunity: SHP regulates TLR signalling*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(8): p. 502.
3. Beutler, B.A., *TLRs and innate immunity*. Blood, 2009. **113**(7): p. 1399-407.
4. Creagh, E.M. and L.A. O'Neill, *TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity*. Trends Immunol, 2006. **27**(8): p. 352-7.
5. Klein, J. and A. Sato, *The HLA system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(10): p. 702-9.
6. Klein, J. and A. Sato, *The HLA system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(11): p. 782-6.
7. Madden, D.R., D.N. Garboczi, and D.C. Wiley, *The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2*. Cell, 1993. **75**(4): p. 693-708.
8. Yewdell, J.W. and J.R. Bennink, *Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(1): p. 13-8.
9. Paludan, C., et al., *Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy*. Science, 2005. **307**(5709): p. 593-6.
10. Zhou, D., et al., *Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens*. Immunity, 2005. **22**(5): p. 571-81.
11. Ceredig, R. and T. Rolink, *A positive look at double-negative thymocytes*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(11): p. 888-97.
12. Godfrey, D.I., et al., *A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression*. J Immunol, 1993. **150**(10): p. 4244-52.
13. Robey, E. and B.J. Fowlkes, *Selective events in T cell development*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 675-705.
14. Mombaerts, P., et al., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes*. Cell, 1992. **68**(5): p. 869-77.
15. Shinkai, Y., et al., *Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes*. Science, 1993. **259**(5096): p. 822-5.
16. von Boehmer, H., H.S. Teh, and P. Kisielow, *The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful*. Immunol Today, 1989. **10**(2): p. 57-61.
17. Merckenschlager, M., et al., *How many thymocytes audition for selection?* J Exp Med, 1997. **186**(7): p. 1149-58.
18. Zerrahn, J., W. Held, and D.H. Raulet, *The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection*. Cell, 1997. **88**(5): p. 627-36.
19. Germain, R.N., *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 309-22.
20. Haynes, B.F., et al., *Early events in human T cell ontogeny. Phenotypic characterization and immunohistologic localization of T cell precursors in early human fetal tissues*. J Exp Med, 1988. **168**(3): p. 1061-80.

21. Lucivero, G., et al., *Ontogeny of human lymphocytes. Two-color fluorescence analysis of circulating lymphocyte subsets in fetuses in the second trimester of pregnancy*. Fetal Diagn Ther, 1991. **6**(3-4): p. 101-6.
22. Byrne, J.A., A.K. Stankovic, and M.D. Cooper, *A novel subpopulation of primed T cells in the human fetus*. J Immunol, 1994. **152**(6): p. 3098-106.
23. Muench, M.O., et al., *Ontogenic changes in CD95 expression on human leukocytes: prevalence of T-cells expressing activation markers and identification of CD95-CD45RO+ T-cells in the fetus*. Dev Comp Immunol, 2003. **27**(10): p. 899-914.
24. Morrison, S.J., et al., *The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(22): p. 10302-6.
25. Zanjani, E.D., J.L. Ascensao, and M. Tavassoli, *Liver-derived fetal hematopoietic stem cells selectively and preferentially home to the fetal bone marrow*. Blood, 1993. **81**(2): p. 399-404.
26. Harrison, D.E., et al., *Relative to adult marrow, fetal liver repopulates nearly five times more effectively long-term than short-term*. Exp Hematol, 1997. **25**(4): p. 293-7.
27. Mold, J.E., et al., *Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans*. Science, 2010. **330**(6011): p. 1695-9.
28. Michaelsson, J., et al., *Regulation of T cell responses in the developing human fetus*. J Immunol, 2006. **176**(10): p. 5741-8.
29. Takahata, Y., et al., *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, 2004. **32**(7): p. 622-9.
30. Murakami, N. and L.V. Riella, *Co-inhibitory pathways and their importance in immune regulation*. Transplantation, 2014. **98**(1): p. 3-14.
31. Appay, V., et al., *Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues*. Cytometry A, 2008. **73**(11): p. 975-83.
32. Kaech, S.M. and W.G. Cui, *Transcriptional control of effector and memory CD8(+) T cell differentiation*. Nature Reviews Immunology, 2012. **12**(11): p. 749-761.
33. Masopust, D. and J.M. Schenkel, *The integration of T cell migration, differentiation and function*. Nature Reviews Immunology, 2013. **13**(5): p. 309-320.
34. Gatti, R.A., et al., *Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency*. Lancet, 1968. **2**(7583): p. 1366-9.
35. Passweg, J.R., et al., *Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2014. **49**(6): p. 744-50.
36. Copelan, E.A., *Hematopoietic stem-cell transplantation*. N Engl J Med, 2006. **354**(17): p. 1813-26.
37. Eapen, M., et al., *Effect of donor-recipient HLA matching at HLA A, B, C, and DRB1 on outcomes after umbilical-cord blood transplantation for leukaemia and myelodysplastic syndrome: a retrospective analysis*. Lancet Oncol, 2011. **12**(13): p. 1214-21.
38. Bray, R.A., et al., *National marrow donor program HLA matching guidelines for unrelated adult donor hematopoietic cell transplants*. Biol Blood Marrow Transplant, 2008. **14**(9 Suppl): p. 45-53.
39. Morishima, Y., et al., *The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors*. Blood, 2002. **99**(11): p. 4200-6.
40. Petersdorf, E.W., et al., *The biological significance of HLA-DP gene variation in haematopoietic cell transplantation*. Br J Haematol, 2001. **112**(4): p. 988-94.
41. Petersdorf, E.W., et al., *Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2976-80.

42. Lee, S.J., et al., *High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4576-83.
43. Petersdorf, E.W., *Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(5): p. 588-93.
44. Shaw, B.E., et al., *The importance of HLA-DPB1 in unrelated donor hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4560-6.
45. Leung, W., et al., *Comparison of killer Ig-like receptor genotyping and phenotyping for selection of allogeneic blood stem cell donors*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6540-5.
46. Cooley, S., et al., *Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia*. Blood, 2009. **113**(3): p. 726-32.
47. Stringaris, K., et al., *Donor KIR Genes 2DL5A, 2DS1 and 3DS1 are associated with a reduced rate of leukemia relapse after HLA-identical sibling stem cell transplantation for acute myeloid leukemia but not other hematologic malignancies*. Biol Blood Marrow Transplant, 2010. **16**(9): p. 1257-64.
48. Gyurkocza, B. and B.M. Sandmaier, *Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all*. Blood, 2014. **124**(3): p. 344-53.
49. Giralt, S., et al., *Reduced-intensity conditioning regimen workshop: defining the dose spectrum. Report of a workshop convened by the center for international blood and marrow transplant research*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(3): p. 367-9.
50. Matthews, D.C., et al., *Phase I study of (131)I-anti-CD45 antibody plus cyclophosphamide and total body irradiation for advanced acute leukemia and myelodysplastic syndrome*. Blood, 1999. **94**(4): p. 1237-47.
51. Subbiah, K., et al., *Comparison of immunoscintigraphy, efficacy, and toxicity of conventional and pretargeted radioimmunotherapy in CD20-expressing human lymphoma xenografts*. J Nucl Med, 2003. **44**(3): p. 437-45.
52. Wang, Y., et al., *Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence*. Blood, 2006. **107**(1): p. 358-66.
53. Shao, L., et al., *Total body irradiation causes long-term mouse BM injury via induction of HSC premature senescence in an Ink4a- and Arf-independent manner*. Blood, 2014. **123**(20): p. 3105-15.
54. Bredeson, C., et al., *Prospective cohort study comparing intravenous busulfan to total body irradiation in hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2013. **122**(24): p. 3871-8.
55. Weiden, P.L., et al., *Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts*. N Engl J Med, 1979. **300**(19): p. 1068-73.
56. Weiden, P.L., et al., *Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation*. N Engl J Med, 1981. **304**(25): p. 1529-33.
57. Passweg, J.R., et al., *The EBMT activity survey: 1990-2010*. Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(7): p. 906-23.
58. Sandmaier, B.M., S. Mackinnon, and R.W. Childs, *Reduced intensity conditioning for allogeneic hematopoietic cell transplantation: current perspectives*. Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**(1 Suppl 1): p. 87-97.
59. Russell, N.H., et al., *A comparative assessment of the curative potential of reduced intensity allografts in acute myeloid leukaemia*. Leukemia, 2015. **29**(7): p. 1478-84.
60. Bosi, A. and B. Bartolozzi, *Safety of bone marrow stem cell donation: a review*. Transplant Proc, 2010. **42**(6): p. 2192-4.
61. Gluckman, E., et al., *Milestones in umbilical cord blood transplantation*. Br J Haematol, 2011. **154**(4): p. 441-7.
62. Knudtzon, S., *In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood*. Blood, 1974. **43**(3): p. 357-61.

63. Broxmeyer, H.E., et al., *Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(10): p. 3828-32.
64. Vormoor, J., et al., *Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice*. Blood, 1994. **83**(9): p. 2489-97.
65. Bock, T.A., et al., *Improved engraftment of human hematopoietic cells in severe combined immunodeficient (SCID) mice carrying human cytokine transgenes*. J Exp Med, 1995. **182**(6): p. 2037-43.
66. Wagner, J.E., et al., *Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment*. Blood, 1992. **79**(7): p. 1874-81.
67. Gluckman, E., et al., *Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling*. N Engl J Med, 1989. **321**(17): p. 1174-8.
68. Kurtzberg, J., et al., *Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients*. N Engl J Med, 1996. **335**(3): p. 157-66.
69. 2014, B.M.D.W.
70. Gluckman, E.G., V.V. Roch, and C. Chastang, *Use of Cord Blood Cells for Banking and Transplant*. Oncologist, 1997. **2**(5): p. 340-343.
71. Gluckman, E., et al., *Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors*. New England Journal of Medicine, 1997. **337**(6): p. 373-381.
72. Sato, A., et al., *Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning in adults with advanced myelodysplastic syndromes*. Bone Marrow Transplant, 2011. **46**(2): p. 257-61.
73. Eapen, M., et al., *Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study*. Lancet, 2007. **369**(9577): p. 1947-54.
74. Cable, R., N. Lelie, and A. Bird, *Reduction of the risk of transfusion-transmitted viral infection by nucleic acid amplification testing in the Western Cape of South Africa: a 5-year review*. Vox Sang, 2013. **104**(2): p. 93-9.
75. Al-Husaini, A.M., *Role of placenta in the vertical transmission of human immunodeficiency virus*. J Perinatol, 2009. **29**(5): p. 331-6.
76. Kogler, G., et al., *Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood: critical issues*. J Hematother, 1996. **5**(2): p. 105-16.
77. Gluckman, E., V. Rocha, and C. Chastang, *Cord blood banking and transplant in Europe*. Eurocord. Bone Marrow Transplant, 1998. **22 Suppl 1**: p. S68-74.
78. Rocha, V., et al., *Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia*. N Engl J Med, 2004. **351**(22): p. 2276-85.
79. Wagner, J.E., Jr., et al., *One-unit versus two-unit cord-blood transplantation for hematologic cancers*. N Engl J Med, 2014. **371**(18): p. 1685-94.
80. Laughlin, M.J., et al., *Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia*. N Engl J Med, 2004. **351**(22): p. 2265-75.
81. Takahashi, S., et al., *Comparative single-institute analysis of cord blood transplantation from unrelated donors with bone marrow or peripheral blood stem-cell transplants from related donors in adult patients with hematologic malignancies after myeloablative conditioning regimen*. Blood, 2007. **109**(3): p. 1322-30.
82. Rocha, V., et al., *Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia*. Blood, 2001. **97**(10): p. 2962-71.
83. Chen, Y.H., et al., *Comparative outcomes between cord blood transplantation and bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation from unrelated donors in patients with hematologic malignancies: a single-institute analysis*. Chin Med J (Engl), 2013. **126**(13): p. 2499-503.



84. Sanz, G.F., *Unrelated donor umbilical cord blood transplantation in adults with hematologic malignancies*. *Pathol Biol (Paris)*, 2005. **53**(3): p. 165-6.
85. Laughlin, M.J., et al., *Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(24): p. 1815-22.
86. Rocha, V., et al., *Improving outcomes of cord blood transplantation: HLA matching, cell dose and other graft- and transplantation-related factors*. *Br J Haematol*, 2009. **147**(2): p. 262-74.
87. Gluckman, E., et al., *Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice*. *Exp Hematol*, 2004. **32**(4): p. 397-407.
88. Olsson, R., et al., *Graft failure in the modern era of allogeneic hematopoietic SCT*. *Bone Marrow Transplant*, 2013. **48**(4): p. 537-43.
89. Seggewiss, R. and H. Einsele, *Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update*. *Blood*, 2010. **115**(19): p. 3861-8.
90. Devillier, R., et al., *Poor outcome with nonmyeloablative conditioning regimen before cord blood transplantation for patients with high-risk acute myeloid leukemia compared with matched related or unrelated donor transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2014. **20**(10): p. 1560-5.
91. Dalle, J.H., 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): p. 605-11.
92. Sugita, J., et al., *Influence of conditioning regimens and stem cell sources on donor-type chimerism early after stem cell transplantation*. *Ann Hematol*, 2008. **87**(12): p. 1003-8.
93. Papayannopoulou, T. and D.T. Scadden, *Stem-cell ecology and stem cells in motion*. *Blood*, 2008. **111**(8): p. 3923-30.
94. Merindol, N., et al., *Complementary and contrasting roles of NK cells and T cells in pediatric umbilical cord blood transplantation*. *J Leukoc Biol*, 2011. **90**(1): p. 49-60.
95. Danby, R. and V. Rocha, *Improving engraftment and immune reconstitution in umbilical cord blood transplantation*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 68.
96. Nguyen, S., et al., *NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect*. *Blood*, 2005. **105**(10): p. 4135-42.
97. Vago, L., et al., *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*, 2008. **112**(8): p. 3488-99.
98. Verneris, M.R. and J.S. Miller, *The phenotypic and functional characteristics of umbilical cord blood and peripheral blood natural killer cells*. *Br J Haematol*, 2009. **147**(2): p. 185-91.
99. Tanaka, J., et al., *Increased number of CD16(+)CD56(dim) NK cells in peripheral blood mononuclear cells after allogeneic cord blood transplantation*. *Hum Immunol*, 2009. **70**(9): p. 701-5.
100. Thomson, B.G., et al., *Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation*. *Blood*, 2000. **96**(8): p. 2703-11.
101. Niehues, T., et al., *Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children -- a Eurocord analysis*. *Br J Haematol*, 2001. **114**(1): p. 42-8.
102. Renard, C., et al., *Lymphocyte subset reconstitution after unrelated cord blood or bone marrow transplantation in children*. *Br J Haematol*, 2011. **152**(3): p. 322-30.

103. Marie-Cardine, A., et al., *Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation*. Clin Immunol, 2008. **127**(1): p. 14-25.
104. Krenger, W., B.R. Blazar, and G.A. Hollander, *Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation*. Blood, 2011. **117**(25): p. 6768-76.
105. Bourgeois, C. and B. Stockinger, *T cell homeostasis in steady state and lymphopenic conditions*. Immunol Lett, 2006. **107**(2): p. 89-92.
106. Cohen, G., et al., *Antigen-specific T-lymphocyte function after cord blood transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**(12): p. 1335-42.
107. Komanduri, K.V., et al., *Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4543-4551.
108. Roux, E., et al., *Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity*. Blood, 2000. **96**(6): p. 2299-303.
109. Mackall, C.L., et al., *T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny*. Blood, 1993. **82**(8): p. 2585-94.
110. Roux, E., et al., *Analysis of T-cell repopulation after allogeneic bone marrow transplantation: significant differences between recipients of T-cell depleted and unmanipulated grafts*. Blood, 1996. **87**(9): p. 3984-92.
111. Gill, J., et al., *Thymic generation and regeneration*. Immunol Rev, 2003. **195**: p. 28-50.
112. Scollay, R. and D.I. Godfrey, *Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips?* Immunol Today, 1995. **16**(6): p. 268-73; discussion 273-4.
113. McCaughy, T.M., M.S. Wilken, and K.A. Hogquist, *Thymic emigration revisited*. J Exp Med, 2007. **204**(11): p. 2513-20.
114. Eyrich, M., et al., *Onset of thymic recovery and plateau of thymic output are differentially regulated after stem cell transplantation in children*. Biol Blood Marrow Transplant, 2005. **11**(3): p. 194-205.
115. Poulin, J.F., et al., *Direct evidence for thymic function in adult humans*. J Exp Med, 1999. **190**(4): p. 479-86.
116. Escalon, M.P. and K.V. Komanduri, *Cord blood transplantation: evolving strategies to improve engraftment and immune reconstitution*. Curr Opin Oncol, 2010. **22**(2): p. 122-9.
117. Krenger, W. and G.A. Hollander, *The immunopathology of thymic GVHD*. Semin Immunopathol, 2008. **30**(4): p. 439-56.
118. Finocchi, A., et al., *Rapid T-cell receptor CD4+ repertoire reconstitution and immune recovery in unrelated umbilical cord blood transplanted pediatric leukemia patients*. J Pediatr Hematol Oncol, 2006. **28**(7): p. 403-11.
119. Talvensaari, K., 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): p. 1458-64.
120. Leung, W., M. Ramirez, and C.I. Civin, *Quantity and quality of engrafting cells in cord blood and autologous mobilized peripheral blood*. Biol Blood Marrow Transplant, 1999. **5**(2): p. 69-76.
121. Murohara, T., et al., *Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization*. J Clin Invest, 2000. **105**(11): p. 1527-36.
122. Kimmig, S., et al., *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**(6): p. 789-94.
123. Kaminski, B.A., et al., *Reduced expression of NFAT-associated genes in UCB versus adult CD4+ T lymphocytes during primary stimulation*. Blood, 2003. **102**(13): p. 4608-17.

124. Kim, Y.J. and H.E. Broxmeyer, *Immune regulatory cells in umbilical cord blood and their potential roles in transplantation tolerance*. Crit Rev Oncol Hematol, 2011. **79**(2): p. 112-26.
125. Chalmers, I.M., et al., *Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes*. Blood, 1998. **92**(1): p. 11-8.
126. Guller, S. and L. LaChapelle, *The role of placental Fas ligand in maintaining immune privilege at maternal-fetal interfaces*. Seminars in Reproductive Endocrinology, 1999. **17**(1): p. 39-44.
127. Pereira, L. and E. Maidji, *Cytomegalovirus infection in the human placenta: Maternal immunity and developmentally regulated receptors on trophoblasts converge*. Human Cytomegalovirus, 2008. **325**: p. 383-395.
128. Scott, G.M., et al., *Cytomegalovirus Infection During Pregnancy With Maternofetal Transmission Induces a Proinflammatory Cytokine Bias in Placenta and Amniotic Fluid*. Journal of Infectious Diseases, 2012. **205**(8): p. 1305-1310.
129. Remberger, M., et al., *Second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a treatment for graft failure*. Clin Transplant, 2011. **25**(1): p. E68-76.
130. Schriber, J., et al., *Second unrelated donor hematopoietic cell transplantation for primary graft failure*. Biol Blood Marrow Transplant, 2010. **16**(8): p. 1099-106.
131. Mattsson, J., O. Ringden, and R. Storb, *Graft Failure after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2008. **14**(Supplement 1): p. 165-170.
132. Eapen, M., et al., *Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis*. Lancet Oncol, 2010. **11**(7): p. 653-60.
133. Barker, J.N., A. Scaradavou, and C.E. Stevens, *Combined effect of total nucleated cell dose and HLA match on transplantation outcome in 1061 cord blood recipients with hematologic malignancies*. Blood, 2010. **115**(9): p. 1843-1849.
134. Anasetti, C., et al., *Peripheral-blood versus bone marrow stem cells*. N Engl J Med, 2013. **368**(3): p. 288.
135. Anasetti, C., et al., *Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors*. N Engl J Med, 2012. **367**(16): p. 1487-96.
136. Cutler, C., et al., *Donor-specific anti-HLA antibodies predict outcome in double umbilical cord blood transplantation*. Blood, 2011. **118**(25): p. 6691-7.
137. Yoshihara, S., et al., *Risk and prevention of graft failure in patients with preexisting donor-specific HLA antibodies undergoing unmanipulated haploidentical SCT*. Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(4): p. 508-15.
138. Dvorak, C.C. and M.J. Cowan, *Hematopoietic stem cell transplantation for primary immunodeficiency disease*. Bone Marrow Transplant, 2008. **41**(2): p. 119-26.
139. Kiessling, R., et al., *Evidence for a similar or common mechanism for natural killer cell activity and resistance to hemopoietic grafts*. Eur J Immunol, 1977. **7**(9): p. 655-63.
140. Murphy, W.J., V. Kumar, and M. Bennett, *Acute rejection of murine bone marrow allografts by natural killer cells and T cells. Differences in kinetics and target antigens recognized*. J Exp Med, 1987. **166**(5): p. 1499-509.
141. Takanashi, M., et al., *The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations*. Blood, 2010. **116**(15): p. 2839-46.
142. Ciurea, S.O., et al., *Donor-specific anti-HLA Abs and graft failure in matched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2011. **118**(22): p. 5957-64.
143. Martinez, O.M. and S.M. Krams, *Involvement of Fas-Fas ligand interactions in graft rejection*. Int Rev Immunol, 1999. **18**(5-6): p. 527-46.

144. Scheffold, C., et al., *Cytokines and cytotoxic pathways in engraftment resistance to purified allogeneic hematopoietic stem cells*. Biol Blood Marrow Transplant, 2005. **11**(1): p. 1-12.
145. Zimmerman, Z., et al., *Cytolytic pathways used by effector cells derived from recipient naive and memory T cells and natural killer cells in resistance to allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2005. **11**(12): p. 957-71.
146. Billingham, R.E., *The biology of graft-versus-host reactions*. Harvey Lect, 1966. **62**: p. 21-78.
147. Shulman, H.M., et al., *Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients*. Am J Med, 1980. **69**(2): p. 204-17.
148. Socie, G., *The NIH consensus criteria for chronic graft-versus-host disease: far more than just another classification*. Leukemia, 2009. **23**(1): p. 1-2.
149. Filipovich, A.H., et al., *National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report*. Biol Blood Marrow Transplant, 2005. **11**(12): p. 945-56.
150. Graze, P.R. and R.P. Gale, *Chronic graft versus host disease: a syndrome of disordered immunity*. Am J Med, 1979. **66**(4): p. 611-20.
151. Linhares, Y.P., S. Pavletic, and R.P. Gale, *Chronic GVHD: Where are we? Where do we want to be? Will immunomodulatory drugs help?* Bone Marrow Transplant, 2013. **48**(2): p. 203-9.
152. CIBMTR.
153. Korngold, R. and J. Sprent, *Lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers in mice*. Clin Haematol, 1983. **12**(3): p. 681-93.
154. Ball, L.M., R.M. Egeler, and E.P.W. Party, *Acute GvHD: pathogenesis and classification*. Bone Marrow Transplant, 2008. **41 Suppl 2**: p. S58-64.
155. Spierings, E., B. Wieles, and E. Goulmy, *Minor histocompatibility antigens--big in tumour therapy*. Trends Immunol, 2004. **25**(2): p. 56-60.
156. Kollman, C., et al., *Non-HLA barriers to unrelated donor stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2001. **27**(6): p. 581-7.
157. Dickinson, A.M. and E. Holler, *Polymorphisms of cytokine and innate immunity genes and GVHD*. Best Pract Res Clin Haematol, 2008. **21**(2): p. 149-64.
158. Jagasia, M., et al., *Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2012. **119**(1): p. 296-307.
159. Cantoni, N., et al., *Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 2010. **16**(9): p. 1309-14.
160. Flowers, M.E., et al., *Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria*. Blood, 2011. **117**(11): p. 3214-9.
161. Mohty, M., et al., *Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4407-11.
162. Blazar, B.R., W.J. Murphy, and M. Abedi, *Advances in graft-versus-host disease biology and therapy*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(6): p. 443-58.
163. Ferrara, J.L., K.R. Cooke, and T. Teshima, *The pathophysiology of acute graft-versus-host disease*. Int J Hematol, 2003. **78**(3): p. 181-7.
164. Zeiser, R., et al., *Immunopathogenesis of acute graft-versus-host disease: implications for novel preventive and therapeutic strategies*. Ann Hematol, 2004. **83**(9): p. 551-65.
165. Markey, K.A., K.P. MacDonald, and G.R. Hill, *The biology of graft-versus-host disease: experimental systems instructing clinical practice*. Blood, 2014. **124**(3): p. 354-62.

166. Herr, A.L., et al., *Long-term follow-up and factors influencing outcomes after related HLA-identical cord blood transplantation for patients with malignancies: an analysis on behalf of Eurocord-EBMT*. *Blood*, 2010. **116**(11): p. 1849-56.
167. Gluckman, E., V. Rocha, and S. Chevret, *Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplant*. *Transfus Clin Biol*, 2001. **8**(3): p. 146-54.
168. Wagner, J.E., 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): p. 795-802.
169. Rocha, V., et al., *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*, 2000. **342**(25): p. 1846-54.
170. Chen, B.J., et al., *Transfer of allogeneic CD62L- memory T cells without graft-versus-host disease*. *Blood*, 2004. **103**(4): p. 1534-41.
171. Foster, A.E., et al., *Human CD62L- memory T cells are less responsive to alloantigen stimulation than CD62L+ naive T cells: potential for adoptive immunotherapy and allodepletion*. *Blood*, 2004. **104**(8): p. 2403-9.
172. Kaminski, B.A., et al., *Reduced expression of NFAT-associated genes in UCB versus adult CD4(+) T lymphocytes during primary stimulation*. *Blood*, 2003. **102**(13): p. 4608-4617.
173. Chen, L., A.C. Cohen, and D.B. Lewis, *Impaired allogeneic activation and T-helper 1 differentiation of human cord blood naive CD4 T cells*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2006. **12**(2): p. 160-71.
174. Tolar, J., K.L. Hippen, and B.R. Blazar, *Immune regulatory cells in umbilical cord blood: T regulatory cells and mesenchymal stromal cells*. *Br J Haematol*, 2009. **147**(2): p. 200-6.
175. Mayer, E., et al., *Cord blood derived CD4+ CD25(high) T cells become functional regulatory T cells upon antigen encounter*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e29355.
176. Koyama, M., et al., *Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease*. *Nat Med*, 2012. **18**(1): p. 135-42.
177. Li, H., et al., *Profound depletion of host conventional dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells, and B cells does not prevent graft-versus-host disease induction*. *J Immunol*, 2012. **188**(8): p. 3804-11.
178. Barnes, D.W., et al., *Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication*. *Br Med J*, 1956. **2**(4993): p. 626-7.
179. Rodt, H., et al., *GVHD suppression by incubation of bone marrow grafts with anti-T-cell globulin: effect in the canine model and application to clinical bone marrow transplantation*. *Transplant Proc*, 1979. **11**(1): p. 962-6.
180. Bleakley, M. and S.R. Riddell, *Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(5): p. 371-80.
181. Ruggeri, L., et al., *Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants*. *Science*, 2002. **295**(5562): p. 2097-100.
182. Michel, G., et al., *Unrelated cord blood transplantation for childhood acute myeloid leukemia: a Eurocord Group analysis*. *Blood*, 2003. **102**(13): p. 4290-7.
183. Lee, Y.S., T.S. Kim, and D.K. Kim, *T lymphocytes derived from human cord blood provide effective antitumor immunotherapy against a human tumor*. *BMC Cancer*, 2011. **11**: p. 225.
184. van Rood, J.J., et al., *Reexposure of cord blood to noninherited maternal HLA antigens improves transplant outcome in hematological malignancies*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(47): p. 19952-7.
185. Hiwarkar, P., et al., *Cord blood T cells mediate enhanced antitumor effects compared with adult peripheral blood T cells*. *Blood*, 2015. **126**(26): p. 2882-91.

186. Barker, J.N., et al., *Serious infections after unrelated donor transplantation in 136 children: impact of stem cell source*. Biol Blood Marrow Transplant, 2005. **11**(5): p. 362-70.
187. Parody, R., et al., *Severe infections after unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: comparison of cord blood transplantation with peripheral blood and bone marrow transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**(7): p. 734-48.
188. Ljungman, P., M. Hakki, and M. Boeckh, *Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients*. Hematol Oncol Clin North Am, 2011. **25**(1): p. 151-69.
189. Takami, A., et al., *High incidence of cytomegalovirus reactivation in adult recipients of an unrelated cord blood transplant*. Haematologica, 2005. **90**(9): p. 1290-2.
190. Tomonari, A., 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**(3): p. 251-7.
191. Uchida, N., et al., *Umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning for elderly patients with hematologic diseases*. Biol Blood Marrow Transplant, 2008. **14**(5): p. 583-90.
192. Beck, J.C., et al., *Impact of cytomegalovirus (CMV) reactivation after umbilical cord blood transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2010. **16**(2): p. 215-22.
193. Mikulska, M., et al., *CMV Infection after Transplant from Cord Blood Compared to Other Alternative Donors: The Importance of Donor-Negative CMV Serostatus*. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2012. **18**(1): p. 92-99.
194. Goodrich, J.M., et al., *Ganciclovir Prophylaxis to Prevent Cytomegalovirus Disease after Allogeneic Marrow Transplant*. Annals of Internal Medicine, 1993. **118**(3): p. 173-178.
195. Iori, A.P., et al., *Impact of long-term low- versus high-dose acyclovir prophylaxis on cytomegalovirus infection and survival after allogeneic stem cell transplantation: a single-centre study*. Bone Marrow Transplantation, 2010. **45**: p. S231-S231.
196. Goodrich, J.M., et al., *Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant*. Ann Intern Med, 1993. **118**(3): p. 173-8.
197. Salzberger, B., et al., *Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: risk factors and outcome*. Blood, 1997. **90**(6): p. 2502-8.
198. Eckle, T., et al., *Drug-resistant human cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation may have different clinical outcomes*. Blood, 2000. **96**(9): p. 3286-9.
199. Hebart, H. and H. Einsele, *Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation*. Hum Immunol, 2004. **65**(5): p. 432-6.
200. Walker, C.M., et al., *Cytomegalovirus infection after allogeneic transplantation: comparison of cord blood with peripheral blood and marrow graft sources*. Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**(9): p. 1106-15.
201. Boeckh, M., et al., *Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies*. Biol Blood Marrow Transplant, 2003. **9**(9): p. 543-58.
202. Kim, S.T., et al., *A randomized trial of preemptive therapy for prevention of cytomegalovirus disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Int J Hematol, 2010. **91**(5): p. 886-91.
203. Zaia, J.A., *Prevention of cytomegalovirus disease in hematopoietic stem cell transplantation*. Clin Infect Dis, 2002. **35**(8): p. 999-1004.
204. Kondo, E., et al., *Identification of novel CTL epitopes of CMV-pp65 presented by a variety of HLA alleles*. Blood, 2004. **103**(2): p. 630-8.
205. Landolfo, S., et al., *The human cytomegalovirus*. Pharmacol Ther, 2003. **98**(3): p. 269-97.

206. Slezak, S.L., et al., *CMV pp65 and IE-1 T cell epitopes recognized by healthy subjects*. J Transl Med, 2007. **5**: p. 17.
207. Gratama, J.W., 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**(10): p. 1655-62.
208. Pastore, D., et al., *Recovery of CMV-specific CD8+ T cells and Tregs after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2011. **17**(4): p. 550-7.
209. McGoldrick, S.M., et al., *Cytomegalovirus-specific T cells are primed early after cord blood transplant but fail to control virus in vivo*. Blood, 2013. **121**(14): p. 2796-803.
210. Arvin, A.M., *Varicella-Zoster virus: pathogenesis, immunity, and clinical management in hematopoietic cell transplant recipients*. Biol Blood Marrow Transplant, 2000. **6**(3): p. 219-30.
211. Tomonari, A., et al., *Varicella-zoster virus infection in adult patients after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan*. Br J Haematol, 2003. **122**(5): p. 802-5.
212. Vandenbosch, K., et al., *Varicella-zoster virus disease is more frequent after cord blood than after bone marrow transplantation*. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2008. **14**(8): p. 867-871.
213. Tomblyn, M., et al., *Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective*. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2009. **15**(10): p. 1143-1238.
214. Boeckh, M., et al., *Long-term acyclovir for prevention of varicella zoster virus disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation--a randomized double-blind placebo-controlled study*. Blood, 2006. **107**(5): p. 1800-5.
215. Steer, C.B., et al., *Varicella-zoster infection after allogeneic bone marrow transplantation: incidence, risk factors and prevention with low-dose aciclovir and ganciclovir*. Bone Marrow Transplant, 2000. **25**(6): p. 657-64.
216. Distler, E., et al., *Recovery of Varicella-Zoster Virus-Specific T Cell Immunity after T Cell-Depleted Allogeneic Transplantation Requires Symptomatic Virus Reactivation*. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2008. **14**(12): p. 1417-1424.
217. Weinberg, A. and M.J. Levin, *VZV T Cell-Mediated Immunity*. Varicella-Zoster Virus, 2010. **342**: p. 341-357.
218. Arvin, A.M., *Humoral and cellular immunity to varicella-zoster virus: An overview*. Journal of Infectious Diseases, 2008. **197**: p. S58-S60.
219. Arvin, A.M., *Cell-Mediated-Immunity to Varicella-Zoster Virus*. Journal of Infectious Diseases, 1992. **166**: p. S35-S41.
220. Barker, J.N., et al., *Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy*. Blood, 2005. **105**(3): p. 1343-1347.
221. Ruggeri, A., et al., *Comparison of outcomes after single or double cord blood transplantation in adults with acute leukemia using different types of myeloablative conditioning regimen, a retrospective study on behalf of Eurocord and the Acute Leukemia Working Party of EBMT*. Leukemia, 2014. **28**(4): p. 779-786.
222. Brunstein, C.G., et al., *Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease*. Blood, 2007. **110**(8): p. 3064-70.
223. MacMillan, M.L., et al., *Acute graft-versus-host disease after unrelated donor umbilical cord blood transplantation: analysis of risk factors*. Blood, 2009. **113**(11): p. 2410-2415.

224. Verneris, M.R., et al., *Relapse risk after umbilical cord blood transplantation: enhanced graft-versus-leukemia effect in recipients of 2 units*. Blood, 2009. **114**(19): p. 4293-4299.
225. Barker, J.N., et al., *Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy*. Blood, 2005. **105**(3): p. 1343-7.
226. Lund, T.C., et al., *Advances in umbilical cord blood manipulation-from niche to bedside*. Nat Rev Clin Oncol, 2015. **12**(3): p. 163-74.
227. Ruggeri, A., et al., *Comparison of outcomes after single or double cord blood transplantation in adults with acute leukemia using different types of myeloablative conditioning regimen, a retrospective study on behalf of Eurocord and the Acute Leukemia Working Party of EBMT*. Leukemia, 2014. **28**(4): p. 779-86.
228. Shpall, E.J., et al., *Transplantation of ex vivo expanded cord blood*. Biol Blood Marrow Transplant, 2002. **8**(7): p. 368-76.
229. Delaney, C., et al., *Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution*. Nat Med, 2010. **16**(2): p. 232-6.
230. Crisan, M., et al., *A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(3): p. 301-313.
231. Caplan, A.I. and J.E. Dennis, *Mesenchymal stem cells as trophic mediators*. Journal of Cellular Biochemistry, 2006. **98**(5): p. 1076-1084.
232. Weber, J.M. and L.M. Calvi, *Notch signaling and the bone marrow hematopoietic stem cell niche*. Bone, 2010. **46**(2): p. 281-285.
233. de Lima, M., et al., *Cord-Blood Engraftment with Ex Vivo Mesenchymal-Cell Coculture*. New England Journal of Medicine, 2012. **367**(24): p. 2305-2315.
234. Frassoni, F., et al., *Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study*. Lancet Oncology, 2008. **9**(9): p. 831-839.
235. Saglio, F., et al., *Intrabone Cord Blood Hematopoietic Stem Cell Transplantation in a Subset of Very High-risk Pediatric Patients A Safety and Feasibility Pilot Study*. Journal of Pediatric Hematology Oncology, 2012. **34**(5): p. 359-363.
236. Tashiro, K., et al., *Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins*. Science, 1993. **261**(5121): p. 600-3.
237. Kim, C.H. and H.E. Broxmeyer, *In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment*. Blood, 1998. **91**(1): p. 100-10.
238. Broxmeyer, H.E., et al., *Dipeptidylpeptidase 4 negatively regulates colony-stimulating factor activity and stress hematopoiesis*. Nature Medicine, 2012. **18**(12): p. 1786-+.
239. Christopherson, K.W., G. Hangoc, and H.E. Broxmeyer, *Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34(+) progenitor cells*. Journal of Immunology, 2002. **169**(12): p. 7000-7008.
240. Christopherson, K.W., et al., *Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26*. Science, 2004. **305**(5686): p. 1000-1003.
241. Hanley, P.J., et al., *Expanding Cytotoxic T Lymphocytes from Umbilical Cord Blood that Target Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus*. Jove-Journal of Visualized Experiments, 2012(63).
242. Serrano, L.M., et al., *Differentiation of naive cord-blood T cells into CD19-specific cytolytic effectors for posttransplantation adoptive immunotherapy*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2643-52.
243. Kochenderfer, J.N., et al., *B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells*. Blood, 2012. **119**(12): p. 2709-2720.



244. Kalos, M., et al., *T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia*. Science Translational Medicine, 2011. **3**(95).
245. Micklethwaite, K.P., et al., *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, 2010. **115**(13): p. 2695-2703.
246. Wherry, E.J., *T cell exhaustion*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 492-9.
247. Norde, W.J., et al., *PD-1/PD-L1 interactions contribute to functional T-cell impairment in patients who relapse with cancer after allogeneic stem cell transplantation*. Cancer Res, 2011. **71**(15): p. 5111-22.
248. Kong, Y., et al., *PD-1(hi)TIM-3(+) T cells associate with and predict leukemia relapse in AML patients post allogeneic stem cell transplantation*. Blood Cancer J, 2015. **5**: p. e330.
249. Merindol, N., et al., *CD8(+) T-cell reconstitution in recipients of umbilical cord blood transplantation and characteristics associated with leukemic relapse*. Blood, 2011. **118**(16): p. 4480-8.
250. Sousa, A.E., et al., *CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 3400-6.
251. Hazenberg, M.D., et al., *Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS*. AIDS, 2003. **17**(13): p. 1881-8.
252. Camara, M., et al., *Low-level CD4+ T cell activation in HIV-exposed seronegative subjects: influence of gender and condom use*. J Infect Dis, 2010. **201**(6): p. 835-42.
253. Attanasio, J. and E.J. Wherry, *Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease*. Immunity, 2016. **44**(5): p. 1052-68.
254. Crawford, A. and E.J. Wherry, *The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(2): p. 179-86.
255. Wei, F., et al., *Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(27): p. E2480-9.
256. Paley, M.A., et al., *Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection*. Science, 2012. **338**(6111): p. 1220-5.
257. Schildberg, F.A., et al., *Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family*. Immunity, 2016. **44**(5): p. 955-72.
258. Groschel, S., et al., *TLR-mediated induction of negative regulatory ligands on dendritic cells*. J Mol Med (Berl), 2008. **86**(4): p. 443-55.
259. Dong, H., et al., *B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion*. Nat Med, 1999. **5**(12): p. 1365-9.
260. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 677-704.
261. Liang, S.C., et al., *Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses*. Eur J Immunol, 2003. **33**(10): p. 2706-16.
262. Wang, Y., et al., *STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(42): p. 16975-80.
263. Liu, Y., et al., *FoxA1 directs the lineage and immunosuppressive properties of a novel regulatory T cell population in EAE and MS*. Nat Med, 2014. **20**(3): p. 272-82.
264. Francisco, L.M., P.T. Sage, and A.H. Sharpe, *The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity*. Immunol Rev, 2010. **236**: p. 219-42.
265. Loke, P. and J.P. Allison, *PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5336-41.

266. Yamazaki, T., et al., *Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5538-45.
267. Teijaro, J.R., et al., *Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling*. Science, 2013. **340**(6129): p. 207-11.
268. Wilson, E.B., et al., *Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection*. Science, 2013. **340**(6129): p. 202-7.
269. Terawaki, S., et al., *IFN-alpha directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity*. J Immunol, 2011. **186**(5): p. 2772-9.
270. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. Science, 2010. **327**(5963): p. 291-5.
271. Berry, M.P., et al., *An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis*. Nature, 2010. **466**(7309): p. 973-7.
272. Sarasin-Filipowicz, M., et al., *Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(19): p. 7034-9.
273. George, P.M., et al., *Pharmacology and therapeutic potential of interferons*. Pharmacol Ther, 2012. **135**(1): p. 44-53.
274. Lin, S.J., et al., *Programmed death-1 (PD-1) defines a transient and dysfunctional oligoclonal T cell population in acute homeostatic proliferation*. Journal of Experimental Medicine, 2007. **204**(10): p. 2321-2333.
275. Kinter, A.L., et al., *The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 6738-46.
276. Bosco, N., F. Agenes, and R. Ceredig, *Effects of increasing IL-7 availability on lymphocytes during and after lymphopenia-induced proliferation*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 162-70.
277. Purton, J.F., et al., *Antiviral CD4+ memory T cells are IL-15 dependent*. J Exp Med, 2007. **204**(4): p. 951-61.
278. Shive, C.L., et al., *Inflammatory cytokines drive CD4+ T-cell cycling and impaired responsiveness to interleukin 7: implications for immune failure in HIV disease*. J Infect Dis, 2014. **210**(4): p. 619-29.
279. Godfrey, W.R., et al., *Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function*. Blood, 2005. **105**(2): p. 750-8.
280. Alatrakchi, N., et al., *Hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ cells produce transforming growth factor beta that can suppress HCV-specific T-cell responses*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5882-92.
281. Agnellini, P., et al., *Impaired NFAT nuclear translocation results in split exhaustion of virus-specific CD8+ T cell functions during chronic viral infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(11): p. 4565-70.
282. Martinez, G.J., et al., *The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8(+) T cells*. Immunity, 2015. **42**(2): p. 265-78.
283. Moskophidis, D., et al., *Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells*. Nature, 1993. **362**(6422): p. 758-61.
284. Gallimore, A., et al., *Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes*. J Exp Med, 1998. **187**(9): p. 1383-93.
285. Wherry, E.J., et al., *Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment*. J Virol, 2003. **77**(8): p. 4911-27.

286. Wherry, E.J., et al., *Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection*. *Immunity*, 2007. **27**(4): p. 670-84.
287. Blattman, J.N., et al., *Impact of epitope escape on PD-1 expression and CD8 T-cell exhaustion during chronic infection*. *J Virol*, 2009. **83**(9): p. 4386-94.
288. Jamieson, B.D., et al., *Epitope escape mutation and decay of human immunodeficiency virus type 1-specific CTL responses*. *J Immunol*, 2003. **171**(10): p. 5372-9.
289. Prakash, M.D., et al., *Granzyme B promotes cytotoxic lymphocyte transmigration via basement membrane remodeling*. *Immunity*, 2014. **41**(6): p. 960-72.
290. Wherry, E.J., et al., *Molecular signature of CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection (vol 27, pg 670, 2007)*. *Immunity*, 2007. **27**(5): p. 824-824.
291. Day, C.L., et al., *PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression*. *Nature*, 2006. **443**(7109): p. 350-354.
292. Yamamoto, T., et al., *Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8(+) T-cell exhaustion in HIV infection*. *Blood*, 2011. **117**(18): p. 4805-4815.
293. Sumida, K., et al., *Characteristics of splenic CD8(+) T cell exhaustion in patients with hepatitis C*. *Clinical and Experimental Immunology*, 2013. **174**(1): p. 172-178.
294. Kasprowicz, V., et al., *High Level of PD-1 Expression on Hepatitis C Virus (HCV)-Specific CD8(+) and CD4(+) T Cells during Acute HCV Infection, Irrespective of Clinical Outcome (vol 82, pg 3154, 2008)*. *Journal of Virology*, 2011. **85**(9): p. 4633-4633.
295. Baitsch, L., et al., *Exhaustion of tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients*. *Journal of Clinical Investigation*, 2011. **121**(6): p. 2350-2360.
296. Haymaker, C., et al., *PD-1 and BTLA and CD8(+) T-cell "exhaustion" in cancer "Exercising" an alternative viewpoint*. *Oncoimmunology*, 2012. **1**(5): p. 735-738.
297. Horne-Debets, J.M., et al., *PD-1 Dependent Exhaustion of CD8(+) T Cells Drives Chronic Malaria*. *Cell Reports*, 2013. **5**(5): p. 1204-1213.
298. Wykes, M.N., et al., *Malaria drives T cells to exhaustion*. *Frontiers in Microbiology*, 2014. **5**.
299. Baitsch, L., et al., *Exhaustion of tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(6): p. 2350-60.
300. Blackburn, S.D., et al., *Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(1): p. 29-37.
301. Johnston, R.J., et al., *The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function*. *Cancer Cell*, 2014. **26**(6): p. 923-37.
302. Doering, T.A., et al., *Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory*. *Immunity*, 2012. **37**(6): p. 1130-44.
303. Schietinger, A. and P.D. Greenberg, *Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction*. *Trends Immunol*, 2014. **35**(2): p. 51-60.
304. Quigley, M., et al., *Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF*. *Nat Med*, 2010. **16**(10): p. 1147-51.
305. Cox, M.A., L.E. Harrington, and A.J. Zajac, *Cytokines and the inception of CD8 T cell responses*. *Trends Immunol*, 2011. **32**(4): p. 180-6.
306. Wherry, E.J. and M. Kurachi, *Molecular and cellular insights into T cell exhaustion*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(8): p. 486-99.
307. Cambier, J.C., *New nomenclature for the Reth motif (or ARHI/TAM/ARAM/YXXL)*. *Immunol Today*, 1995. **16**(2): p. 110.
308. Burshtyn, D.N., et al., *Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor*. *Immunity*, 1996. **4**(1): p. 77-85.
309. Reth, M., *Antigen receptor tail clue*. *Nature*, 1989. **338**(6214): p. 383-4.

310. Fuertes Marraco, S.A., et al., *Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 310.
311. Butte, M.J., et al., *Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses*. Immunity, 2007. **27**(1): p. 111-22.
312. Pentcheva-Hoang, T., et al., *B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse*. Immunity, 2004. **21**(3): p. 401-13.
313. Quigley, M., et al., *Transcriptional analysis of HIV-specific CD8(+) T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF*. Nature Medicine, 2010. **16**(10): p. 1147-U127.
314. Odorizzi, P.M., et al., *Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8(+) T cells*. Journal of Experimental Medicine, 2015. **212**(7): p. 1125-1137.
315. Nakamoto, N., et al., *Synergistic Reversal of Intrahepatic HCV-Specific CD8 T Cell Exhaustion by Combined PD-1/CTLA-4 Blockade*. Plos Pathogens, 2009. **5**(2).
316. Nakamoto, N., et al., *Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade*. PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000313.
317. Sakuishi, K., et al., *Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity (vol 207, pg 2187, 2010)*. Journal of Experimental Medicine, 2011. **208**(6): p. 1331-1331.
318. Jin, H.T., et al., *Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(33): p. 14733-14738.
319. Chew, G.M., et al., *TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection*. Plos Pathogens, 2016. **12**(1).
320. Li, M., et al., *T-cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT) Receptor/Poliovirus Receptor (PVR) Ligand Engagement Suppresses Interferon-gamma Production of Natural Killer Cells via beta-Arrestin 2-mediated Negative Signaling*. Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(25): p. 17647-17657.
321. Grosso, J.F., et al., *LAG-3 regulates CD8+ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems*. J Clin Invest, 2007. **117**(11): p. 3383-92.
322. Grosso, J.F., et al., *Functionally distinct LAG-3 and PD-1 subsets on activated and chronically stimulated CD8 T cells*. J Immunol, 2009. **182**(11): p. 6659-69.
323. Lines, J.L., et al., *VISTA Is a Novel Broad-Spectrum Negative Checkpoint Regulator for Cancer Immunotherapy*. Cancer Immunology Research, 2014. **2**(6): p. 510-517.
324. Liu, J., et al., *Immune-checkpoint proteins VISTA and PD-1 nonredundantly regulate murine T-cell responses*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015. **112**(21): p. 6682-6687.
325. Pombo, C., et al., *Elevated Expression of CD160 and 2B4 Defines a Cytolytic HIV-Specific CD8+ T-Cell Population in Elite Controllers*. J Infect Dis, 2015. **212**(9): p. 1376-86.
326. Vigano, S., et al., *CD160-Associated CD8 T-Cell Functional Impairment Is Independent of PD-1 Expression*. Plos Pathogens, 2014. **10**(9).
327. Freeman, G.J. and A.H. Sharpe, *A new therapeutic strategy for malaria: targeting T cell exhaustion*. Nat Immunol, 2012. **13**(2): p. 113-5.
328. Parry, R.V., et al., *CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9543-53.
329. Le Mercier, I., J.L. Lines, and R.J. Noelle, *Beyond CTLA-4 and PD-1, the Generation Z of Negative Checkpoint Regulators*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 418.
330. Betts, M.R., et al., *HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4781-9.

331. Lechner, F., et al., *Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus*. J Exp Med, 2000. **191**(9): p. 1499-512.
332. Barber, D.L., et al., *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*. Nature, 2006. **439**(7077): p. 682-7.
333. Blackburn, S.D., et al., *Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15016-21.
334. Buggert, M., et al., *T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8+ T cells in HIV infection*. PLoS Pathog, 2014. **10**(7): p. e1004251.
335. Ishida, Y., et al., *Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death*. EMBO J, 1992. **11**(11): p. 3887-95.
336. Nishimura, H., et al., *Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses*. Int Immunol, 1998. **10**(10): p. 1563-72.
337. Okazaki, T., et al., *PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13866-71.
338. Radvanyi, L., et al., *Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer--letter*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(19): p. 5541.
339. Monks, C.R.F., et al., *Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells*. Nature, 1998. **395**(6697): p. 82-86.
340. Yokosuka, T., et al., *Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2*. J Exp Med, 2012. **209**(6): p. 1201-17.
341. Chemnitz, J.M., et al., *SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 945-54.
342. Pauken, K.E. and E.J. Wherry, *Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer*. Trends Immunol, 2015. **36**(4): p. 265-76.
343. Nurieva, R., et al., *T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals*. EMBO J, 2006. **25**(11): p. 2623-33.
344. Fife, B.T., et al., *Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal*. Nat Immunol, 2009. **10**(11): p. 1185-92.
345. Zhang, X., et al., *Crystal structure of the receptor-binding domain of human B7-2: insights into organization and signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2586-91.
346. Stamper, C.C., et al., *Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses*. Nature, 2001. **410**(6828): p. 608-11.
347. Linsley, P.S., et al., *Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors*. Immunity, 1994. **1**(9): p. 793-801.
348. Waterhouse, P., et al., *Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4*. Science, 1995. **270**(5238): p. 985-8.
349. Tivol, E.A., et al., *Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4*. Immunity, 1995. **3**(5): p. 541-7.
350. Rudd, C.E., A. Taylor, and H. Schneider, *CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 12-26.
351. Legat, A., et al., *Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than "Exhaustion" of Human CD8 T Cells*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 455.
352. Gonzalez, L.C., et al., *A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(4): p. 1116-21.

353. Watanabe, N., et al., *BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1*. Nature Immunology, 2003. **4**(7): p. 670-679.
354. Uchiyama, M., et al., *An agonistic anti-BTLA mAb (3C10) induced generation of IL-10-dependent regulatory CD4+ T cells and prolongation of murine cardiac allograft*. Transplantation, 2014. **97**(3): p. 301-9.
355. Hurchla, M.A., J.R. Sedy, and K.M. Murphy, *Unexpected role of B and T lymphocyte attenuator in sustaining cell survival during chronic allostimulation*. J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6073-82.
356. Fourcade, J., et al., *CD8(+) T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1*. Cancer Res, 2012. **72**(4): p. 887-96.
357. Kageyama, R., et al., *The receptor Ly108 functions as a SAP adaptor-dependent on-off switch for T cell help to B cells and NKT cell development*. Immunity, 2012. **36**(6): p. 986-1002.
358. Zhao, F., et al., *Positive and negative signaling through SLAM receptors regulate synapse organization and thresholds of cytotoxicity*. Immunity, 2012. **36**(6): p. 1003-16.
359. Hastings, W.D., et al., *TIM-3 is expressed on activated human CD4(+) T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines*. European Journal of Immunology, 2009. **39**(9): p. 2492-2501.
360. Rangachari, M., et al., *Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion*. Nat Med, 2012. **18**(9): p. 1394-400.
361. Rangachari, M., et al., *Bat3 Protects T cell responses by repressing Tim-3-mediated exhaustion and death*. Multiple Sclerosis Journal, 2011. **17**: p. S187-S187.
362. Huard, B., et al., *CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins*. Eur J Immunol, 1995. **25**(9): p. 2718-21.
363. Li, N., et al., *Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3*. EMBO J, 2007. **26**(2): p. 494-504.
364. Kroenke, M.A., et al., *Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation*. J Immunol, 2012. **188**(8): p. 3734-44.
365. Workman, C.J., K.J. Dugger, and D.A. Vignali, *Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5392-5.
366. Yu, X., et al., *The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 48-57.
367. Stanietsky, N., et al., *The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(42): p. 17858-63.
368. Levin, S.D., et al., *Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function*. Eur J Immunol, 2011. **41**(4): p. 902-15.
369. Joller, N., et al., *Cutting Edge: TIGIT Has T Cell-Intrinsic Inhibitory Functions*. Journal of Immunology, 2011. **186**(3): p. 1338-1342.
370. Zhang, T., et al., *Increased Expression of TIGIT on CD4(+) T Cells Ameliorates Immune-Mediated Bone Marrow Failure of Aplastic Anemia*. Journal of Cellular Biochemistry, 2014. **115**(11): p. 1918-1927.
371. Liu, S., et al., *Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells*. Cell Death Differ, 2013. **20**(3): p. 456-64.
372. Youngblood, B., E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Acquired transcriptional programming in functional and exhausted virus-specific CD8 T cells*. Curr Opin HIV AIDS, 2012. **7**(1): p. 50-7.

373. Schwartz, R.H., *T cell anergy*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 305-34.
374. Kao, C., et al., *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, 2011. **12**(7): p. 663-71.
375. Shin, H., et al., *A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 309-20.
376. Doedens, A.L., et al., *Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen*. Nat Immunol, 2013. **14**(11): p. 1173-82.
377. Staron, M.M., et al., *The transcription factor FoxO1 sustains expression of the inhibitory receptor PD-1 and survival of antiviral CD8(+) T cells during chronic infection*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 802-14.
378. Nutt, S.L., K.A. Fairfax, and A. Kallies, *BLIMP1 guides the fate of effector B and T cells*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(12): p. 923-7.
379. Thaventhiran, J.E. and D.T. Fearon, *Control of HIV infection: escape from the shadow of Blimp-1*. Eur J Immunol, 2013. **43**(2): p. 323-6.
380. Lu, P., et al., *Blimp-1 represses CD8 T cell expression of PD-1 using a feed-forward transcriptional circuit during acute viral infection*. J Exp Med, 2014. **211**(3): p. 515-27.
381. Schraml, B.U., et al., *The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation*. Nature, 2009. **460**(7253): p. 405-9.
382. Kuroda, S., et al., *Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like (BATF) regulates epigenetically and energetically effector CD8 T-cell differentiation via Sirt1 expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(36): p. 14885-9.
383. Youngblood, B., et al., *Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells*. Immunity, 2011. **35**(3): p. 400-12.
384. Youngblood, B., et al., *Cutting edge: Prolonged exposure to HIV reinforces a poised epigenetic program for PD-1 expression in virus-specific CD8 T cells*. J Immunol, 2013. **191**(2): p. 540-4.
385. Zhang, F., et al., *Epigenetic manipulation restores functions of defective CD8(+) T cells from chronic viral infection*. Mol Ther, 2014. **22**(9): p. 1698-706.
386. Clerici, M., et al., *Human immunodeficiency virus (HIV) phenotype and interleukin-2/interleukin-10 ratio are associated markers of protection and progression in HIV infection*. Blood, 1996. **88**(2): p. 574-9.
387. Orsilles, M.A., et al., *IL-2 and IL-10 serum levels in HIV-1-infected patients with or without active antiretroviral therapy*. APMIS, 2006. **114**(1): p. 55-60.
388. Brady, M.T., et al., *Hepatitis C virus non-structural protein 4 suppresses Th1 responses by stimulating IL-10 production from monocytes*. Eur J Immunol, 2003. **33**(12): p. 3448-57.
389. Brooks, D.G., et al., *Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo*. Nat Med, 2006. **12**(11): p. 1301-9.
390. Brooks, D.G., et al., *IL-10 and PD-L1 operate through distinct pathways to suppress T-cell activity during persistent viral infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(51): p. 20428-33.
391. Kim, Y.J., S.J. Park, and H.E. Broxmeyer, *Phagocytosis, a potential mechanism for myeloid-derived suppressor cell regulation of CD8+ T cell function mediated through programmed cell death-1 and programmed cell death-1 ligand interaction*. J Immunol, 2011. **187**(5): p. 2291-301.
392. Wilson, E.B. and D.G. Brooks, *The role of IL-10 in regulating immunity to persistent viral infections*. Curr Top Microbiol Immunol, 2011. **350**: p. 39-65.
393. Accapezzato, D., et al., *Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection*. J Clin Invest, 2004. **113**(7): p. 963-72.

394. Thomas, D.A. and J. Massague, *TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance*. *Cancer Cell*, 2005. **8**(5): p. 369-80.
395. Trapani, J.A., *The dual adverse effects of TGF-beta secretion on tumor progression*. *Cancer Cell*, 2005. **8**(5): p. 349-50.
396. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. *J Exp Med*, 1998. **188**(2): p. 287-96.
397. Fontenot, J.D., et al., *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(11): p. 1142-51.
398. Borsellino, G., et al., *Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression*. *Blood*, 2007. **110**(4): p. 1225-32.
399. Kobie, J.J., et al., *T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine*. *J Immunol*, 2006. **177**(10): p. 6780-6.
400. Penalzoza-MacMaster, P., et al., *Interplay between regulatory T cells and PD-1 in modulating T cell exhaustion and viral control during chronic LCMV infection*. *J Exp Med*, 2014. **211**(9): p. 1905-18.
401. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. *Nature*, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
402. Collison, L.W., et al., *IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(12): p. 1093-101.
403. Eickhoff, S., et al., *Robust Anti-viral Immunity Requires Multiple Distinct T Cell-Dendritic Cell Interactions*. *Cell*, 2015. **162**(6): p. 1322-37.
404. Gajewski, T.F., H. Schreiber, and Y.X. Fu, *Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(10): p. 1014-22.
405. De Smedt, M., et al., *T-lymphoid differentiation potential measured in vitro is higher in CD34(+)/CD38(-/lo) hematopoietic stem cells from umbilical cord blood than from bone marrow and is an intrinsic property of the cells*. *Haematologica-the Hematology Journal*, 2011. **96**(5): p. 646-654.
406. Flynn, K.J., et al., *Virus-specific CD8+ T cells in primary and secondary influenza pneumonia*. *Immunity*, 1998. **8**(6): p. 683-91.
407. Manley, T.J., et al., *Immune evasion proteins of human cytomegalovirus do not prevent a diverse CD8+ cytotoxic T-cell response in natural infection*. *Blood*, 2004. **104**(4): p. 1075-82.
408. Sylwester, A.W., et al., *Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects*. *J Exp Med*, 2005. **202**(5): p. 673-85.
409. Migueles, S.A., et al., *CD8(+) T-cell Cytotoxic Capacity Associated with Human Immunodeficiency Virus-1 Control Can Be Mediated through Various Epitopes and Human Leukocyte Antigen Types*. *EBioMedicine*, 2015. **2**(1): p. 46-58.
410. McGoldrick, S.M., et al., *Cytomegalovirus-specific T cells are primed early after cord blood transplant but fail to control virus in vivo*. *Blood*, 2013. **121**(14): p. 2796-2803.
411. Lu, P.Y., et al., *Blimp-1 represses CD8 T cell expression of PD-1 using a feed-forward transcriptional circuit during acute viral infection*. *Journal of Experimental Medicine*, 2014. **211**(3): p. 515-527.
412. Merindol, N., 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*. *Journal of Immunology*, 2010. **185**(2): p. 856-866.
413. Merindol, N., et al., *Reconstitution of Protective Immune Responses against Cytomegalovirus and Varicella Zoster Virus Does Not Require Disease Development in*



- Pediatric Recipients of Umbilical Cord Blood Transplantation*. Journal of Immunology, 2012. **189**(10): p. 5016-5028.
414. Appay, V., et al., *Phenotype and Function of Human T Lymphocyte Subsets: Consensus and Issues*. Cytometry Part A, 2008. **73a**(11): p. 975-983.
415. Romero, P., et al., *Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8(+) T lymphocytes*. Journal of Immunology, 2007. **178**(7): p. 4112-4119.
416. Casazza, J.P., et al., *Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation*. J Exp Med, 2006. **203**(13): p. 2865-77.
417. Ortiz, A.M., et al., *Depletion of CD4(+) T cells abrogates post-peak decline of viremia in SIV-infected rhesus macaques*. Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**(11): p. 4433-4445.
418. Cho, J.H., et al., *T Cell Receptor-Dependent Regulation of Lipid Rafts Controls Naive CD8(+) T Cell Homeostasis*. Immunity, 2010. **32**(2): p. 214-226.
419. Crooks, G.M., K. Weinberg, and C. Mackall, *Immune reconstitution: from stem cells to lymphocytes*. Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**(1 Suppl 1): p. 42-6.
420. White, G.P., et al., *Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO- T cells*. J Immunol, 2002. **168**(6): p. 2820-7.
421. Crawford, A., et al., *Molecular and transcriptional basis of CD4(+) T cell dysfunction during chronic infection*. Immunity, 2014. **40**(2): p. 289-302.
422. Seder, R.A., P.A. Darrah, and M. Roederer, *T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 247-58.
423. Harari, A., et al., *Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy*. Blood, 2004. **103**(3): p. 966-972.
424. Younes, S.A., et al., *HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4(+) T cells endowed with proliferative capacity*. Journal of Experimental Medicine, 2003. **198**(12): p. 1909-1922.
425. Boulet, S., et al., *A dual color ELISPOT method for the simultaneous detection of IL-2 and IFN-gamma HIV-specific immune responses*. J Immunol Methods, 2007. **320**(1-2): p. 18-29.
426. Montesinos, P., et al., *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, 2009. **15**(6): p. 730-40.
427. Newell, E.W., et al., *Structural basis of specificity and cross-reactivity in T cell receptors specific for cytochrome c-I-E(k)*. J Immunol, 2011. **186**(10): p. 5823-32.
428. Reiser, J.B., et al., *CDR3 loop flexibility contributes to the degeneracy of TCR recognition*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 241-7.
429. Su, L.F., et al., *Virus-specific CD4(+) memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults*. Immunity, 2013. **38**(2): p. 373-83.
430. Jameson, S.C. and D. Masopust, *Diversity in T Cell Memory: An Embarrassment of Riches*. Immunity, 2009. **31**(6): p. 859-871.
431. Akue, A.D., J.Y. Lee, and S.C. Jameson, *Derivation and Maintenance of Virtual Memory CD8 T Cells*. Journal of Immunology, 2012. **188**(6): p. 2516-2523.
432. Haluszczak, C., et al., *The antigen-specific CD8(+) T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion*. Journal of Experimental Medicine, 2009. **206**(2): p. 435-448.
433. Hamilton, S.E. and S.C. Jameson, *The nature of the lymphopenic environment dictates protective function of homeostatic-memory CD8(+) T cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(47): p. 18484-18489.

434. Finke, J., et al., *Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial*. *Lancet Oncology*, 2009. **10**(9): p. 855-864.
435. Flynn, J.K. and P.R. Gorry, *Stem memory T cells (TSCM)-their role in cancer and HIV immunotherapies*. *Clin Transl Immunology*, 2014. **3**(7): p. e20.
436. Roberto, A., et al., *Role of naive-derived T memory stem cells in T-cell reconstitution following allogeneic transplantation*. *Blood*, 2015. **125**(18): p. 2855-64.
437. Rosenfeld, S., et al., *Antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia - Association between hematologic response and long-term outcome*. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 2003. **289**(9): p. 1130-1135.
438. Brunstein, C.G., et al., *Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease*. *Blood*, 2007. **110**(8): p. 3064-3070.
439. Admiraal, R., et al., *Association between anti-thymocyte globulin exposure and CD4(+) immune reconstitution in paediatric haemopoietic cell transplantation: a multicentre, retrospective pharmacodynamic cohort analysis*. *Lancet Haematology*, 2015. **2**(5): p. E194-E203.
440. Lindemans, C.A., et al., *Impact of thymoglobulin prior to pediatric unrelated umbilical cord blood transplantation on immune reconstitution and clinical outcome*. *Blood*, 2014. **123**(1): p. 126-132.
441. Lindemans, C.A., et al., *The Impact Of Thymoglobulin Prior To Pediatric Unrelated Umbilical Cord Blood Transplantation On Immune-Reconstitution and Clinical Outcome*. *Blood*, 2013. **122**(21).
442. Jacobson, M.A., et al., *Antigen-specific T cell responses induced by Towne cytomegalovirus (CMV) vaccine in CMV-seronegative vaccine recipients*. *Journal of Clinical Virology*, 2006. **35**(3): p. 332-337.
443. Erard, V., et al., *Long-term suppressive acyclovir (ACV) use reduces varicella zoster (VZV) diseases and emergence of ACV-resistant herpes simplex viruses (HSV) after stem cell transplantation (HCT)*. *International Journal of Infectious Diseases*, 2006. **10**: p. S29-S30.
444. Erard, V., et al., *Use of long-term suppressive acyclovir after hematopoietic stem-cell transplantation: Impact on herpes simplex virus (HSV) disease and drug-resistant HSV disease*. *Journal of Infectious Diseases*, 2007. **196**(2): p. 266-270.
445. Erard, V., et al., *One-year acyclovir prophylaxis for preventing varicella-zoster virus disease after hematopoietic cell transplantation: no evidence of rebound varicella-zoster virus disease after drug discontinuation*. *Blood*, 2007. **110**(8): p. 3071-7.
446. Tomblyn, M., et al., *Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Preface*. *Bone Marrow Transplant*, 2009. **44**(8): p. 453-5.
447. Griffiths, P.D., et al., *Cytomegalovirus glycoprotein-B vaccine with MF59 adjuvant in transplant recipients: a phase 2 randomised placebo-controlled trial*. *Lancet*, 2011. **377**(9773): p. 1256-1263.
448. Kharfan-Dabaja, M.A., et al., *A novel therapeutic cytomegalovirus DNA vaccine in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial*. *Lancet Infect Dis*, 2012. **12**(4): p. 290-9.
449. Pass, R.F., et al., *Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(12): p. 1191-9.
450. Pass, R.F., et al., *A subunit cytomegalovirus vaccine based on recombinant envelope glycoprotein B and a new adjuvant*. *J Infect Dis*, 1999. **180**(4): p. 970-5.

451. Baitsch, L., et al., *Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30852.
452. Odorizzi, P.M., et al., *Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8+ T cells*. J Exp Med, 2015. **212**(7): p. 1125-37.
453. Chew, G.M., et al., *TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection*. PLoS Pathog, 2016. **12**(1): p. e1005349.
454. Petrovas, C., et al., *PD-1 is a regulator of virus-specific CD8(+) T cell survival in HIV infection*. Journal of Experimental Medicine, 2006. **203**(10): p. 2281-2292.
455. Sester, U., et al., *PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus- specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy*. Am J Transplant, 2008. **8**(7): p. 1486-97.
456. Gallez-Hawkins, G.M., 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): p. 872-80.
457. Merindol, N., et al., *CD8(+) T-cell reconstitution in recipients of umbilical cord blood transplantation and characteristics associated with leukemic relapse*. Blood, 2011. **118**(16): p. 4480-4488.
458. Schadendorf, D., et al., *Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma*. J Clin Oncol, 2015. **33**(17): p. 1889-94.
459. Schadendorf, D., et al., *Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in metastatic or locally advanced, unresectable melanoma*. European Journal of Cancer, 2013. **49**: p. S11-S11.
460. Robert, C., et al., *Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma*. New England Journal of Medicine, 2015. **372**(26): p. 2521-2532.
461. Postow, M.A., et al., *Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma*. New England Journal of Medicine, 2015. **372**(21): p. 2006-2017.
462. Utzschneider, D.T., et al., *T cells maintain an exhausted phenotype after antigen withdrawal and population reexpansion*. Nat Immunol, 2013. **14**(6): p. 603-10.
463. Speiser, D.E., et al., *T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion?* Nat Rev Immunol, 2014. **14**(11): p. 768-74.
464. Kasproicz, V., et al., *High level of PD-1 expression on hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ and CD4+ T cells during acute HCV infection, irrespective of clinical outcome*. J Virol, 2008. **82**(6): p. 3154-60.