

Université de Montréal

**Les chambres de leucoréduction sont une nouvelle source
de cellules pour la génération de lignées de lymphocytes T
en immunothérapie**

par Gabrielle Boudreau

Programme de pharmacologie et physiologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en pharmacologie option générale

Octobre 2018

© Gabrielle Boudreau, 2018

Résumé

La réactivation de virus latents est une cause importante de morbidité et mortalité chez les patients immunocompromis. Le transfert adoptif de lymphocytes T pathogène spécifiques est une stratégie prometteuse pour le traitement de ces complications. Un problème important dans le développement de nouveaux protocoles de thérapie cellulaire est la source limitée de cellules. Afin de pallier cette limitation, nous avons évalué, en collaboration avec Héma-Québec, le potentiel des PBMC provenant de chambres de leucoréduction (LRSC) pour générer des lignées de lymphocytes T pour la thérapie cellulaire. Les LRSC sont habituellement utilisées par les agences de sang pour « leucodépléter » les dons de plaquettes et celles-ci sont ensuite considérées comme des déchets. Pour évaluer leur potentiel, nous avons comparé des PBMC contenus dans des LRSC ou le sang périphérique provenant d'un même donneur sain, prélevé au même moment. Les PBMC provenant des LRSC contiennent les mêmes proportions des principales populations mononucléaires que ceux contenus dans le sang périphérique pour chacun des donneurs. Toutefois, les LRSC semblent induire le clivage du marqueur de différenciation CD62L, dont l'expression est rétablie après leur culture. Suite à une stimulation polyclonale, les PBMC des LRSC et ceux du sang périphérique ont une expansion, une différenciation et démontrent un potentiel de polyfonctionnalité similaires. La prolifération, le phénotype et la réactivité des lignées virus spécifiques générées à partir d'un répertoire mémoire étaient similaires selon qu'elles proviennent des LRSC ou du sang périphérique. À partir des LRSC, nous avons généré des lignées pathogène spécifiques fonctionnelles à partir d'un répertoire naïf. Finalement, l'ensemble des résultats démontrent que les LRSC sont une nouvelle source de PBMC de qualité. Le repositionnement des LRSC permettrait de valoriser un déchet.

La quantité de cellules contenue par les LRSC et la possibilité d'utiliser une série de donneurs de plaquettes réguliers pourraient permettre la création d'une banque de lymphocytes T pathogènes spécifiques pour usage immédiat en immunothérapie adoptive.

Mots-clés : Immunothérapie adoptive, LRSC, réactivation virale, thérapie cellulaire, répertoire naïf, répertoire mémoire

Abstract

Opportunistic reactivation of latent viruses are a significant cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients. The transfer of *ex vivo* expanded pathogen T-cell lines is an attractive safe and effective strategy to treat virus related complications. The source of T cells can be either from peripheral blood or leukapheresis products of healthy donors. We evaluated the potential of PBMC from leukoreduction system chambers (LRSC) to generate therapeutic T cell products. Blood agencies usually discard LRSC that are used to leukodeplete plateletpheresis blood products which may be used as a source of T cells for manufacturing clinical scale T-cell products. The LRSCs reflect the composition of the peripheral blood except for a transient downregulation of CD62L expression in freshly extracted PBMCs from LRSCs. Non-specific stimulation revealed that LRSC or blood T cells were equivalent in terms of expansion, differentiation and function. Pathogen-specific T-cell lines from memory repertoires harvested from LRSCs and peripheral blood have equivalent proliferation, phenotype and reactivity. Moreover, PBMCs from LRSC can be used to prime and expand virus-specific T cells from seronegative donors. The large number of cells contained in LRSC and the possibility to use serial LRSC from regular platelet donors allows to create a T-cell bank ready to use.

Keywords : Adoptive immunotherapy, LRSC, viral reactivation, cell therapy, naïve repertoire, memory repertoire

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	x
Introduction.....	1
1. Système immunitaire.....	2
1.1 Système inné.....	2
1.1.1 Cellules présentatrices d'antigènes.....	3
1.1.2 Complexe majeur d'histocompatibilité.....	3
1.1.3 CPA professionnel : cellule dendritique.....	5
1.2 Système adaptatif.....	5
1.2.1 Lymphocytes T.....	6
1.2.2 Lymphocytes T CD4.....	6
1.2.3 Lymphocytes T CD8.....	6
1.2.4 Développement et maturation des lymphocytes T.....	7
1.2.5 Réponse lymphocytaire T.....	7
1.2.6 Hétérogénéité lymphocytes T.....	9
1.2.7 Activation des lymphocytes T naïfs vs mémoires.....	10
1.2.8 Épuisement des lymphocytes T.....	11
1.2.9 Modèles de différenciation des CD4 mémoires.....	13
1.2.10 Modèles de différenciation des CD8 mémoires.....	15
1. Cytomégalovirus.....	17
2.1 Réplication virale.....	18
2.2 Primo-infection et dissémination.....	19
2.3 Évasion immune.....	19
2.4 Réactivation.....	20

2.4.1 Infection chez les hôtes immunocompromis.....	21
2.4.2 Traitement des hôtes immunocompromis.....	22
3. Immunothérapie adoptive antivirale.....	23
4. Chambre de leucoréduction.....	24
5. Hypothèse et objectifs.....	24
5.1 Hypothèse.....	24
5.2 Objectifs.....	25
Résultats.....	26
6. Résultats.....	27
6.1 Leukoreduction system chambers are a reliable cellular source for manufacturing of T-cell therapeutics.....	27
Discussion et Conclusion.....	62
7. Discussion et conclusions.....	63
7.1 Défi en immunothérapie adoptive antivirale.....	64
7.2 Création d'une banque tierce partie.....	66
7.3 Génération de lignées à partir d'un répertoire naïf.....	66
7.3.1 Choix du virus.....	67
7.3.2 Activation d'un répertoire naïf.....	67
7.3.3 Enrichissement des lymphocytes T pathogène spécifiques.....	68
7.3.4 Technique alternative d'enrichissement.....	69
7.3.5 Différenciation et épuisement des lignées de lymphocytes T.....	70
7.3.6 Amélioration.....	70
7.4 Conclusion et perspectives.....	72
Bibliographie.....	74

Liste des tableaux

Tableau I. Résumé des cytokines influençant la différenciation des lymphocytes Th 14

Liste des figures

<i>Figure 1.</i> Différenciation des lymphocytes T <i>adapté de Gattinoni L et al., 2012</i>	10
--	----

Liste des abréviations

Ag. : Antigène

ATCH. : Transplantation de cellules hématopoïétiques allogénique

ARNm. : ARN messenger

CAR. : Récepteur antigénique chimérique

CD. : Cellule dendritique

CMH. : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMHI. : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

CMHII. : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CMV. : Cytomégalovirus

CPA. : Cellule présentatrice d'antigène

D₂O. : Eau lourde

HLA. : Antigène des leucocytes humains

NK. : « Naturel Killer »

moDC. : Cellule dendritique dérivées des monocytes

TCR. : Récepteur des lymphocytes T

TLR. : «Toll-like receptors»

Tcm. : lymphocyte T centrale mémoire

Te : lymphocyte T effecteur

Tem. : lymphocyte T effecteur mémoire

Temra. : lymphocyte T effecteur RA

Tn. : lymphocyte T naïf

Tm. : lymphocyte T mémoire

TOS. : Transplantation d'organe solide

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Jean-Sébastien Delisle, mon directeur de recherche, de créer un environnement qui pousse le dépassement de soi et permet d'approfondir nos connaissances tout en étant sain et valorisant. Je tiens également à te remercier pour tes précieux conseils, ton écoute, ta patience et ton soutien. Je voudrais également remercier l'ensemble des membres du laboratoire. Finalement, j'aimerais remercier le Dr Christian Beauséjour et le Dr Michel Duval pour leur temps consacré à la correction de mon mémoire.

Introduction

1. Système immunitaire

Le système immunitaire constitue l'ensemble des mécanismes de défense du corps humain contre les innombrables pathogènes. Pour accomplir cette tâche, l'organisme a intégré au cours de l'évolution une organisation cellulaire et moléculaire complexe. Il existe deux branches complémentaires qui coexistent en synergie : le système inné et adaptatif. Le système inné est initié par la détection de signaux de danger non-spécifiques tandis que le système adaptatif répond de façon spécifique au non soi. L'état actuel des connaissances nous indique cependant que le système immunitaire est bien plus complexe, mais l'objectif de cette introduction est de revoir les concepts qui sous-tendent les travaux présentés dans ce mémoire.

1.1 Système inné

Le système inné est la première ligne de défense de l'organisme et confère une résistance non-spécifique à la présence d'un pathogène. En plus des barrières muco-cutanées, le système inné est composé des cellules dendritiques (CD), des granulocytes, des macrophages, des « naturel killer » (NK) et des lymphocytes- $\gamma\delta$, pouvant reconnaître et détruire les cellules présentant les motifs moléculaires de danger. ¹ Elles peuvent également propager la réponse immunitaire et participer à la réparation et au remodelage des tissus après l'élimination du danger. Les cellules innées sont activées lors de la liaison de leurs récepteurs non-polymorphiques «Toll-like receptors» (TLR) ou «Pattern recognition receptors» à une structure moléculaire associée aux microbes ou à un signal de stress cellulaire. ² Ceci entraîne l'opsonisation des cellules infectées, les fonctions phagocytaire et microbicide, l'activation des voies du complément et la sécrétion de molécules pro-apoptotiques et de cytokines. ^{3,4}

1.1.1 Cellules présentatrices d'antigènes

Les monocytes, les macrophages et les CD sont des cellules présentatrice d'antigènes (CPA) et sont les messagers entre le système immunitaire inné et adaptatif, car elles initient la réponse adaptative. ⁴ Les CPA ingèrent les pathogènes par phagocytose au site d'infection, apprêtent les protéines du pathogène en peptides, puis migrent dans les ganglions lymphatiques pour présenter l'antigène (Ag) aux lymphocytes T. ⁵ Elles expriment également un ensemble de molécules de costimulations requis pour l'activation optimale des lymphocytes T. ⁶ Un Ag est un déterminant moléculaire provenant d'une protéine qui est reconnu par les cellules du système immunitaire adaptatif lorsqu'il est associé aux complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH), de classe I ou II. ⁷ En lien avec les travaux présentés dans ce mémoire, les différents types de CPA (monocyte, macrophage et CD) sont une composante essentielle des protocoles visant la stimulation des lymphocytes T dans des contextes de thérapie cellulaire, particulièrement lorsque le répertoire est naïf.

1.1.2 Complexe majeur d'histocompatibilité

Le CMH, des glycoprotéines transmembranaires, fait le lien entre le système immunitaire inné et adaptatif. Ces molécules exprimées à la surface d'une CPA permettent de présenter un peptide antigénique aux lymphocytes T. ⁷ Toutes les cellules nucléées expriment le CMH de classe I (CMHI), dont la densité d'expression (jusqu'à 10^5 molécules par cellules) varie selon le type cellulaire. Les CMHI présentent les peptides provenant du cytosol. La présentation de peptides du soi indique que la cellule est saine tandis que la présentation d'un antigène viral montre que la cellule est infectée. Les lymphocytes T CD8 pourront ainsi être activés. L'expression du CMH de classe II (CMHII) est limitée à l'état basal aux CPA. Leur activation augmente la densité d'expression du CMHII à leur surface. Le CMHII présente typiquement des peptides issus de la

digestion protéique exogène récemment phagocytosée ce qui renseigne sur une infection en cours et active les lymphocytes T CD4.

Le CMH est un ensemble complexe de gènes fondamentaux de la réponse immunologique, appelé complexe antigène des leucocytes humains (HLA), localisé sur le bras court du chromosome 6.⁸ Les gènes HLA classiques codent pour des hétérodimères qui assurent la fonction de présentation antigénique et l'histocompatibilité tandis que les gènes non-classiques présentent une structure similaire, plus ou moins polymorphes, sont impliqués dans certaines étapes de la réponse immunitaire. Chaque individu possède de 6 gènes du CMHI et 5 gènes du CMHII.

Le CMHI inclut les gènes classiques HLA-A, B et C dont la fonction est de présenter des antigènes aux lymphocyte T CD8. Ces régions hautement polymorphiques sont des chaînes alphas formant une poche de liaison pour des peptides de neuf acides aminés.^{9,10} L'expression codominante de ces gènes et leurs polymorphismes permettent de générer un nombre maximal de poches peptidiques afin de pouvoir présenter la multitude d'antigènes. Le CMHI inclut également les molécules non-classiques HLA-E, F et G, ayant des caractéristiques polymorphiques limitées. L'expression de ces molécules est limitée à certains types de cellules, elles jouent un rôle dans la discrimination du soi et non soi et présentent des molécules non-polymorphiques.

Le CMHII inclut les molécules classiques HLA-DP, DQ et DR. Ces régions codent pour deux chaînes (alpha et beta), formant un site de liaison pour des peptides de 13 à 26 acides aminés. HLA-DR fait partie des molécules les plus polymorphiques du CMH. Le CMHII inclut

également les molécules non-classiques HLA-DM et HLA-DO. Le HLA-DM facilite le chargement des antigènes sur le CMHII tandis que les HLA-DO permettent de réguler l'apprêtement des antigènes.

1.1.3 CPA professionnel : cellule dendritique

Les CD sont des CPA professionnelles, car elles augmentent la surface de contact avec les lymphocytes T grâce à leurs dendrites ayant la capacité de s'étendre et se rétracter. Elles régulent la réponse lymphocytaire T autant à l'état basal que durant une infection. Les CD immatures agissent comme sentinelles dans les tissus périphériques et ingèrent l'Ag soit par phagocytose, par endocytose ou bien par pinocytose.⁵ Lorsqu'un antigène est ingéré, les CD vont maturer afin d'être spécialisées dans la présentation antigénique, puis migrer vers les ganglions.¹¹ Leurs caractéristiques exceptionnelles de présentation d'antigène en font un outil de choix dans le contexte de stimulation ex vivo de lymphocytes T naïfs.

1.2 Système adaptatif

Contrairement à l'immunité innée, le système adaptatif permet le développement d'une réponse spécialisée contre les pathogènes. Les lymphocytes B et T, possédant la capacité de générer une mémoire immunologique, reconnaissent les antigènes présentés par les CPA grâce à des récepteurs spécialisés.¹² Les lymphocytes B jouent un rôle clé dans l'immunité à médiation humorale, caractérisé par la sécrétion d'anticorps une fois qu'ils sont activés et différenciés en plasmocyte, ce qui facilite la phagocytose ou la lyse des cellules infectées par les effecteurs du système inné.

1.2.1 Lymphocytes T

Les lymphocytes T conventionnels sont divisés en deux catégories : les CD4, aussi appelés auxiliaires, et les CD8, aussi appelés cytotoxiques.

1.2.2 Lymphocytes T CD4

Les CD4 sont les coordinateurs de la réponse immunitaire. Ils activent directement et indirectement les CD8 par des signaux transmis au CPA via des cytokines et des récepteurs membranaires.¹³⁻²² Ils produisent des molécules aidant les lymphocytes B et ils participent à l'activation des macrophages.²³⁻²⁵

1.2.3 Lymphocytes T CD8

Les CD8 induisent la réponse cytotoxique restreinte par le CMH. Cette réponse s'élabore via trois mécanismes, la sécrétion de perforine et de granzyme, l'expression de FasL, c'est-à-dire le ligand du récepteur de mort Fas et les cytokines.²⁶⁻³¹

L'engagement du récepteur des lymphocytes T (TCR) induit l'exocytose polarisée de granules cytotoxiques préformés. La perforine est une protéine qui induit des pores dans la membrane plasmique provoquant la lyse de la cellule cible. Les granzymes sont des protéases à sérine qui pénètrent par les pores et induire l'apoptose de la cellule cible. L'engagement du TCR induit également l'expression de FasL et via un processus va déclencher l'apoptose par des voies dépendantes des caspases. L'IFN γ et le TNF α sont respectivement impliquées dans le contrôle des infections aux organismes intra-cellulaires et mycobactériennes. Les deux cytokines peuvent entre autres induire l'apoptose des cellules cibles.^{32,33}

1.2.4 Développement et maturation des lymphocytes T

Avant d'être fonctionnel les lymphocytes T doivent subir différentes étapes de maturations dans le thymus. D'abord, ils génèrent un TCR unique par recombinaison génétique. Ensuite, des étapes de sélection permettent de sélectionner des thymocytes ayant un TCR fonctionnel et non susceptibles d'induire des phénomènes d'auto-immunité en périphérie. Ils font l'acquisition de l'expression des corécepteur CD4 ou CD8.^{4,34} Une fois l'ensemble de ces processus terminés, les lymphocytes T à l'état naïf se retrouvent en périphérie où ils circulent continuellement du sang périphérique vers les ganglions lymphatiques jusqu'à ce qu'ils reconnaissent l'antigène présenté par les CPA.

1.2.5 Réponse lymphocytaire T

La réponse adaptative est composée de cinq phases : la reconnaissance, l'activation, l'élimination, la contraction et la mémoire.⁴ La première phase consiste en la reconnaissance, par le TCR exprimé à la surface du lymphocyte T, du peptide antigénique lui-même présenté par une molécule du CMH exprimée à la surface de la CPA. Étant donné que l'activation des lymphocyte T conduit à la destruction des cellules reconnues, leur activation est finement contrôlée. Ceci les empêche de répondre contre des cellules du soi, ce qui initierait une maladie auto-immune. En plus des mécanismes de tolérance centrale qui s'établissent durant la maturation des lymphocytes T dans le thymus, d'autres mécanismes permettent de prévenir l'activation des lymphocytes T. Notamment, l'engagement du TCR avec le complexe CMH-Ag doit être accompagné de deux autres signaux, afin que les lymphocytes T soient activés de façon optimale.^{6,35-51}

Le second consiste en un signal de costimulation. Lors d'une infection, les différents signaux provenant des cellules innées vont induire l'expression de molécules de costimulation (CD80, CD83, CD86 etc.) à la surface des CPA. Ces molécules sont reconnues par des récepteurs (CTLA4, CD28, etc.) exprimés par les lymphocytes T en cours d'activation.⁶ Or, l'activation de ces récepteurs renforce les voies induites par le signal provenant du TCR, ce qui consolide l'activation, soutient l'expression des molécules effectrices et accélère l'entrée en phase de prolifération.

Le troisième signal est médié par les cytokines dans le milieu extracellulaire. Elles aussi soutiennent l'activation des lymphocytes T, mais jouent également un rôle majeur dans la différenciation des différentes sous-populations (décrites plus bas). Suite à une stimulation du TCR dans un contexte favorable, l'activation du lymphocytes T est mise en branle et un ensemble de cascades transcriptionnelles engage sa prolifération.³⁷ Une prolifération exponentielle doit être mise en place afin de générer une réponse immunitaire efficace. L'absence d'un des trois signaux va mener à une activation incomplète ou même à l'anergie (état de non réponse permanent) des lymphocytes T.³⁸

Suite à l'élimination du pathogène par les lymphocytes T effecteurs (Te), il y a une phase de contraction durant laquelle la majorité d'entre eux sont engagés dans une voie apoptotique intrinsèque (voie mitochondriale) ou extrinsèque (Fas/FasL). Celle-ci est essentielle afin de maintenir l'homéostasie du système immunitaire. Seulement 5% survivent et se différencient en lymphocytes T mémoires (Tm) présents dans les organes lymphoïdes secondaires, conférant une protection à long terme pour l'organisme. Ils seront capables de réinitier une réponse

immunitaire protectrice immédiate et robuste suite à une seconde exposition à l'Ag.^{52,53} Les signaux de costimulation et les cytokines nécessaires pour l'activation des lymphocytes T naïfs (Tn) sont optionnels pour celle des Tm (décrits à la section 1.2.7).

1.2.6 Hétérogénéité lymphocytes T

Le profil phénotypique des sous-populations de lymphocyte T CD8 aussi bien que CD4 est déterminé selon la localisation, l'expression de marqueurs de surface et leurs fonctions effectrices (Figure 1).⁵⁴

La protéine CD45, un marqueur d'activation qui est exprimé sous différentes isoformes permet d'identifier les sous-populations de lymphocytes T CD4 et CD8.^{55,56} L'isoforme CD45RA est exprimée par les lymphocytes T naïfs (Tn). Après leur activation, les lymphocytes T centraux mémoire (Tcm) et effecteurs mémoire (Tem) perdent l'expression du CD45RA et acquièrent l'expression du CD45RO.^{55,56} Les lymphocytes T effecteurs terminaux (Temra) réexpriment les CD45RA mais pas les autres marqueurs des cellules naïves.^{55,56} Les Tn et Tcm, expriment le récepteur de chimiokines CCR7 et la molécule d'adhésion CD62L.^{55,56} Ces deux molécules permettent la migration dans les organes lymphoïdes secondaires tandis que l'absence de ces récepteurs permet aux Tem de migrer vers les tissus inflammés.⁵⁴ Les fonctions effectrices immédiates augmentent graduellement entre les Tn, Tcm, Tem et Temra, tandis que le potentiel de survie à long terme diminue graduellement.⁵⁷ La fonctionnalité de ces cellules est évaluée selon leur capacité à produire différentes cytokines parmi lesquelles l'IL2, IFN γ , TNF α mais aussi différentes molécules effectrices (la perforine et le granzyme) et leur capacité de dégranulation (CD107a).⁵⁷

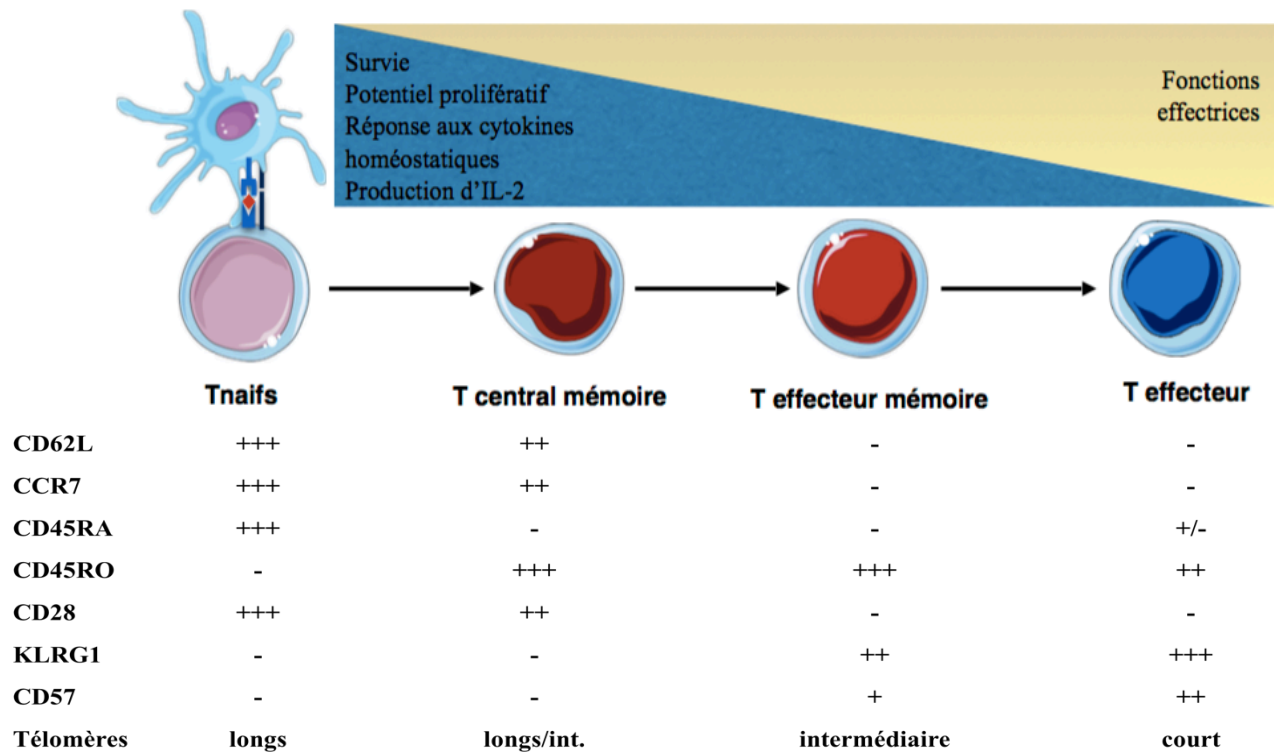


Figure 1. Différenciation des lymphocytes T adaptée de Gattinoni L et al., 2012

1.2.7 Activation des lymphocytes T naïfs vs mémoires

Les lymphocytes T mémoires (Tm) ont la capacité à répondre plus rapidement et efficacement que les lymphocytes T naïfs contre les agents infectieux.⁵⁸ Outre leur phénotype différent, le réservoir de Tm est bien plus important que celui des Tn spécifiques pour un même antigène.⁵⁹ Les Tm expriment un différent niveau d'intégrines et d'état de glycosylation.^{56,60-63} Ces modifications post-traductionnelles sont essentielles au recrutement des Tm au site d'infection. Le tout augmente leurs propriétés migratoires et d'interaction avec les CPA lors d'une restimulation.^{56,60-63} D'ailleurs, les Tm sont moins dépendants des signaux de costimulation et n'ont pas besoin d'interagir aussi longtemps avec la CPA pour être activés de façon optimale comparativement aux lymphocytes T naïfs.⁶⁴⁻⁶⁸ Les Tm expriment divers récepteurs de

cytokines (entre autres IL-2), dont il a été démontré que l'activation de leurs voies métaboliques avant ou pendant la stimulation antigénique permet d'augmenter leur activité cytolytique et leur capacité à produire des cytokines, mais aussi de proliférer plus rapidement que les Tn.^{65,66,68-72}

Par ailleurs, il a été démontré que suite à leur activation, les lymphocytes T naïfs subissent une restructuration profonde de l'état d'accessibilité de la chromatine qui persiste au cours du temps.

⁷³ Parmi les gènes dont la chromatine est permissive, on retrouve ceux associés aux fonctions effectrices, ce qui a pour conséquence leur expression rapide suite à une seconde stimulation antigénique. Ainsi, l'expression d'ARNm et de protéine est bien plus importante dans les lymphocytes T mémoires par rapport aux lymphocytes T naïfs suggérant que ces derniers sont en phase de quiescence G0 tandis que les Tm sont en phase G1.⁷³

1.2.8 Épuisement des lymphocytes T

La collaboration entre les deux modèles du système immunitaire permet une réponse forte, rapide et efficace contre de très nombreux dangers infectieux. Cependant, certains pathogènes ont développé des mécanismes d'échappement du système immunitaire pour persister à long terme chez l'hôte. La persistance de l'antigène et de l'inflammation associée à l'infection rend les lymphocytes T dysfonctionnels.⁷⁴⁻⁸¹ Ils commencent alors à exprimer différents récepteurs inhibiteurs de leur activation (dont PD-1, LAG3, TIM3), ce qui les empêche de proliférer en plus d'inhiber leurs fonctions effectrices. Leur importance dans l'épuisement des lymphocytes T a été mise évidence lorsque des anticorps bloquants ont restauré la fonctionnalité et la capacité proliférative des lymphocytes T. Ceci a permis un meilleur contrôle de la charge virale et une diminution de la croissance tumorale.⁷⁴⁻⁸¹

Le récepteur PD-1 peut interagir avec deux ligands : le premier, PD-L1, exprimé constitutivement à la surface de nombreuses cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques et, le second, PD-L2, principalement exprimé par les CPA. Les signaux inflammatoires augmentent l'expression des deux ligands.^{82,83}

L'activation des CD8 naïfs conduit à la déméthylation du promoteur de PD-1, ce qui induit la décondensation de l'ADN permettant ainsi l'expression du gène.⁸⁴ L'expression précoce de PD-1 est nécessaire pour l'activation des lymphocytes T, agissant en stabilisant la synapse immunologique. Il a aussi été démontré que PD-1 agit comme un inhibiteur de la réponse lymphocytaire T en atténuant l'activation des voies du TCR et de la costimulation notamment, ce qui conduit à une régulation négative du métabolisme. C'est pourquoi son expression est transitoire, fortement induite à un stade précoce de la réponse lymphocytaire T, puis rapidement réprimé. Cette répression d'expression est notamment rendue possible par la DNA méthyletransférase 3a qui permet de reméthyler le promoteur de PD-1 réprimant l'expression de PD-1.⁸⁵ Lorsqu'une infection chronique ou lorsqu'un cancer se développe, la persistance de l'antigène empêche la méthylation *de novo* de se produire.⁸⁶ Cette expression persistante de PD-1 contribue fortement à l'épuisement des lymphocytes T puisqu'il dérégule leurs métabolismes.^{78,87-89} En effet, la liaison de PD-1 avec l'un de ses ligands induit sa phosphorylation, ce qui inhibe l'activité des molécules d'activation proximales du TCR et des molécules de la voie costimulation.⁹⁰⁻⁹² La voie PD-1/PD-L1 permet d'induire l'expression de gènes connus pour inhiber l'activation des cellules T.⁹³ Cette voie de signalisation réprime l'expression de facteurs de transcription importants pour le changement métabolique qui s'opère au stade effecteur.^{89,94}

La protéine LAG3 a une structure similaire à la molécule CD4. Elle a une meilleure affinité que

CD4 pour lier le CMHII. En ce liant au CMHII à la place du CD4, cette protéine diminue l'activation des lymphocytes T. ^{95,96} En effet, l'injection d'anticorps bloquant la LAG3 en combinaison avec des anticorps bloquant de PD-1 améliore considérablement la prolifération et la fonction des lymphocytes T CD8 épuisés. ^{97,98} Toutefois, bloquer seulement la LAG3 a peu d'effets sur l'épuisement des CD8

La protéine TIM3 est exprimée par les CD8 produisant de l'IFN γ et des CD4 Th1. ⁹⁹ Sa coexpression avec celle de PD-1 permet d'identifier les lymphocytes T fortement épuisés. L'usage d'anticorps bloquants ce récepteur seuls ou en combinaison avec le blocage de PD-1 permet de restaurer partiellement la prolifération et la fonctionnalité des lymphocytes T. ¹⁰⁰

1.2.9 Modèles de différenciation des CD4 mémoires

Il existe une hétérogénéité énorme au sein des lymphocytes T CD4, dont les quatre principales sous-populations sont les Th1, Th2, Th17 et Treg. Selon le type de pathogènes qui infecte l'hôte, les cellules innées vont produire différents types de cytokines. Or, c'est précisément le type et la quantité relative des cytokines et autres signaux qui dictent la différenciation des lymphocytes T CD4. Ce mécanisme est essentiel, car chacune des sous-populations de lymphocytes T est spécialisée dans l'élimination d'un type de pathogène. Les Th1 sont spécialisés dans l'élimination de pathogènes intracellulaires (salmonelles, mycobactéries et virus), les Th2 dans l'élimination des pathogènes extracellulaires, tandis que les Th17 sont impliqués dans la réponse contre des parasites extracellulaires de grande taille (nématodes) et les infections fongiques. Les programmes transcriptionnels qui supportent l'une ou l'autre des différenciations sont des molécules antagonistes (Tableau I). Les nombreuses boucles de rétroactions permettent un changement de différenciation selon l'environnement.

La régulation de la différenciation Th1 sera détaillée, puisqu'ils sont impliqués dans la réponse antivirale, sujet principal de ce mémoire. La différenciation Th1 est dépendante du facteur de transcription T-bet, qui est induit par IL-2. T-bet réprime directement GATA-3, un facteur de transcription exprimé à des niveaux basaux dans les T naïfs. GATA-3 dirige la différenciation Th2 qui est antagoniste à celle Th1.¹⁰¹ Suite à une stimulation par IL-4, l'expression de GATA-3 est augmentée, ce qui réprime la transcription de STAT4, un facteur de signalisation de l'IL-2 et du même coup T-bet tandis que les antagonismes ROR γ t et FoxP3 sont responsables de la différenciation Th17 et Treg.¹⁰²⁻¹⁰⁶

Les CPA produisent IL-12 qui stimule STAT4, induisant IFN γ , IL-12R et T-bet chez les lymphocytes T. IFN γ augmente via STAT1 la transcription de T-bet et celui-ci augmente la production IFN γ . Ainsi, la sensibilité s'accroît progressivement à IL-12 et IFN γ . La différenciation en Th1 sera complétée si les signaux vers d'autres différenciation Th sont plus faibles que ceux pour Th1.¹⁰²⁻¹⁰⁶

Tableau I. Résumé des cytokines influençant la différenciation des lymphocytes Th

	Signaux initiateurs principaux	Signaux propagateurs principaux	Facteur de transcription principal	Cytokine(s) produite (s) De façon exclusive
Th1	IL-12, IFN- γ , Signal TCR fort	IL-12, IFN- γ , IL-18	T-bet	IFN- γ
Th2	IL-4, IL-2, Signal TCR faible	IL-33, IL-7, TSLP, IL-4	GATA-3	IL-4, IL-5, IL-13
TReg	IL-2, TGF- β (haute concentration)		FoxP3	TGF- β
Th17	IL-6, TGF- β (faible concentration), IL-21	IL-1, IL-23, IL-21	ROR γ t	IL-17A, IL-17F, IL-22

1.2.10 Modèles de différenciation des CD8 mémoires

Il existe cinq modèles pour expliquer la génération de T_m. Dans le modèle des précurseurs distincts, chaque lymphocyte T naïf est préprogrammé dans le thymus lors de la maturation des thymocytes pour soit mourir lors de la phase de contraction, soit survivre et se différencier en lymphocyte T mémoire. Ce modèle a été contredit par le groupe de Busch. Le transfert adoptif d'un seul T_n peut générer des lymphocytes T effecteurs et mémoires.¹⁰⁷ Le groupe de Schumacher a supporté ces résultats grâce au suivi des T_n avec un code barre.¹⁰⁸ Il est donc peu probable que ce modèle soit véridique.

Le modèle du potentiel décroissant implique que les expositions répétées aux signaux antigéniques et à l'inflammation induiraient la différenciation terminale des lymphocytes T et ils perdraient leur capacité à proliférer et à survivre. Dans plusieurs études, la présence de l'antigène ou l'inflammation a été diminuée précocement, ce qui a permis d'accélérer la génération de lymphocyte T mémoires.^{51,109-111}

Le modèle de la force du signal est très similaire, cependant, l'état de différenciation dépendrait de la force totale des trois signaux d'activation initiale. Une signalisation précoce très forte favoriserait une différenciation effectrice.¹¹²

Le modèle de la division asymétrique intègre le modèle de la force du signal. Il suggère que lors de la division cellulaire, la cellule fille à proximité d'une CPA reçoit fortement les trois signaux d'activation, favorisant la différenciation terminale tandis que la cellule fille distale recevrait des signaux d'activation plus faibles, induisant une différenciation mémoire. Ce modèle est

supporté par plusieurs études qui démontrent que les lymphocytes T se divisent lors de l'interaction avec la CPA. De plus, la cellule fille proximale hérite préférentiellement de molécules associées au phénotype terminal et plus faiblement des molécules associées au phénotype mémoire par rapport à la cellule distale. ¹¹³⁻¹¹⁶

En 2017, le groupe d'Ahmed a publié deux études mettant en évidence un nouveau modèle de dédifférenciation. ^{117,118} En analysant les modifications épigénétiques durant les différents stades de la réponse CD8, il a démontré que l'enzyme DNA méthyltransférase 3 alpha (Dnmt3a) est responsable de méthyler les promoteurs de gènes fortement exprimés dans les Tn (CD62L, CCR7, etc.) suite à leur activation. ¹¹⁷ À l'inverse, les promoteurs de gènes associés aux fonctions effectrices sont déméthylés et exprimés rapidement dans les lymphocytes T effecteurs. Toutefois, lors de la transition d'effecteur en lymphocyte T mémoire, les méthylations sont perdues, permettant une réexpression rapide des gènes exprimés par les Tn et Tm lors d'une seconde stimulation antigénique, ce qui suggère que les Tm sont issus d'une sous-population de lymphocytes T effecteurs.

La seconde étude portait sur la génération des Tm suite à la vaccination d'humain avec le virus atténué de la fièvre jaune en combinaison avec la prise d'eau lourde (D2O). ¹¹⁸ Les différentes cinétiques (biphasique et monophasique) observées selon l'administration de D2O démontrent que les lymphocytes T effecteurs et mémoires proviennent de cellules ayant proliféré rapidement et qu'ensuite, les lymphocytes T entrent dans une phase de quiescence au stade mémoire. Deux ans après la vaccination, la majorité des Tm virus-spécifique proviennent des cellules ayant proliféré rapidement lors des deux premières semaines en réponse au vaccin.

L'étude des régions décondensées de la chromatine par ATAC-seq ainsi que l'analyse quantitative du transcriptome total de lymphocytes T CD8 par RNA-seq réalisées sur les lymphocytes T naïfs, effecteurs et mémoires virus-spécifique suggèrent les T_m proviennent d'une sous-population de lymphocyte T effecteurs suite à l'élimination du pathogènes. Cette sous-population a une expression diminuée des molécules effectrices et réexprime les molécules exprimées par les T_n (Bcl-2, IL-7R, CCR7). Ces deux études suggèrent que les T_m proviennent donc d'une sous-population de lymphocytes T effecteurs qui se sont dédifférenciés.

Toujours en accord avec ce dernier modèle, il a été démontré que le facteur de transcription Runx3 est important pour la génération de T_m.¹¹⁹ Plus précisément, les auteurs de cette récente étude démontrent que Runx3 est essentiel, dès la stimulation antigénique, pour induire des changements épigénétiques favorisant l'expression de gènes importants pour la génération de T_m. En accord avec cela, les auteurs démontrent que la délétion de Runx3 diminue la génération de lymphocytes T mémoires tandis qu'à l'inverse, la surexpression de ce facteur de transcription améliore la génération de T_m et empêche la différenciation terminale.¹¹⁹ Ainsi, la nécessité de ce facteur de transcription à des temps très précoces pour la génération de lymphocytes T mémoires est en faveur d'un modèle de dédifférenciation.

1. Cytomégalovirus

Le Cytomégalovirus humain (CMV) est un β -herpèsvirus possèdent un génome à ADN linéaire double brin encapsulé dans une capsidie icosaédrique entourée d'un tégument de phosphoprotéines recouvertes de glycoprotéines ancrées dans une enveloppe bilipidique.¹²⁰ Plus de 50% de la population Nord-Américaine adulte est séropositive au CMV, c'est-à-dire

qu'il est possible de détecter des anticorps spécifiques contre le virus dans le sérum sanguin, indiquant que l'individu a été infecté par le virus au préalable.¹²⁰ La majorité des infections ont lieu durant la petite enfance ou à l'adolescence. La transmission de ce virus se fait par contact direct entre les muqueuses et les fluides corporels infectieux. L'infection à CMV est largement asymptomatique.¹²⁰

2.1 Réplication virale

Le virus établit d'abord des liaisons de faible affinité avec le glycocalyx cellulaire.¹²¹ Les glycoprotéines H (gH), glycoprotéines B, (gB) N ou M (gN/gM) de l'enveloppe virale lient les intégrines, l'héparane sulfate ou des récepteurs entraînant l'endocytose de la capsidie dans le cytoplasme de la cellule hôte.¹⁰¹⁻¹⁰⁷ La capsidie se déplace dans le cytoplasme via les réseaux microtubulaires puis, grâce à ces séquences de localisation nucléaire, la décapsidation libère l'ADN virale dans le noyau eucaryote.^{122,123} Des ARN messagers (ARNm) sont synthétisés, transitent ensuite dans le cytoplasme pour être transcrits en protéines virales avant de revenir vers le noyau pour participer à la réplication virale. Ces protéines ont des fonctions régulatrices pour la réplication virale et exercent un rétrocontrôle sur leur production. L'ADN viral néosynthétisé associé avec des protéines virales est incorporé dans les capsides immatures, puis elles bourgeonnent à travers le feuillet interne de la membrane nucléaire et poursuivent leur maturation complexe impliquant le réseau trans-Golgi, des corps multi-vésiculaires et des endosomes.¹²⁴ Les particules virales matures sortiront de la cellule par exocytose.

2.2 Primo-infection et dissémination

La cytopathologie due au CMV se retrouve souvent dans de nombreux organes (glandes salivaires, poumons, reins, foie, pancréas, surrénales, muqueuse intestinale) malgré que le site d'inoculation soit habituellement la surface muqueuse des voies respiratoires supérieures ou des parties génitales. ¹²⁰

Au cours de la primo-infection, le CMV est disséminé par la virémie pour atteindre les différents organes et tissus cibles. L'infection des leucocytes et de l'endothélium vasculaire joue un rôle crucial. Les cytokines, les chimiokines et les récepteurs de chimiokines encodés par CMV ont le potentiel d'influencer le niveau de virémie en modulant le trafic cellulaire, la signalisation intracellulaire et l'activation des cellules hôtes. ¹²⁵⁻¹³² Au cours de cette phase, les cellules endothéliales, les monocytes et les macrophages jouent un rôle majeur dans la diffusion du virus. Suite à la résolution de l'infection primaire, le virus va persister sous forme latente non répliquative principalement dans les monocytes et les progéniteurs hématopoïétiques. ¹²⁵⁻¹³²

2.3 Évasion immune

Le système inné reconnaît la présence du pathogène par les récepteurs TLR et le combat notamment par la sécrétion d'interférons et l'activation des CPA et des NK qui jouent un rôle important dans le contrôle précoce de l'infection. ¹³³⁻¹³⁵ Le CMV induit une diminution de l'expression du CMHI, ce qui devrait diminuer la reconnaissance des cellules infectées par les CD8, mais activer fortement les NK. ¹³⁶⁻¹³⁹ Cependant, le virus utilise diverses stratégies d'immunosubversion afin de notamment limiter l'activation des NK.

Le CMV encode pour une protéine (UL40) qui, suite à sa protéolyse, génère des peptides de forte affinité pour HLA-E, augmentant ainsi sa demi vie à la surface de la cellule infectée. ^{140,141}.

La reconnaissance du HLA-E par les NK les inhibent. De plus, le CMV exprime une protéine homologue au CMHI (UL18) ayant une affinité plus forte que le CHMI avec un récepteur inhibiteur des NK, inhibant l'activation des NK l'exprimant.¹⁴²⁻¹⁴⁵ La protéine du tégument pp65 encodée par le virus peut être sécrétée par la cellule hôte et interagit avec un récepteur activateur des NK, bloquant ainsi sa signalisation.¹⁴⁶ Plusieurs protéines virales du CMV empêchent l'expression de récepteurs activateurs des NK et de ligands de ceux-ci.¹⁴⁷⁻¹⁵²

En plus d'inhiber l'activation des NK, le CMV module également la réponse adaptatrice qui s'exerce à son encontre. Notamment, le virus encode pour plusieurs protéines homologues aux récepteurs de cytokines pro-inflammatoires, ce qui diminuerait la biodisponibilité de celles-ci pour les lymphocytes T.¹¹⁰ Le virus code également pour des homologues de cytokines immunosuppressives telles que vIL-8 et vIL-10.¹¹⁰ En plus d'inhiber l'effet de cytokines pro-inflammatoire de type Th1, IL-10 induit une diminution de l'expression du CMHII et des molécules de costimulation CD80 et CD86 à la surface des monocytes. Ceci empêcherait l'activation optimale des lymphocytes T.¹⁵³ IL-10 est aussi responsable d'une diminution importante de la sensibilité des CD8 à l'antigène.¹⁵⁴

2.4 Réactivation

Les cycles de réactivations périodiques du virus activent le système immunitaire entraînant l'augmentation au cours du temps du nombre de Tm spécifiques.¹²⁰ Ce processus immunitaire limite la capacité du CMV à provoquer des symptômes cliniques chez les hôtes immunocompétents.

2.4.1 Infection chez les hôtes immunocompromis

Cependant, l'infection au CMV chez les hôtes immunocompromis tels que les receveurs de transplantation d'organes solides (TOS) ou de cellules hématopoïétiques allogénique (ATCH) est associée à des complications graves.¹⁵⁵⁻¹⁵⁹

En fait, il est très difficile de greffer des tissus ou des cellules étrangères sans que le système immunitaire ne les rejette, puisque le CMH est unique à chaque individu (sauf chez les jumeaux identiques). Ces disparités immunogénétiques peuvent induire une réaction immunitaire contre les cellules ou les tissus. En transplantation, 5 à 10% des lymphocytes T vont avoir une forte affinité pour un CMH étranger.¹⁶⁰ Les lésions d'ischémie-reperfusion induites par la transplantation augmentent l'expression des HLA. Ainsi, précocement, il y aura activation du système immunitaire inné et des médiateurs inflammatoires, suivie par une réponse adaptative. Les CD du donneur ou du receveur peuvent également présenter des allo-antigènes dans les organes lymphoïdes secondaires aux lymphocytes T. Le tout causera du dommage cellulaire directement et indirectement aux greffons. Même après une transplantation entre deux individus CMH-identiques de l'alloréactivité peut être observé. Celle-ci est dû à la reconnaissance par les lymphocytes T d'antigène mineurs d'histocompatibilité.¹⁶¹ Cette alloréactivité se traduit essentiellement par le rejet de l'organe ou de la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD).

Afin de limiter l'alloréactivité et accroître le succès des greffes, la prise d'immunosuppresseurs est indispensable. Ces approches bloquant les lymphocytes T ou leurs fonctions prédisposent les patients à plusieurs infections.¹⁶²⁻¹⁶⁴ Environ 30 à 50 % des patients greffés vont réactiver le CMV, ce qui est associé à un pronostic défavorable.^{155-159,165}

Une primo-infection peut survenir chez les greffés séronégatifs recevant un organe ou des cellules provenant d'un donneur séropositif au CMV. Chez les receveurs séropositifs au CMV ou les receveurs d'organes ou de cellules séropositifs une réactivation du virus latent est fréquente. Chez l'ensemble de ces patients, l'infection à CMV suite à la transplantation se manifeste par une large gamme de symptômes cliniques. Généralement, ceux-ci se traduisent par de la fièvre, une leucopénie et une maladie invasive des tissus dont le tractus gastro-intestinal, le poumon et l'organe transplanté sont les plus fréquemment atteints.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ Il y a de nombreux effets indirects, notamment des surinfections par d'autres pathogènes opportunistes contribuant à une augmentation du dysfonctionnement aigu et chronique suite à la transplantation. Le tout accroît la mortalité et la morbidité chez les patients immunodéprimés.

166-168

2.4.2 Traitement des hôtes immunocompromis

L'approche classique lors d'une infection au CMV chez un patient immunocompromis consiste en l'injection d'agents pharmacologiques antiviraux, principalement le Ganciclovir et le Valganciclovir.^{163,164} Dans plusieurs études, cette stratégie en prophylaxie antivirale s'est montrée efficace, sans toutefois restaurer l'immunité contre le virus.^{163,164} En plus d'induire de nombreux effets indésirables allant de la neutropénie à la neurotoxicité, plus de 35% des patients ayant suivi un traitement complet vont réactiver leur CMV, sans compter qu'il a été rapporté que jusqu'à 14% des patients TOS et 29% des patients ATCH réfractaires aux antiviraux standards ou ils ont une infection résistantes.^{163,164} Ce qui peut être dû à une déficience immunologique sévère, un traitement antiviral sous-optimal ou encore une mutation génétique du virus.

3. Immunothérapie adoptive antivirale

L'immunothérapie adoptive antivirale est utilisée pour le traitement des infections virales chez les patients fortement immunosupprimés (TOS ou ATCH). Cette thérapie qui permet de restaurer l'immunité contre un virus consiste à injecter des cellules immunes suite à leur expansion *ex vivo*. La source cellulaire peut être soit autologue, provenant du receveur, soit allogénique, provenant du donneur de ATCH, ou encore tierce partie, provenant ni du receveur ni du donneur.

Au début des années 90, les premières infusions de leucocytes provenant du donneur ont été faites chez des greffés de moelle osseuse afin de traiter des réactivations du CMV et d'Epstein-Barr virus (EBV).¹⁶⁹⁻¹⁷³ Cette approche a induite entre autres une réaction du greffon contre l'hôte (GVHD).^{170,174} Au cours des deux dernières décennies, plusieurs approches ont été développées pour permettre de faire l'expansion de cellules T virus-spécifiques et ainsi limiter le risque de GVHD.

En effet, l'immunothérapie adoptive antivirale est efficace et sécuritaire pour la prévention et le traitement des syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation qui sont majoritairement dû à une réactivation d'EBV.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Cette stratégie a également été utilisée avec succès dans plusieurs contextes expérimentaux pour traiter les infections à CMV réfractaires ou résistantes aux antiviraux.

L'immunothérapie adoptive est une thérapie ayant un réel potentiel thérapeutique et semble très sécuritaire. Cependant, cette approche est limitée par la disponibilité, le temps nécessaire pour générer les cellules adéquates pour l'infusion, le statut sérologique du donneur et sa nature

personnalisée. Pour surmonter certaines de ces limites, nous avons évalué le potentiel des PBMC des chambres de leucoréduction.

4. Chambre de leucoréduction

Les chambres de leucoréduction (LRSC) sont utilisées par les agences de sang, telle qu'Héma-Québec pour leucodépléter les dons de plaquettes par aphérèse. La chambre biconique intégrée dans l'appareil d'aphérèse en tant que filtre leucocytaire empêche la contamination du produit plaquettaire par des globules blancs. Elle permet de réduire les effets indésirables liés à la transfusion de produits sanguins, tels que le risque de GVHD transfusionnelle et la transmission de virus. Durant la dernière année, plus de 36 000 LRSC ont été utilisés par Héma-Québec et elles ont ensuite habituellement été considérés comme un déchet. Les LRSC contiennent un jusqu'à 1 milliard de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) et constituent une source fiable de cellules pour la recherche. En effet, les LRSC constituent une alternative au sang périphérique ou à l'aphérèse pour étudier les lymphocytes B et T, les monocytes, les CD et les cellules souches.¹⁷⁷⁻¹⁸³

5. Hypothèse et objectifs

5.1 Hypothèse

Les infections opportunistes et les réactivations virales demeurent une cause importante de morbidité et de mortalité chez les patients ayant reçu une TOS ou ATCH. Bien que le traitement conventionnel soit l'administration d'antiviraux, il est coûteux, pas toujours efficace et ne

restaure pas l'immunité du patient contre le virus en plus d'accentuer l'immunosuppression du patient, augmentant ainsi le risque d'infections.

Même chez les patients réfractaires, le transfert adoptif de lymphocytes T virus-spécifiques a donné des résultats remarquables pour le contrôle des complications liées au virus. Cependant, la disponibilité de lymphocytes T limite l'établissement de nouveaux protocoles pour l'utilisation de ces thérapies prometteuses.

Les LRSC, chambre biconique utilisée pour filtrer les produits sanguins des donneurs de plaquettes, pourraient constituer une source de cellules idéale pour l'utilisation clinique.

Nous avons donc émis l'hypothèse que les LRSC sont une nouvelle source de cellules toute aussi bonne que le sang périphérique pour la génération de lignées de lymphocytes T spécifiques à CMV dans le contexte de la thérapie cellulaire antivirale.

5.2 Objectifs

- 1) Valider que les LRSC sont une source appropriée de cellules pour générer des produits cellulaires.
- 2) Générer des lignées pathogènes spécifiques à partir d'un répertoire naïf avec un protocole adaptable à la clinique.

Résultats

6. Résultats

6.1 Leukoreduction system chambers are a reliable cellular source for manufacturing of T-cell therapeutics

Cet article valide l'utilisation des LRSC comme source de cellules dans les protocoles d'immunothérapie adoptive antivirale et donc répond directement aux deux objectifs de mon mémoire.

Statut : Publié

Journal : Transfusion

Contribution des auteurs :

J'ai conçu, exécutée et analysée la majorité (80-85%) des travaux présentés dans ce manuscrit.

Le rôle des co-auteur a été des conseils et la validation des devis expérimentaux. La rédaction de la version finale du manuscrit en anglais a également requis un apport plus important des co-auteurs.

Leukoreduction system chambers are a reliable cellular source for the manufacturing of T-cell therapeutics

Running title: Expansion of LRSC T cells

Gabrielle Boudreau¹, Cédric Carli¹, Caroline Lamarche¹, Caroline Rulleau¹, Guillaume Bonnaure^{1,2}, Sonia Néron^{2,3}, and Jean-Sébastien Delisle^{1,4,5}

¹ Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Qc, Canada

² Héma-Québec, Medical Affairs and Innovation, Québec, Qc, Canada

³ Department of biochemistry, microbiology and bio-informatics, Université Laval, Québec, Qc, Canada

⁴ Hematology-oncology division, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Qc, Canada

⁵ Department of Medicine, Université de Montréal, Qc, Canada

This work was supported by a *Canadian National Transplant Research Program (CNTRP)* *Astellas Research Innovation Grant* funded by Astellas Pharma Canada, Inc. and jointly established by Astellas Pharma Canada, Inc.

The authors declare that they have no conflicts of interest relevant to the manuscript submitted to TRANSFUSION.

Word count: 3996

ABSTRACT

BACKGROUND: Following solid organ or hematopoietic cell transplantation, refractory opportunistic viral reactivations are a significant cause of morbidity and mortality but can effectively be controlled by virus-specific T-cell transfer. Among effective and safe strategies is the use of “third-party” (neither from the transplant donor nor recipient) virus-specific T cells that can be manufactured from healthy donors and used as “off-the-shelf” therapies. Leukoreduction system chambers (LRSC), recovered after routine plateletpheresis were evaluated as potential source of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) for the manufacturing of clinical-scale virus-specific T cell. **STUDY DESIGN AND METHODS:** PBMCs from the same donors obtained either from LRSC or peripheral blood were compared, focusing on T-cell function and phenotype as well as potential to generate cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell lines from both CMV seropositive and seronegative donors. **RESULTS:** PBMCs from both sources were comparable except for a transient downregulation of CD62L expression on freshly extracted PBMCs from LRSCs. Both non-specific stimulation using anti-CD3/CD28 antibodies and CMV peptides revealed that LRSC or blood T cells were equivalent in terms of expansion, differentiation and function. Moreover, PBMCs from LRSC can be used to generate autologous monocyte-derived dendritic cells to prime and expand CMV-specific T cells from seronegative donors. **CONCLUSION:** LRSC are a reliable source of PBMCs for the generation of virus-specific T cells for immunotherapy. These findings have implications for the development of third party therapeutic T-cell products from well-characterized blood product donors.

Keywords: Adoptive immunotherapy, Leukoreduction system chamber, LRSC, Third party, T-cell manufacturing, Cellular therapy, Immunology, Transplantation-Stem Cell

INTRODUCTION

Blood banks apply universal leukoreduction to all blood products to reduce adverse events associated with the transfusion of blood products.¹⁻⁴ Héma-Québec's leukoreduced platelet concentrates are produced with apheresis instruments. During the last year, more than 36,000 leukoreduced platelet concentrates were produced generating as many leukoreduction system chambers (LRSC), which were discarded at the end of the process. The LRCS contains high numbers of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and are a reliable source of human cells for research. As such, LRSC are an alternative to peripheral blood collections or apheresis for the study of B cells, monocytes, dendritic cell (DC), stem cells and T cells.^{2,5-10} Regular platelet apheresis donors undergo extensive testing for transmissible diseases, are often well-characterized in terms of Human Leukocyte Antigen (HLA) typing as well as serostatus for common latent pathogens. As such, PBMCs harvested from LRSC following collection of platelets by apheresis may be exploitable as a safe source of leukocytes for therapeutic applications.

Over the last two decades, several immunotherapeutic approaches involving the *ex vivo* manipulation and expansion of immune cells, particularly T cells, have been developed. While some of these adoptive immunotherapy strategies aim primarily at expanding naturally occurring T cells,^{11,12} others rely on gene engineering to impart new properties to T cells.^{13,14} Both autologous and allogeneic cellular sources have been used to generate potent immunotherapeutic products. The possibility of using allogeneic T-cell products offers many new opportunities such as the manufacturing of large and well-characterized lots, as well as the development of cell banks enabling the rapid delivery of T-cell immunotherapeutics.¹⁵⁻¹⁸ The

PBMCs contained in LRSC used to filter blood products obtained from regular and well-characterized platelet donors may be an ideal source for the manufacturing of such therapies.

Solid organ transplantation and allogeneic hematopoietic cell transplantation (AHCT) are respectively the best therapeutic option for end-stage organ dysfunction and several refractory hematopoietic cancers, bone marrow failure syndromes as well as primary immunological diseases.¹⁹⁻²¹ The mandatory use of immunosuppression to prevent graft rejection or graft-versus-host disease predisposes patients to several infections. Opportunistic viral reactivations from established latent viruses (or transferred through the graft) are especially challenging in the context of compromised T-cell immunity. Among others, the reactivation of herpes family viruses such as Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV) and HHV6 as well as polyoma viruses such as BK virus are a significant burden in transplantation, impacting both morbidity and mortality rates.²²⁻²⁵ While reducing immunosuppression and administering anti-viral drugs remain the cornerstone of current treatments for viral reactivations after transplantation, adoptively transferred virus-specific T cells have yielded remarkable results for the prevention and control of virus-related complications, even in patients refractory to conventional treatments.²⁵ The use of *ex vivo* stimulated and expanded virus-specific T cells from either the patients themselves (or AHCT donor) or so-called allogeneic “third party” donor (neither the graft recipient nor donor) are associated with a very high rate of durable responses with very little toxicity.^{16-18,26-31} However, virus-specific T cells are not widely available, limiting the use of these promising therapies.

We evaluated the feasibility of generating virus-specific T-cell lines from PBMC harvested from LRSCs. The PBMCs obtained from LRSC and paired peripheral blood samples were comparable at reliably generating clinical-scale CMV-specific T-cell lines from seropositive donors. Such T-cell lines displayed T-cell memory phenotypes and no evidence of T-cell exhaustion, predicting good performance after adoptive transfer.^{32,33} Finally, using LRSCs from CMV seronegative donors, we further show that monocyte-derived dendritic cells (moDCs) can be prepared from LRSC-extracted PBMCs and used to prime and expand CMV reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells from CMV naïve donors. Overall, our work shows that LRSC are a reliable source of PBMCs for the manufacturing of clinical scale T-cell therapies from memory and naïve T-cell repertoires. As such, the use of LRSCs in research and clinical applications may contribute to maximize the impact of every apheresis procedure.

MATERIALS AND METHODS

LRSC and whole-blood procurement and handling

This study has been approved by Héma-Québec's and Hôpital Maisonneuve-Rosemont Research Ethics Committees (CÉR 13030, HQ 2017-004). Regular platelet donors who agreed to participate in this study have all signed an informed consent. LRSCs were collected after plateletpheresis procedures on Trima Accel, (Version 6; Terumo BCT, Lakewood, CO). Immediately at the end of collection the tubing linking the LRSC to the collection set was clamped, sealed and cut. Peripheral blood from 5 of LRSC platelet donors was also recovered from the diversion pouch in citrated tubes (Vacutainer, BD Labware) at the time of plateletpheresis.³⁴ The LRSC and blood sample were stored at room temperature and processed within 24 hours. The isolation of PBMCs from the LRSC was performed as previously described.^{6,35} Briefly, individual LRSCs were back-flushed using 40mL of Hank's balanced salt solution (Gilco) supplemented with 10% anticoagulant citrate dextrose solution (USP formula A; Fenwal). The recovered PBMCs were isolated by centrifugation on Ficoll-Paque Plus as recommended by the manufacturer (GE Healthcare). The cells were then used fresh or were cryopreserved in RPMI-1640 media supplemented with 30% fetal bovine serum and 10% dimethyl sulfoxide for future use.

T-cell polyclonal stimulation

PBMCs (1×10^6 cell/mL) were cultured in 96-well round-bottom plates pre-coated with anti-CD3 antibodies (5 µg/mL-BD Pharmingen), in T-cell media supplemented with 1 µg/mL anti-human CD28 (BD Pharmingen). On days 3 and 5, half-media was removed and replenished with

fresh T-cell media (advanced RPMI-1640 media, 2 mmol/L L-glutamine and 10% human serum).

Pathogen specific T-cell line generation from CMV seropositive donors

The rapid expansion of virus-specific memory T cells was performed based on previous studies.^{36,37} Briefly, 15×10^6 PBMCs were pelleted and pulsed with 100ng of CMV 65 kDa phosphoprotein (pp65) overlapping peptide library (JPT Peptides) and incubated 30 min at 37°C. Cells were then mixed with 30 mL of T-cell media supplemented with 400 U/mL IL-4 (Stem Cell Technologies) and 10 ng/mL IL-7 (Stem Cell Technologies). Cells suspensions were incubated at 37°C and 5% CO₂ in G-Rex culture vessels (Wilson Wolf Manufacturing) for 14 days. At days 5, 9 and 12, half of the media was removed and cultures were replenished with fresh T-cell media containing IL-4 and IL-7. Cells were counted using trypan blue exclusion and an automated cell counter (Countness, Invitrogen). If cell concentration exceeded 1.5×10^6 /mL, cultures were divided 1:2 and replenished with fresh medium.

Generation of human moDCs

Based on our methods,^{38,39} monocytes from PBMCs were isolated by plastic adherence and cultured in DC medium (X-vivo 15 - Lonza, 5% human AB serum, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 2 mM L-Glutamine et 1 mM sodium pyruvate) supplemented with 800 IU/mL GM-CSF and 1000 IU/mL IL-4 - both cytokines were from Feldan). After 7 days, moDCs were matured for 48 hours with GM-CSF (800 IU/mL), IL-4 (1000 IU/mL), 10 ng/mL TNF α , 10 ng/mL IL-1 β , 100 ng/mL IL-6 (Feldan) and 1 µg/mL prostaglandin E2 (Sigma-Aldrich). 1000U/mL IFN γ was added during the last 24 hours of the maturation.

Pathogen specific T-cell line generation from CMV-seronegative donors

Based on previous work,³⁸ pathogen-specific T cell lines were generated using 15×10^6 PBMCs cocultured with autologous, peptide-loaded (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of pp65 peptide library for 2h at 37°C) mature moDC at a 1:10 ratio (moDC : PBMC). PBMCs and peptide-pulsed mature moDCs were cocultured for 7 days in T-cell medium supplemented with 30 ng/mL IL-21 and 10 ng/mL IL-12 (Feldan) in G- Rex culture vessels. At day 7, T cells were washed and restimulated with peptide-pulsed moDC and incubated in T-cell medium supplemented with 30 ng/mL IL-21, 100 IU/mL IL-2, 10 ng/mL IL-7 and 5 ng/mL IL-15 (Feldan). After 14 days, IFN γ -secreting cells were enriched with the IFN γ Secretion Assay-Detection Kit (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Briefly, T cells were stimulated for 4 hours with the pp65 overlapping peptide library, labeled with an IFN γ catch reagent and an IFN γ detection antibody conjugated to PE and magnetically separated using anti-PE MicroBeads and a MACS separator. Selected IFN γ -secreting T cells were expanded using a rapid expansion protocol (REP). For the REP, 8.5×10^4 T cells were resuspended in 25 mL of T-cell medium containing 25×10^6 irradiated (40 Gy) autologous PBMCs, 30 ng/mL soluble anti-CD3 (clone OKT3) and 50 IU/mL IL-2 and transferred to a T25 tissue culture flask (maintained in the vertical position) for 12 days. After 4 days, cultures were harvested and resuspended in 25 mL of fresh T-cell medium with IL-2. Half medium changes were performed every 4 days.

Flow cytometry

Cells were surface stained with monoclonal antibodies to: CD3 (BUV395 or PE-Cy7), CD4 (PE-Cy5), CD8 (APC-CY7), CD45RO (FITC), CCR7 (Alexa fluor 700), CD11c (APC or PerCP-Cy5.5), CD56 (Pacific blue), CD14 (PE or APC-Cy7) (all from BD Biosciences), CD62L

(Pacific blue), PD-1 (Bv605), CD57(efluor 605), KLRG1(FITC) (all from BioLegend) or CD8 (BV605-eBiosciences), washed and fixed in PBS 2% FBS 1% PFA. Intracellular cytokine detection was performed after cell stimulation for 4 hours with DMSO, pp65 peptide library, a non-targeted irrelevant peptide library (EBV protein Late-membrane protein 2 -LMP2, JPT peptides) or 50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich) and 500 ng/mL ionomycin (Sigma-Aldrich). All conditions included intracellular transport blockade (7.5 mg/mL Brefeldin A - Sigma-Aldrich). Cells were then permeabilized and fixed (Foxp3 Transcription Factor Stainin buffer set, eBioscience). The cells were stained with anti-IFN γ , anti-IL-2, anti-TNF α (BD Biosciences) and resuspended in PBS 2% FBS 1% PFA before acquisition. For degranulation assessment, BD GolgiStop solution, anti-CD107a and anti-granzyme B (BD Biosciences) were used. T cells treated with 50 ng/mL PMA and 500 ng/mL ionomycin were used as positive controls. Data were acquired on an LSRII or Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with Flow LogiC software (Inivai Technologies) or FlowJo (LLC).

IFN γ Enzyme-linked immunospot (ELISpot) and cytotoxicity assays

IFN γ ELISpot assays were performed with 5×10^4 cells per well, according to manufacturer instructions (Mabtech). The assessment of cytotoxicity was performed by flow cytometry. Autologous or allogeneic phytohemagglutinin (PHA) blasts (3×10^6 PBMCs/mL were incubated in T-cell media with 20 μ g/mL PHA for 3 days at 37°C and 5% CO $_2$) were pulsed (or not) with the pp65 peptide library and labelled using violet or yellow CellTrace cell proliferation kits (Invitrogen) for 20 min at 37°C and 5% CO $_2$. The PHA blasts were then exposed to responder T cells at various ratios for 4 hours. Following this coculture, Live/Dead fixable aqua dead cell

stain kit was used according to the manufacturer's instructions (Life technologies). Determination of live PHA counts was done by flow cytometry (LRSII, BD Biosciences and Flow LogiC software). Specific cytotoxicity was calculated using the difference between the absolute number of live target cells (PHA blasts) in the control condition where no effectors (responder T cells) were added, and the absolute number of live target cells in conditions where effectors were added at different effector:target ratios. The percentage of live cell number relative to the control was then subtracted from 100 and reported as percent cytotoxicity. Absolute cell counts were determined using CountBright absolute counting beads (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Statistics

Statistical analyses were performed with the use of R software Version 3.2.4. Two tailed paired Wilcoxon or Kruskal-Wallis (non-parametric Anova) tests were used, and values of $P \leq 0.05$ were considered significant.

Results

LRSCs contains representative PBMCs subsets relative to peripheral blood

Following plateletpheresis at the collection center, LRSCs were shipped as previously described⁴⁰ to the laboratory where they were processed the following day. On average, 7 mL of PBMC-enriched blood was extracted from the LRSCs (n=8), yielding 1.3 ± 0.6 billion PBMCs after density gradient isolation. We performed phenotypic characterization of the PBMCs from 5 LRSCs for which paired peripheral blood (sampled during the plateletpheresis) was available. The percentage of T cells, NK cells, B cells, DC and monocytes were comparable among the PBMCs obtained from LRSC or blood (Figure 1A-B). Further characterization of the T-cell compartment revealed similar proportions of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and distribution across the subpopulations of naïve (Tn – CD45RO⁻, CCR7⁺), central memory (Tcm – CD45RO⁺, CCR7⁺) and effector memory (Tem – CD45RO⁺, CCR7⁻) T cells (Figure 1C-D).³² Importantly, the cell surface molecule CD62L, which is often used as a marker of Tn and Tcm, was expressed at much lower levels on LRSC T cells (Figure 1E). It has previously been observed that CD62L can be cleaved from the cell surface⁴¹ and we surmise that the LRSCs are conducive to CD62L cleavage. We nonetheless conclude that PBMCs and T cells extracted from either LRSC or blood are similar in proportion and phenotypes.

T cells harvested from LRSCs and blood are similarly functional

A prerequisite to the use of LRSC-extracted T cells in adoptive immunotherapy is their capacity to expand and acquire effector functions after stimulation. We first assessed T-cell responses after non-specific T-cell activation using agonistic anti-CD3/CD28 antibody stimulation. After 7 days in culture, the total cell count increased 6.6 ± 1.8 fold for the LRSC and 5.9 ± 1.6 fold for

the peripheral blood with T cells in equivalent CD4⁺/CD8⁺ proportions representing the majority of cells (LRSC 92% and blood 83%) in the culture (Figure 2A). Moreover, the proportions of T_n, T_{cm} and T_{em} generated using the cells from LRSCs were similar to those from the paired blood samples (Figure 2B). As expected, T_{em} tended to predominate after activation, irrespective of the origin of the T cells. The proportion of T_n and T_{cm} based on the expression of CD45RO and CD62L or CCR7 were similar (data not shown), confirming that the low expression of CD62L on freshly LRSC-extracted T cells is transient and does not impact T-cell differentiation phenotypes in culture. In order to evaluate whether expanded T cells from LRSCs or blood had comparable effector function and cytokine secretion potential, we stimulated the T cells at the end of the culture using PMA/ionomycin.³⁷ Intracellular staining for IFN γ , TNF- α and IL-2 revealed similar patterns of cytokine secretion between the two groups (Figure 2C-E). Likewise, PMA/ionomycin stimulation led to an equivalent proportion of T cells showing evidence of degranulation as assessed by intracellular granzyme B (GZMB) and cell surface expression of CD107a (Figure 2C-D). Taken together, these data support the notion that peripheral blood T cells obtained through LRSCs and fresh blood have a similar potential to expand and acquire effector functions.

PBMCs from LRSCs can be used to rapidly generate pathogen-specific T-cell lines

In transplantation settings, CMV is one of the most common opportunistic viral reactivations.^{42,43} Based on the premise that T cells from LRSCs are equivalent to T cells harvested in the peripheral blood, we next tested whether PBMCs from LRSCs could be used to generate CMV-specific T cells. To this end, we used a variation of a protocol that can rapidly generate virus-specific T-cell lines in 9-14 days by expanding virus-specific memory T cells

from PBMCs, and that has previously been used in adoptive immunotherapy trials.^{18,36,37,44} This process involves exposing whole PBMCs to an overlapping peptide library that provides extensive coverage of the entire sequence of the CMV antigenic pp65 protein followed by expansion in IL-4 and IL-7 supplemented media. Again, paired LRSC and blood PBMCs from the same donors collected at the same time were used. From 15×10^6 PBMCs at the start of the culture, cell counts had increased by 6.7 ± 3.5 (LRSC) and 5.1 ± 3.1 (blood) fold, with T cells representing the vast majority of cells at the end of the culture (Figure 3A-B). The generated T-cell lines had balanced $CD4^+/CD8^+$ T-cell and Tcm/Tem ratios (Figure 3B). We extended the phenotypic assessment to determine whether the generated cells expressed markers associated with exhaustion and terminal differentiation. In all cases but one, the proportions of $CD4^+$ or $CD8^+$ T cells expressing the terminal differentiation markers KLRG1 and CD57 or exhaustion markers PD-1, TIM3 and LAG3 were always less than 50% after 14 days in culture (Figure 3C). Hence, virus-specific T-cell lines generated from LRSC and blood PBMCs displayed memory differentiation without prominent signs of terminal differentiation or exhaustion. Finally, LRSC and blood-derived PBMCs generated equivalent proportion of pp65-reactive T cells as evaluated by the IFN γ ELISpot assay (Figure 3D). We conclude that the PBMCs harvested from LRSCs and peripheral blood are equivalent to generate pathogen-specific T-cell lines from memory repertoires.

Cryopreservation does not affect rapid CMV T-cell line generation from LRSC-extracted PBMCs

Few applications would require the use of all the PBMCs harvested from a single LRSC. Considering that LRSCs yield on average more than a billion PBMCs, capable of supporting the

manufacturing of several T-cell products, we next assessed whether LRSC-extracted PBMCs could be used after cryopreservation.^{7,45} To this end, fresh and thawed PBMCs from the same LRSCs were used to generate CMV-specific T-cell lines. Cryopreserved PBMCs tended to expand slightly more than fresh PBMCs, but this did not reach statistical significance (Figure 4A). Moreover, the antigenic specificity of the T-cell lines generated from fresh or thawed LRSC PBMCs was comparable as assessed by the ELISpot assay (Figure 4B). To further characterize the T-cell lines generated from thawed PBMCs, we performed cytotoxicity assays using PHA blasts also generated from cryopreserved PBMCs as targets. As predicted by previous studies,^{36,37} the pp65-specific T-cell lines killed autologous PHA blasts pulsed with the pp65 peptide library but not their unpulsed counterparts (Figure 4C-D). To assess for the risk of unwanted off-target reactivity against allogeneic cells, as this is relevant in a transplantation context, we also performed cytotoxicity assays using allogeneic PHA blasts (Figure 4E-F). Our data confirmed that CMV-reactive T-cell lines do not kill allogeneic T cells. Hence, our results suggest that fresh and cryopreserved LRSC-extracted PBMCs can be used to generate pathogen-specific T-cell products.

Stimulation of a CMV naïve T-cell repertoire using LRSCs-derived dendritic cells

The priming and expansion of naïve T cells *in vitro* require several signals that are dispensable when expanding a memory repertoire. The use of professional antigen-presenting cells such as DC and stimulatory cytokines can successfully support a primary anti-viral response *in vitro*.⁴⁶⁻⁴⁹ Based on a protocol to prime and expand naïve T cells³⁸ and previous evidence that LRSC-extracted PBMCs can be used to generate moDCs,⁸ we devised a strategy to prime and expand pp65-specific T cells from CMV-seronegative LRSC donors. This process hinges on two

stimulations of 15×10^6 PBMCs with peptide pulsed moDC, followed by an enrichment procedure (cytokine capture) and a re-expansion (Figure 5A). As anticipated, $CD11c^+CD14^-$ moDC were generated at high purity and expressed HLA and co-stimulation molecules at high levels after maturation (figure 5B). At the end of the full process, an average of 57 ± 8 million T cells were harvested. The T-cell lines had a $CD4^+$ and Tem predominance (Figure 5C). However, less than 30% of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells expressed the late differentiation markers KLRG1 and CD57, or exhaustion markers PD-1, LAG3 and TIM3 (with the exception of TIM3-expressing $CD8^+$ T cells) (Figure 5D-E). Specific reactivity to pp65 peptides was confirmed by intracellular cytokine staining and ELISpot (Figure 5F-H). Moreover, degranulation assays using CD107a staining suggested preferential reactivity towards pp65 peptides but this did not reach statistical significance (Figure 5I). Taken together, LRSC-derived PBMCs can be used to generate mature moDC capable of priming virus-specific T cells lines from virus naïve (seronegative) donors.

Discussion

The study of human immune cells and the development of human T-cell therapeutic products require access to a steady supply of PBMCs. However, volunteer donor recruitment can be tedious and the use of commercial providers is expensive. Blood banks are leukodepleting their blood products generating thousands of LRSCs that are discarded annually. Blood banks, such as the Canadian Blood Services are increasingly proposing such by-products, or unusable products, to researchers to support their work on transfusion medicine⁵⁰. The content of LRCS represents for sure an opportunity for researchers and clinicians and could maximize the potential human benefits of every leukodepletion procedure. Based on previous work suggesting that PBMCs from LRSCs can be used to study a variety of human leukocytes,^{5,6} we undertook to assess whether this source of PBMCs was reliable to generate clinical-scale CMV-specific T-cell lines. We chose CMV for several reasons; (i) CMV reactivation is a significant medical problem, especially in the context of transplantation,^{24,43} (ii) the CMV serostatus of several regular platelet donors was known, enabling experiments to be done with naïve and memory T-cell repertoires, and (iii) anti-viral (including CMV) adoptive immunotherapy using third party donors has a promising track record^{18,26} and as such, blood agencies may want to invest into third party T-cell banks through the participation of well-characterized regular apheresis donors.

In this study we confirm and extend previous studies suggesting that PBMCs obtained from LRSCs are an adequate surrogate for the study of human leukocytes. Our data using paired PBMCs from LRSC and blood collected during the same procedure, show that there is high concordance in the relative counts of all major mononuclear subsets.^{2,6} This was also the case in the conventional T-cell compartment, where CD4⁺ and CD8⁺ T cells at different stage of

memory differentiation were found in similar percentages. However, the determination of T-cell subsets could not be based on CD62L expression which was considerably reduced on T cells from LRSCs. Although unclear at this time, the activation of proteases from cells in the LRSC may be responsible for this finding which is often transient.⁴¹ In any event, this had no impact on T-cell function, expansion and Tcm phenotype (assessed by CD62L expression in all other figures) following stimulation and culture. In fact, PBMCs from LRSCs and blood were remarkably similar after stimulation with anti-CD3/CD28 antibodies or viral peptides.

An objective of this study was also to assess the feasibility of using LRSC-derived PBMCs to generate anti-viral T cells at a clinical scale. Based on our previous experience and commonly used virus-specific T-cell doses used in adoptive immunotherapy studies, our T-cell expansions reached clinically relevant levels, displayed pathogen-restricted reactivity and included memory cells with only a minority expressing terminal differentiation or exhaustion markers. Considering that only a fraction of the PBMCs extracted from a single LRSC (as low as 1.5×10^7 of 1.3×10^9 cells) yields therapeutic scale numbers of virus-reactive T cells, LRSCs represent an interesting source of PBMCs for the manufacturing of virus-specific products. Indeed, recent studies have used T-cell doses of 20×10^6 /meter square of body surface area, equating to approximately 40 million T cells for an average adult.^{18,44} Our data comparing cryopreserved versus fresh PBMCs as a source of T cells and moDCs indicate that the large number of PBMCs extracted from a single LRSC may be used either immediately after collection, or later for the manufacturing of different products. This is particularly relevant in the context where third party donors are increasingly used in anti-viral adoptive immunotherapy and where a single LRSC or serial LRSCs from regular, well-characterized (HLA-type, serotyped for several viruses, tested for communicable diseases, etc.) donors may be used for several indications. However, not all

T-cell lines generated for this report displayed strong effector functions after culture. This variability between donors remains incompletely understood, but is in line with what we and others have observed previously³⁶⁻³⁸. However, blood and LRSC T cells from the same donors behaved similarly, consistent with the notion that LRSC are equivalent to blood as a source of T cells. Our results nonetheless suggest that in clinical settings, LRSC donors generating robust responses may be preferentially selected for the manufacturing of specific therapeutic T-cell products.

In conclusion, our work supports the use of LRSCs as a source of PBMCs for the development of adoptive T-cell therapy protocols from both a memory and a naïve repertoires and infers that this largely unused source of PBMCs may be used to manufacture clinical-grade T-cell products for a variety of indications.

Acknowledgments

We are thankful to all blood donors who agreed to participate in this study. We are also grateful to Marie-Ève Allard for the coordination of blood sample collection at Héma-Québec. Gabrielle Boudreau is supported by a Université de Montréal departmental scholarship (Pharmacology and physiology) and Guillaume Bonnaure by a MiTACS Acceleration post-doctoral award. Jean-Sébastien Delisle is a member of the Fonds de recherche du Québec-Santé (FRQS) supported cell therapy network (ThéCell), the Canadian National Transplantation Research Program (CNTRP) and holds a FRQS career award.

Figure legends

Figure 1: Similar PBMCs profiles from paired peripheral blood and LRSC samples. (A) Gating strategies for the identification of NK cells (NKP46, CD56), B cells (CD19), monocytes lineage (CD14), DC (CD11c), T cells (CD3) as well as the CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets along with representative staining of the T-cell differentiation markers CD45RO, CCR7 and CD62L. FMO refers to fluorescence minus one. (B) Proportions of T, B, NK, DC and monocytes lineage from LRSC and blood of 5 donors (D1 to D5, identified by different symbols). (C) Proportions of CD4⁺ and CD8⁺ T cells among CD3⁺ cells. (D) Distribution of CD8⁺ (left) and CD4⁺ (right) T cells subpopulations of effector memory (Tem) (CCR7⁻CD45RO⁺), central memory (Tcm) (CCR7⁺CD45RO⁺) and naïve (Tn) (CCR7⁺CD45RO⁻) T cells among the CD3⁺ population. (E) Percentage of CD62L-expressing CD3⁺. All comparisons between LRSC and blood-derived PBMCs were non-statistically significant, except for the expression of CD62L (*p<0.05).

Figure 2: Donor matched peripheral blood and LRSC-extracted T cells show similar expansion and activation potential. (A) T-cell expansion following anti-CD3/CD28 stimulation of 1x10⁵ PBMCs. (B) Proportions of CD4⁺/CD8⁺ T cells and their differentiation profile (Tem, Tcm and Tn) at the end of the culture based on the expression of CD45RO and CD62L. (C) Representative flow cytometry profiles (gated on CD3⁺) showing cytokine production (IL-2, TNF- α , IFN γ) and degranulation marker expression (CD107a) relative to granzyme B (GZMB) expression following stimulation (right) or not (left) with PMA/ionomycin. (D) Frequencies of T cells expressing GZMB and the degranulation markers CD107a. (E) Cytokine expression in T cells from all donors (left) and average proportion of T

cells expressing none, one of several cytokines (pie charts, right). All comparisons between LRSC and blood-derived T cells were not statistically significant.

Figure 3: LRSC-extracted PBMCs can be used to generate pathogen-specific T-cell lines.

(A) T cells fold expansion based on cell counts at the beginning and end of the culture (left) and viability at the end of the culture (right). (B) Proportion of Tem, Tcm and Tn CD4⁺ and CD8⁺ T cells at the end of the culture as defined by CD45RO and CD62L. (C) Representative staining for terminal differentiation and exhaustion cell surface markers on CD4⁺ and CD8⁺ T cells (top) and data from 5 donors (bottom). (D) Compiled (left) and representative (right) ELISpot results showing IFN γ -secreting T cells among 5×10^4 T cells at the end of the culture following no stimulation (cells exposed to the peptide diluent only, dimethyl sulfoxide – DMSO) or exposure to a non-targeted irrelevant peptide library (Irr), the targeted pp65 peptide library (pp65) or agonistic anti-CD3 (positive control). Statistically significant comparisons relative to the pp65 condition are indicated (**p<0.01). All comparisons between LRSC and blood-derived T cells were non-statistically significant.

Figure 4: Fresh and cryopreserved LRSC-derived PBMCs are comparable at generating pathogen-specific T-cell lines.

(A) T-cell line expansion using fresh or thawed PBMCs from the same LRSC (4 donors assessed). (B) ELISpot results at the end of the culture in four conditions: no stimulation (peptide diluent only, DMSO) or stimulation with a non-targeted irrelevant peptide library (Irr), the targeted pp65 peptide library (pp65) or agonistic anti-CD3 (positive control). (C) Representative and (D) compiled (n=5) cytotoxicity data showing specific killing of unpulsed, or pp65 peptide-pulsed autologous PHA targets at the indicated

target:effector ratios using cryopreserved PBMCs for T-cell line generation and PHA blast preparation. (E) Representative and (F) compiled cytotoxicity data obtained using unpulsed allogeneic PHA blasts as targets (n=5). The CTRL+ (positive control) condition represents target cells incubated in 70% ethanol and 1% bleach. Statistically significant comparisons relative to the pp65 condition are indicated (**p<0.01, ***p<0.001). Comparisons between fresh and frozen PBMCs from LRSC were not statistically significant. Error bars represent standard error to the mean (SEM).

Figure 5: Pathogen specific T-cell expansion from naïve repertoires using LRSC-derived PBMCs. (A) Schematic representation of the naïve T-cell priming and expansion protocol. (B) Representative moDC (CD11c⁺ CD14⁻) staining after monocyte isolation and culture in IL-4 and GM-CSF followed by maturation to evaluate the expression level of maturation markers (CD80, CD83, CD86, HLA-ABC, HLA-DR). (C) Histograms representing the mean proportions of Tem, Tcm and Tn CD4⁺ and CD8⁺ T cells at the end of the culture based on CD62L and CD45RO expression (3 donors). (D) Histograms showing mean proportions of CD4⁺ and (E) CD8⁺ T cells expressing terminal differentiation and exhaustion markers. (F) Mean IFN γ ELISpot results at the end of the culture from 3 donors using four conditions: no stimulation (peptide diluent only, DMSO) or stimulation with a non-targeted irrelevant peptide library (Irr), the targeted pp65 peptide library (pp65) or agonistic anti-CD3 (positive control). (G) Histograms representing the percentage of CD3⁺ cells producing IFN γ from three donors as evaluated by intracellular flow cytometry following either no stimulation (DMSO), irrelevant (Irr), pp65 peptide exposure, or PMA-ionomycin (PMA-Iono, positive control). (H) Histograms representing the percentage of CD3⁺ cells expressing IL-2 and/or TNF α and/or IFN γ (3 donors).

(I) Mean percentage of degranulating T cells following peptide stimulation. Statistically significant comparisons relative to the pp65 condition are indicated (* $p < 0.05$).

References

1. Shapiro MJ. To filter blood or universal leukoreduction: what is the answer? *Crit Care*. 2004;8 Suppl 2:S27-30.
2. Knorck A, Marx S, Friedmann KS, et al. Quantity, quality, and functionality of peripheral blood cells derived from residual blood of different apheresis kits. *Transfusion*. 2018;58(6):1516-1526.
3. Hebert PC, Fergusson D, Blajchman MA, et al. Clinical outcomes following institution of the Canadian universal leukoreduction program for red blood cell transfusions. *JAMA*. 2003;289(15):1941-1949.
4. Bassuni WY, Blajchman MA, Al-Moshary MA. Why implement universal leukoreduction? *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2008;1(2):106-123.
5. Dietz AB, Bulur PA, Emery RL, et al. A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers. *Transfusion*. 2006;46(12):2083-2089.
6. Neron S, Thibault L, Dussault N, et al. Characterization of mononuclear cells remaining in the leukoreduction system chambers of apheresis instruments after routine platelet collection: a new source of viable human blood cells. *Transfusion*. 2007;47(6):1042-1049.
7. Lemieux J, Jobin C, Simard C, Neron S. A global look into human T cell subsets before and after cryopreservation using multiparametric flow cytometry and two-dimensional visualization analysis. *J Immunol Methods*. 2016;434:73-82.
8. Pfeiffer IA, Zinser E, Strasser E, et al. Leukoreduction system chambers are an efficient, valid, and economic source of functional monocyte-derived dendritic cells and lymphocytes. *Immunobiology*. 2013;218(11):1392-1401.

9. Nordgren IK. Leukoreduction system chambers provide a valuable source of functional monocytes for the monocyte activation test by comparison with internationally validated methods. *J Immunol Methods*. 2016;428:42-49.
10. Peytour Y, Villacreces A, Chevaleyre J, Ivanovic Z, Praloran V. Discarded leukoreduction filters: a new source of stem cells for research, cell engineering and therapy? *Stem Cell Res*. 2013;11(2):736-742.
11. Rooney CM, Leen AM, Vera JF, Heslop HE. T lymphocytes targeting native receptors. *Immunol Rev*. 2014;257(1):39-55.
12. Yee C. The use of endogenous T cells for adoptive transfer. *Immunol Rev*. 2014;257(1):250-263.
13. Barrett DM, Singh N, Porter DL, Grupp SA, June CH. Chimeric antigen receptor therapy for cancer. *Annu Rev Med*. 2014;65:333-347.
14. Sadelain M, Riviere I, Riddell S. Therapeutic T cell engineering. *Nature*. 2017;545(7655):423-431.
15. Haque T, Wilkie GM, Jones MM, et al. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood*. 2007;110(4):1123-1131.
16. Barker JN, Doubrovina E, Sauter C, et al. Successful treatment of EBV-associated posttransplantation lymphoma after cord blood transplantation using third-party EBV-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood*. 2010;116(23):5045-5049.
17. Leen AM, Bollard CM, Mendizabal AM, et al. Multicenter study of banked third-party virus-specific T cells to treat severe viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2013;121(26):5113-5123.

18. Tzannou I, Papadopoulou A, Naik S, et al. Off-the-Shelf Virus-Specific T Cells to Treat BK Virus, Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol*. 2017;35(31):3547-3557.
19. Linden PK. History of solid organ transplantation and organ donation. *Crit Care Clin*. 2009;25(1):165-184, ix.
20. Chinen J, Buckley RH. Transplantation immunology: solid organ and bone marrow. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S324-335.
21. de la Morena MT, Gatti RA. A history of bone marrow transplantation. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2010;30(1):1-15.
22. Lamarche C, Orio J, Collette S, et al. Bk Polyomavirus and the Transplanted Kidney: Immunopathology and Therapeutic Approaches. *Transplantation*. 2016.
23. Breuer S, Rauch M, Matthes-Martin S, Lion T. Molecular diagnosis and management of viral infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Mol Diagn Ther*. 2012;16(2):63-77.
24. Aguilar C, Husain S, Lortholary O. Recent advances in understanding and managing infectious diseases in solid organ transplant recipients. *F1000Res*. 2018;7.
25. Bollard CM, Heslop HE. T cells for viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Blood*. 2016;127(26):3331-3340.
26. Withers B, Blyth E, Clancy LE, et al. Long-term control of recurrent or refractory viral infections after allogeneic HSCT with third-party virus-specific T cells. *Blood Adv*. 2017;1(24):2193-2205.

27. Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, et al. Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood*. 2010;115(5):925-935.
28. Bollard CM, Rooney CM, Heslop HE. T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(9):510-519.
29. Savoldo B, Goss JA, Hammer MM, et al. Treatment of solid organ transplant recipients with autologous Epstein Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs). *Blood*. 2006;108(9):2942-2949.
30. Feuchtinger T, Matthes-Martin S, Richard C, et al. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2006;134(1):64-76.
31. Comoli P, Labirio M, Basso S, et al. Infusion of autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood*. 2002;99(7):2592-2598.
32. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(10):671-684.
33. Crompton JG, Sukumar M, Restifo NP. Uncoupling T-cell expansion from effector differentiation in cell-based immunotherapy. *Immunol Rev*. 2014;257(1):264-276.
34. Robillard P, Delage G, Itaj NK, Goldman M. Use of hemovigilance data to evaluate the effectiveness of diversion and bacterial detection. *Transfusion*. 2011;51(7):1405-1411.

35. Bonnaure G, Gervais-St-Amour C, Neron S. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Enhance the Differentiation of Human Switched Memory B Lymphocytes into Plasma Cells in Serum-Free Medium. *J Immunol Res.* 2016;2016:7801781.
36. Gerdemann U, Keirnan JM, Katari UL, et al. Rapidly Generated Multivirus-specific Cytotoxic T Lymphocytes for the Prophylaxis and Treatment of Viral Infections. *Mol Ther.* 2012;20(8):1622-1632.
37. Orio J, Carli C, Janelle V, et al. Early exposure to interleukin-21 limits rapidly generated anti-Epstein-Barr virus T-cell line differentiation. *Cytotherapy.* 2015;17(4):496-508.
38. Janelle V, Carli C, Taillefer J, Orio J, Delisle JS. Defining novel parameters for the optimal priming and expansion of minor histocompatibility antigen-specific T cells in culture. *J Transl Med.* 2015;13:123.
39. Lamarche C, Orio J, Georges-Tobar V, et al. Clinical-Scale Rapid Autologous BK Virus-Specific T Cell Line Generation From Kidney Transplant Recipients With Active Viremia for Adoptive Immunotherapy. *Transplantation.* 2017;101(11):2713-2721.
40. Thibault L, Beausejour A, Jacques A, Ducas E, Tremblay M. Overnight storage of whole blood: cooling and transporting blood at room temperature under extreme temperature conditions. *Vox Sang.* 2014;106(2):127-136.
41. Zhao L, Shey M, Farnsworth M, Dailey MO. Regulation of membrane metalloproteolytic cleavage of L-selectin (CD62L) by the epidermal growth factor domain. *J Biol Chem.* 2001;276(33):30631-30640.
42. Zamora MR. DNA Viruses (CMV, EBV, and the Herpesviruses). *Semin Respir Crit Care Med.* 2011;32(4):454-470.

43. Teira P, Battiwalla M, Ramanathan M, et al. Early cytomegalovirus reactivation remains associated with increased transplant-related mortality in the current era: a CIBMTR analysis. *Blood*. 2016;127(20):2427-2438.
44. Papadopoulou A, Gerdemann U, Katari UL, et al. Activity of broad-spectrum T cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. *Sci Transl Med*. 2014;6(242):242ra283.
45. Neron S, Dussault N, Racine C. Whole-blood leukoreduction filters are a source for cryopreserved cells for phenotypic and functional investigations on peripheral blood lymphocytes. *Transfusion*. 2006;46(4):537-544.
46. Savoldo B, Cubbage ML, Durett AG, et al. Generation of EBV-specific CD4+ cytotoxic T cells from virus naive individuals. *J Immunol*. 2002;168(2):909-918.
47. Comoli P, Ginevri F, Maccario R, et al. Successful in vitro priming of EBV-specific CD8+ T cells endowed with strong cytotoxic function from T cells of EBV-seronegative children. *Am J Transplant*. 2006;6(9):2169-2176.
48. Hanley PJ, Cruz CR, Savoldo B, et al. Functionally active virus-specific T cells that target CMV, adenovirus, and EBV can be expanded from naive T-cell populations in cord blood and will target a range of viral epitopes. *Blood*. 2009;114(9):1958-1967.
49. Hanley PJ, Melenhorst JJ, Nikiforow S, et al. CMV-specific T cells generated from naive T cells recognize atypical epitopes and may be protective in vivo. *Sci Transl Med*. 2015;7(285):285ra263.
50. Isasi R, Mastronardi C, Golder M, et al. Assessing opportunities and challenges for establishing a national program to distribute cord blood for research. *Transfusion*. 2018;58(7):1726-1731.

Figure 1

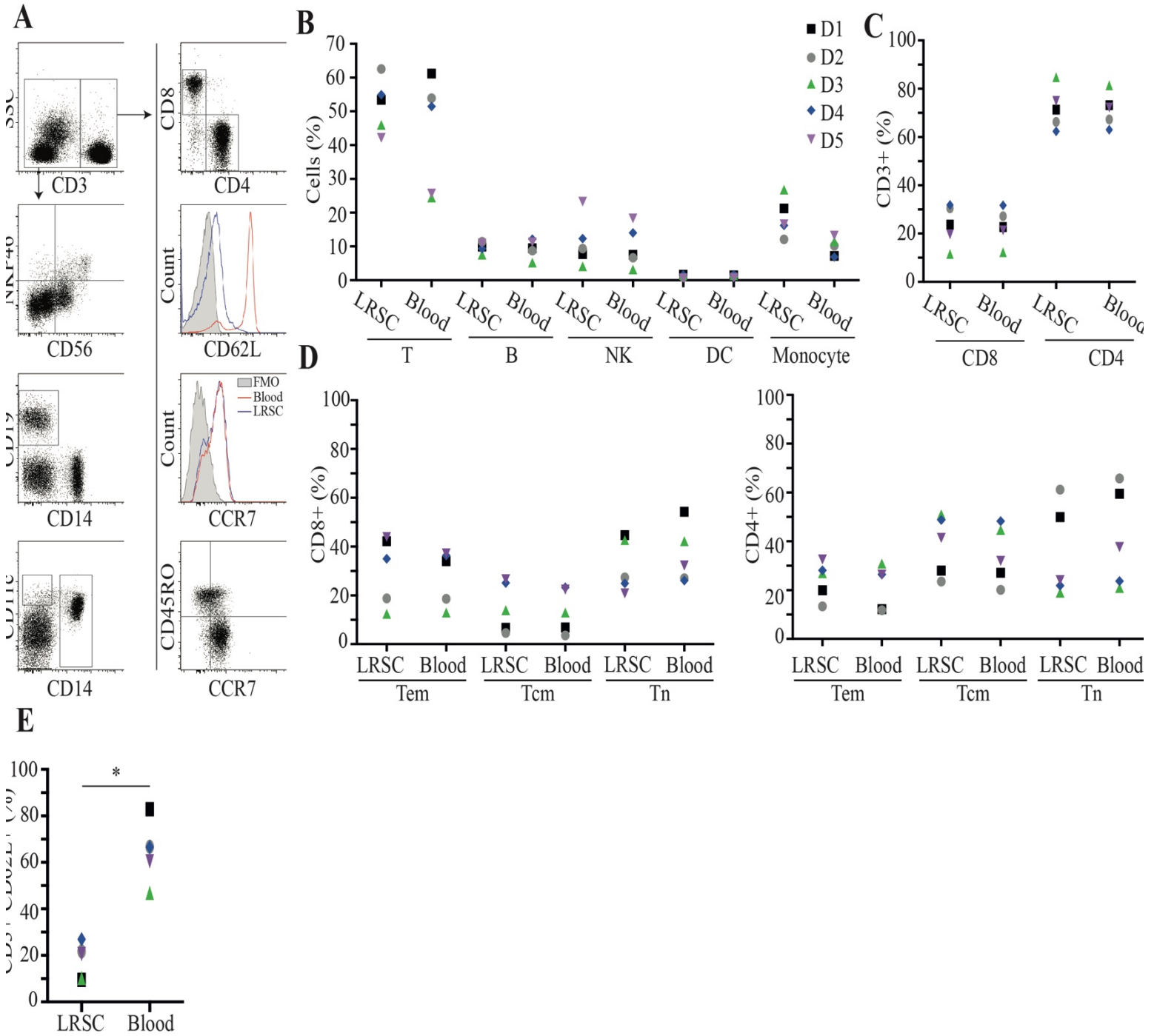


Figure 2

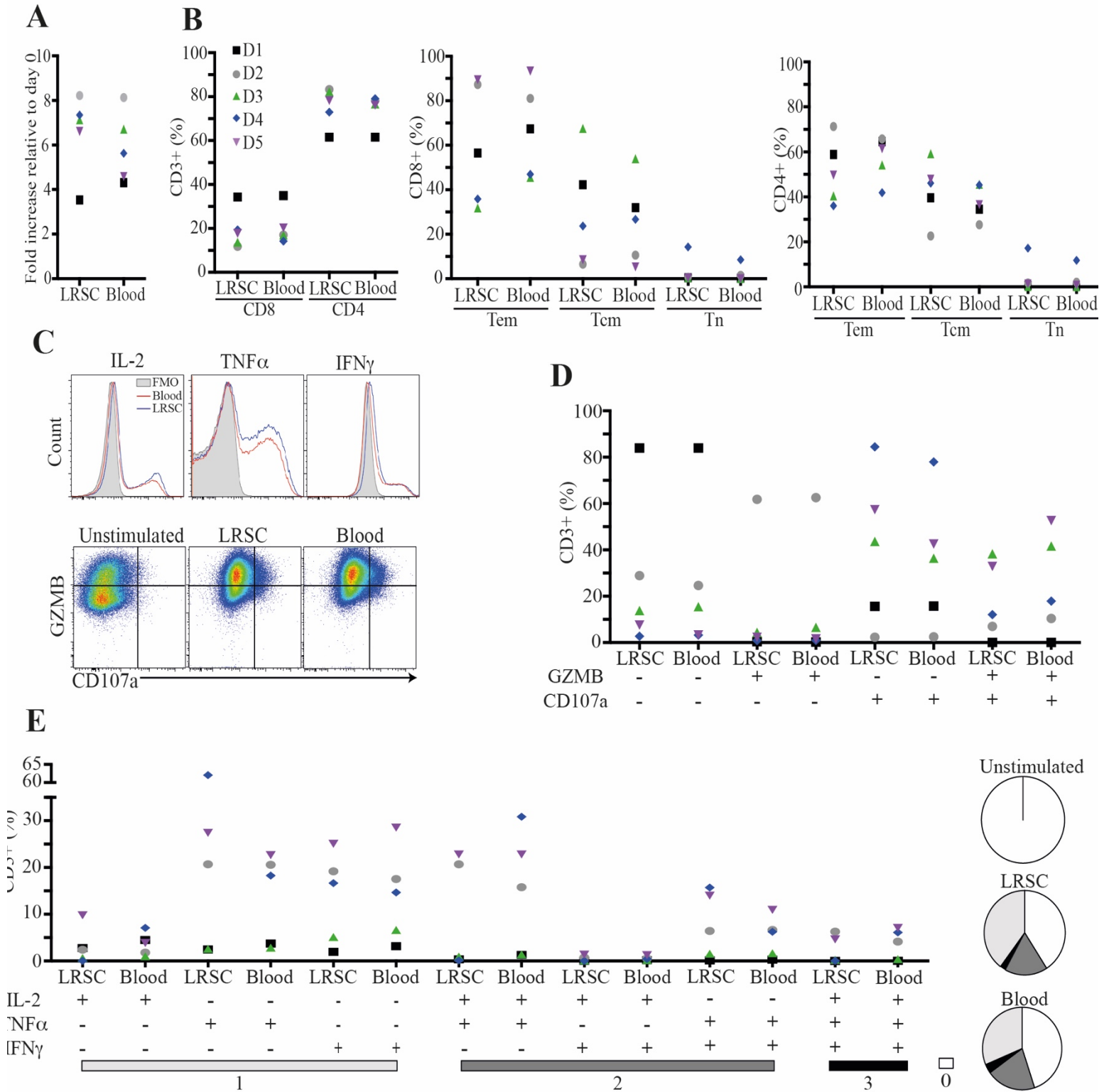


Figure 3

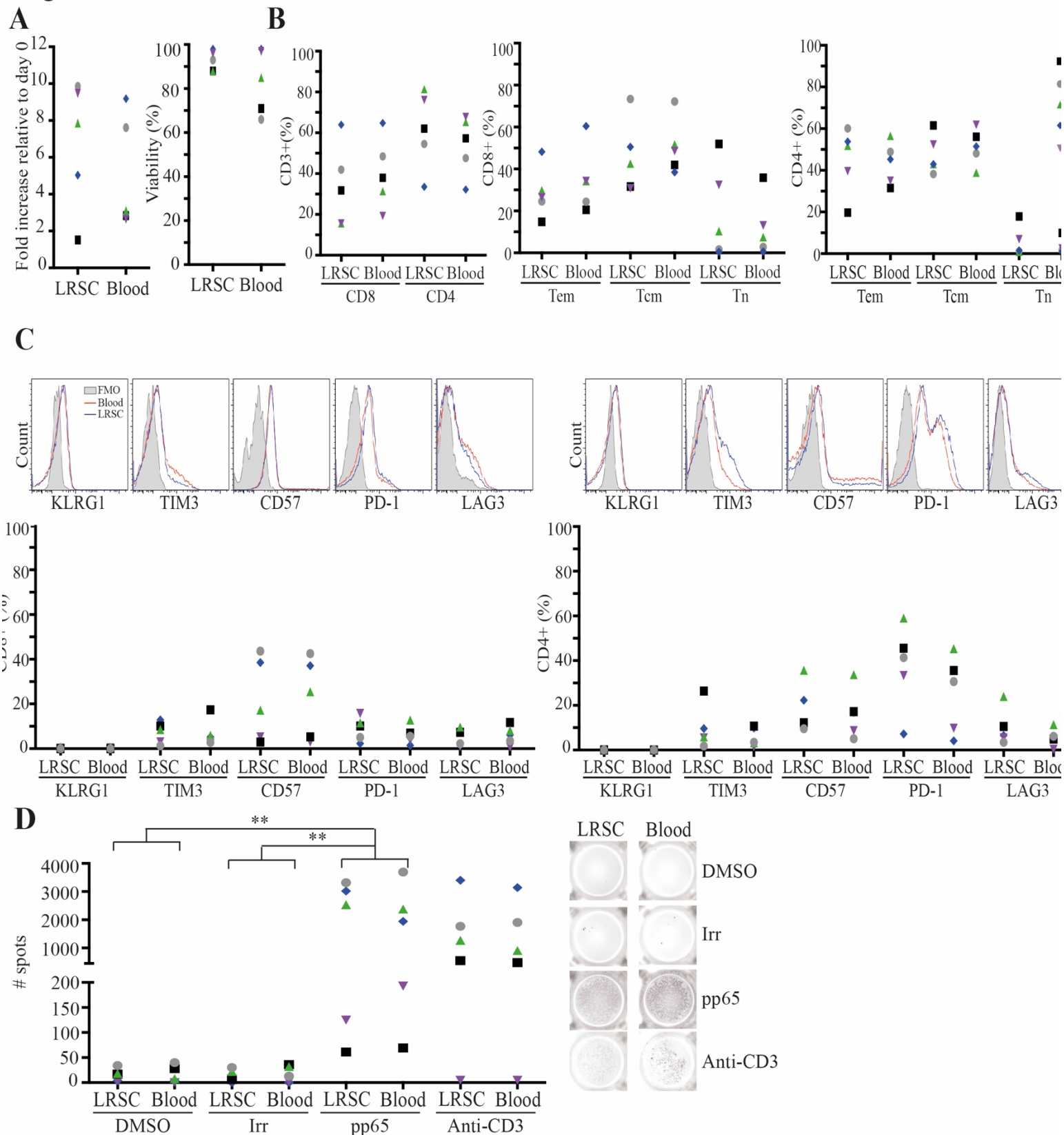


figure 4

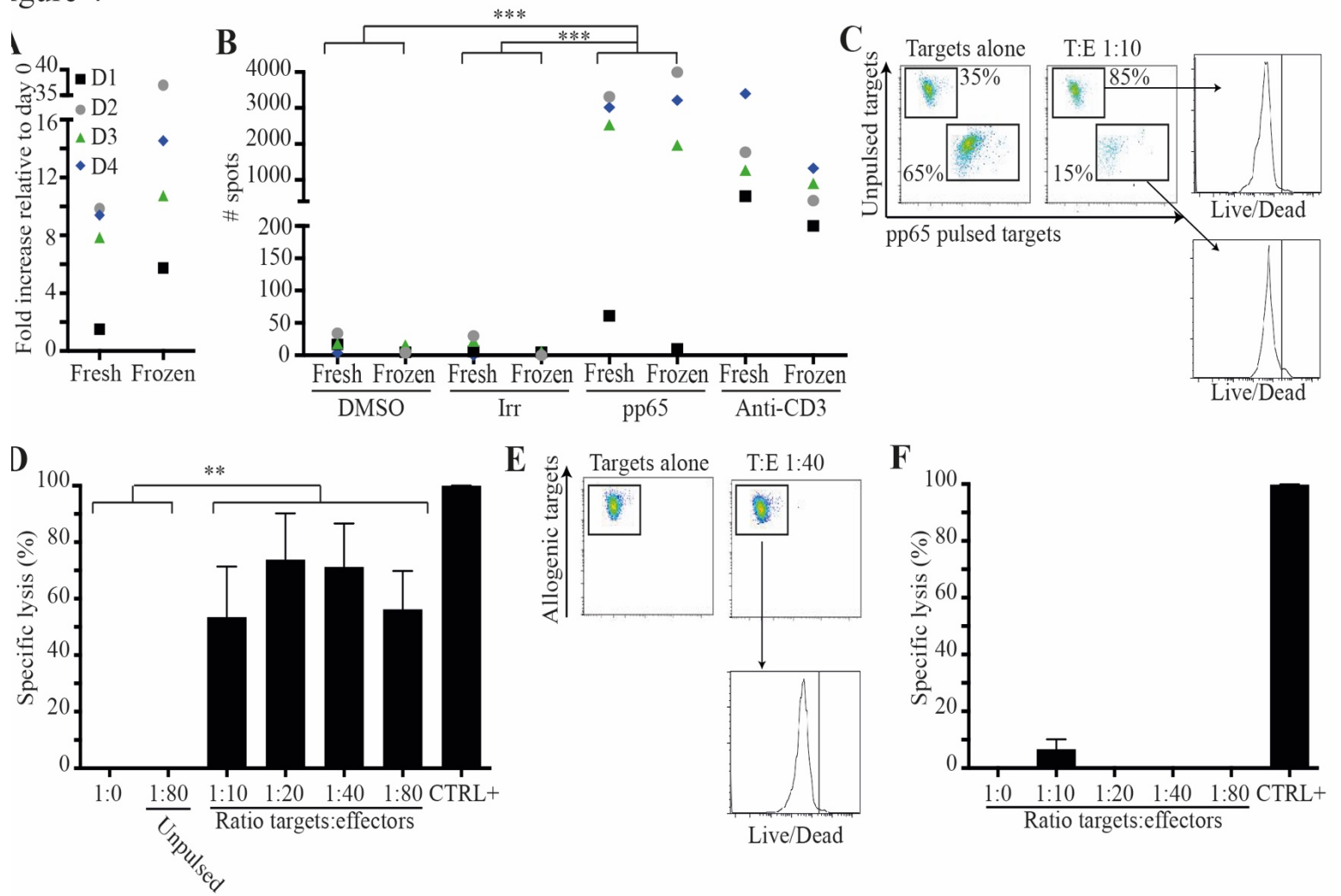
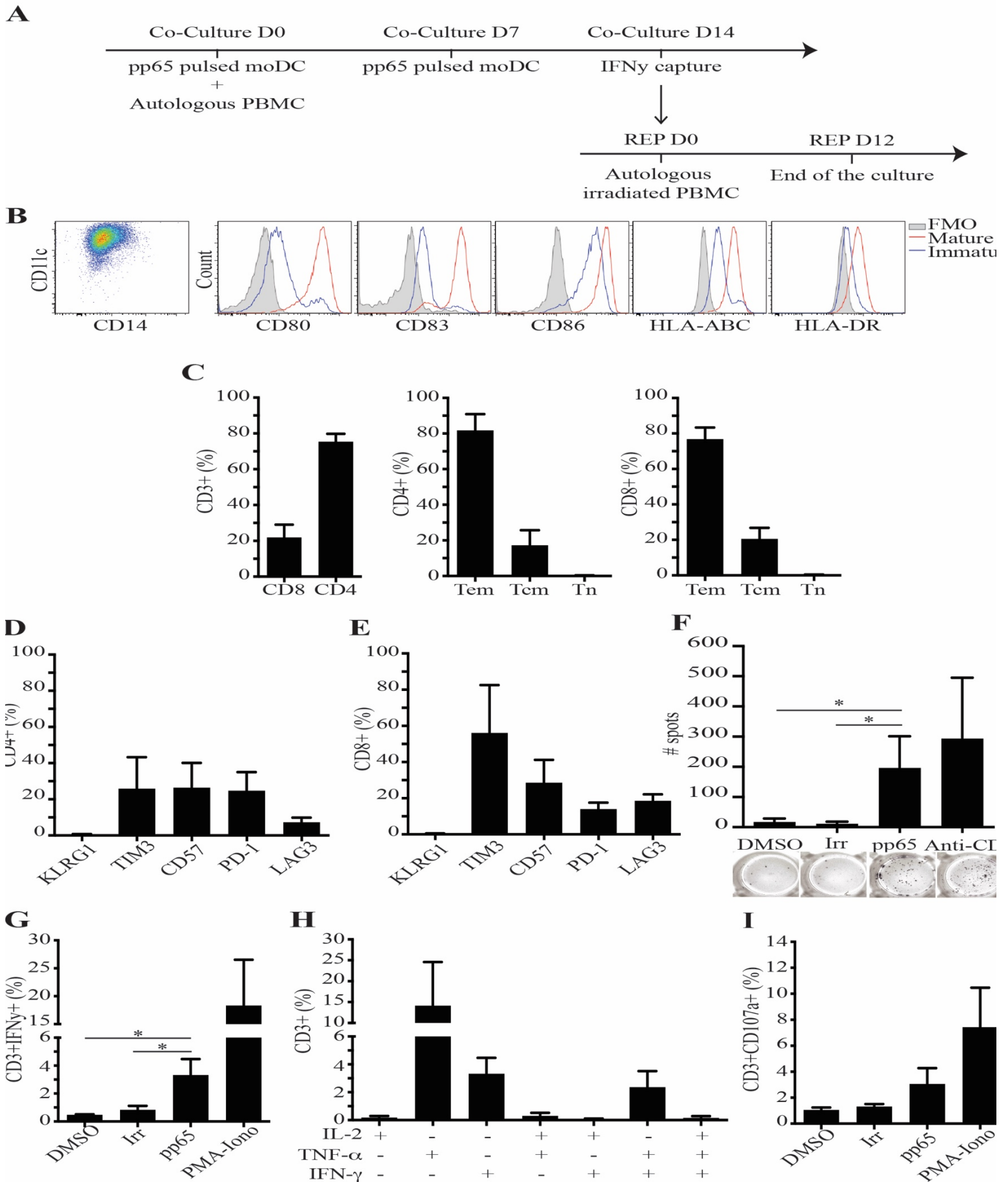


Figure 5



Discussion et Conclusion

7. Discussion et conclusions

Cet article répond directement à mes deux objectifs de maîtrise, c'est-à-dire de valider l'utilisation des LRSC et à l'aide d'un protocole adaptable à la clinique de stimuler des réponses antivirales à partir d'un répertoire naïf.

En effet, nous avons comparé les PBMC provenant de LRSC et de sang périphérique prélevé durant la même procédure. Il y a une très forte concordance entre les principales sous-populations mononucléaires et entre les stades de différenciation des sous-populations de lymphocytes T CD4 et CD8. Il est à noter que l'état de différenciation de ces lymphocytes T frais n'a pu être défini en se basant sur l'expression du CD62L puisqu'il était considérablement réduit sur les cellules provenant des LRSC. Notre hypothèse est que, lors de l'extraction des PBMC des LRSC, il y a soit activation des protéases ou encore un stress mécanique qui induit le clivage de ce marqueur. La perte d'expression du CD62L est transitoire et n'a aucun impact sur la fonction, l'expansion et le phénotype des cellules. En effet, les PBMC des LRSC et du sang périphérique étaient remarquablement similaires suite à une stimulation avec des anticorps anti-CD3/CD28 ou des peptides viraux. Nos expansions de lymphocytes T ont atteints des niveaux cliniquement pertinents, présentent une réactivité restreinte aux virus et une minorité de cellules mémoires expriment des marqueurs d'épuisement ou de différenciation terminale. Nous avons également démontré que les PBMC extraits des LRSC peuvent être utilisés comme source de moDC ou de lymphocytes T immédiatement après la collecte ou bien ultérieurement lorsque cryopréservés. Finalement, cet article soutient l'utilisation de LRSC en tant que source de PBMC pour l'élaboration de protocoles de transfert adoptif de lymphocytes T virus-spécifiques générés à partir d'un répertoire naïf et mémoire.

7.1 Défi en immunothérapie adoptive antivirale

L'utilisation de l'immunothérapie adoptive antivirale à grande échelle est limitée par le temps nécessaire pour générer les cellules adéquates pour l'infusion, la logistique, la disponibilité, et sa nature personnalisée.

Il faut généralement de deux à six semaines pour générer une lignée de lymphocytes T pathogène spécifiques. Idéalement, il faudrait donc anticiper la production pour tous les patients avant même la transplantation et ce, sans même savoir si le patient va réactiver le virus en question.

En immunothérapie adoptive, la source de cellules peut être soit autologue (provenant du receveur), allogénique (provenant du donneur) ou encore tierce partie (provenant ni du donneur ni du receveur). Cette source doit être adaptée au contexte clinique. Dans le cas de TOS, il est rarement possible d'utiliser une source allogénique puisque le donneur d'organe est habituellement non disponible tandis que dans le d'ATCH. Une source allogénique est appropriée puisque le système immunitaire du patient est remplacé par celui de son donneur, évitant ainsi le rejet des cellules infusées.

Dans les deux contextes, une tierce partie peut être une excellente alternative. Il faut évidemment s'assurer que les HLA soient les plus compatibles possible avec le receveur, pour éviter les complications liées au rejet et surtout favoriser une reconnaissance des antigènes viraux dans le contexte d'une molécule HLA partagée entre les lymphocytes T et les cellules infectées. Plusieurs études ont démontré que leur utilisation en immunothérapie est associée avec très bonne réponse à long terme et à peu de toxicité.¹⁸⁴⁻¹⁹²

Un autre problème important dans le développement de nouveaux protocoles d'immunothérapie adoptive antivirale est la quantité colossale de cellules nécessaires particulièrement lorsque le répertoire est naïf. Les cellules sont normalement isolées soit du sang périphérique ou de leucophères de donneurs sains. Toutefois, les donneurs sont une source limitée et ce ne sont pas toutes les agences de sang qui offrent des leucophères.

Une barrière logistique importante à l'utilisation de l'immunothérapie adoptive à large échelle est la nécessité d'avoir des établissements spécialisés en thérapie cellulaire. Il est difficile d'obtenir l'autorisation de produire des lignées de grade clinique par les instances de régulations officielles. Au Canada, il n'y a que deux centres accrédités par la « Foundation for the accreditation of cellular therapy » pour la production de produits cellulaires plus que minimalement manipulés (« *more than minimally manipulated* ») : le Centre d'Excellence en Thérapie Cellulaire de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont et le « Manitoba Blood and marrow Transplant Program ».

Le coût de production est également très important. Toutefois, à long terme, une fois le coût de l'établissement absorbé, le coût de cette thérapie est comparable aux antiviraux pharmacologiques.¹⁹³

Tous ces obstacles et la charge de travail considérable peu compatible avec les structures de thérapie cellulaire actuellement en place font en sorte que l'immunothérapie cellulaire reste un traitement marginalement utilisé.

7.2 Création d'une banque tierce partie

La mise en place d'une banque de lignées tierce partie pour usage immédiat permettrait de rendre plus accessible l'immunothérapie adoptive antivirale. La quantité de cellules contenues par LRSC (en moyenne $1,3 \pm 0,6$ milliard de PBMC) et la possibilité d'utiliser une série de donneurs réguliers de plaquettes bien caractérisées (typages HLA, statut sérologique pour les agents pathogènes latents communs et soumis aux tests de dépistage de maladies transmissibles etc.) constituent une source idéale de cellules pour la création éventuelle d'une telle banque.

Cette banque permettrait de mettre à la disposition de tous les patients des lignées préparées à partir des LRSC, cryopréservées et sélectionnées sur la base d'une compatibilité HLA. L'efficacité et la sécurité de ces lignées pré-validées permettraient le traitement de complications virales et ouvrirait la possibilité d'une administration en prophylaxie

Il sera alors possible de distribuer entre autres via les réseaux déjà établis des agences de sang, aux hôpitaux sans les ressources nécessaires, des lignées virus-spécifiques cryopréservées prêtes à l'usage. Le tout réduirait le coût et les difficultés associés à la personnalisation de ces thérapies. Le repositionnement des LRCS représente assurément une opportunité pour les chercheurs et les cliniciens de valoriser les dons de sang en maximisant les avantages potentiels de chaque procédure de leucodéplétion.

7.3 Génération de lignées à partir d'un répertoire naïf

Cet article nous a également permis de répondre au deuxième objectif de ma maîtrise, c'est-à-dire de développer un protocole adaptable à la clinique à partir d'un répertoire naïf. Plusieurs

ont réussi à manipuler les cellules *ex vivo* afin de leur conférer cette immunité mémoire à l'aide de protocoles plus élaborés que ceux normalement utilisés pour les répertoires mémoires.¹⁹⁴⁻¹⁹⁷

7.3.1 Choix du virus

Nous avons développé un protocole inspiré d'un protocole établi au préalable par le laboratoire du Dr Delisle, pour stimuler un répertoire naïf avec une librairie de peptides virales. Nous avons choisi d'utiliser le CMV puisqu'encore aujourd'hui, il est un problème médicale important affectant particulièrement les receveurs de TOS ou ATCH.^{198,199} Le statut sérologique du CMV des donneurs de plaquettes à Héma-Québec est connu, ce qui nous permet de générer des lignées à partir de répertoires mémoires et naïfs. De plus, l'immunothérapie adoptive antivirale à partir de donneur tierce partie est une stratégie prometteuse à ce titre, les agences de sang pourrait être intéresser au développement d'une banque de produit lymphocytaire tierce partie.^{189,190} Nous avons choisi la phosphoprotéine de 65 kDa (pp65), car elle est très immunogène. Cette protéine qui représente 95% du tégument joue rôle important dans la régulation des gènes viraux et la modification du métabolisme cellulaire. Elle est retrouvée dans le noyau cellulaire immédiatement après l'infection par CMV et elle est associée à la matrice nucléaire dans les stades tardifs de la réplication.^{200,201}

7.3.2 Activation d'un répertoire naïf

L'activation de lymphocytes T naïfs est beaucoup plus difficile que ceux mémoire, puisqu'ils ont besoin de signaux plus forts, ils sont dépendants des signaux de costimulation, leur chromatine est non permissive pour les gènes associés aux fonctions effectrices et ils sont en phase quiescente. Nous avons donc utilisé une combinaison de cytokines connues pour favoriser l'activation et augmenter la survie des lymphocytes T pathogène spécifiques.^{202,203} L'IL-12 a

été utilisée durant la première semaine de culture puisqu'elle promeut l'activation des lymphocytes T CD8 naïfs.^{204,205} L'IL-21 prévient l'apoptose et la différenciation terminale.²⁰⁶ Elle agit également en synergie avec l'IL-7 ce qui augmente la prolifération et les fonctions effectrices des lymphocytes T cytotoxique.^{207,208} L'IL-21 augmente également l'expansion des cellules répondant à la stimulation de l'antigène lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec l'IL-15. L'IL-15, l'IL-2 et l'IL-7 sont généralement considérées comme des régulateurs de l'homéostasies des lymphocytes T, car elles contrôlent le maintien des populations de lymphocytes T naïfs et mémoires.²⁰⁷

L'ajout de stimulation à l'aide de cellules dendritiques dérivées de monocytes autologues comme cellules présentatrices d'antigènes, nous a permis d'obtenir une expansion cellulaire et un statut de différenciation adaptable pour les exigences cliniques. Cependant pour d'obtenir une réactivité spécifique et d'éliminer l'alloréactivité une sélection des lymphocytes T est nécessaire.

7.3.3 Enrichissement des lymphocytes T pathogène spécifiques

Nous avons donc fait un enrichissement par sélection immunomagnétique réalisée grâce à des colonnes positionnées dans un champ magnétique. En fait, suite à une stimulation antigénique avec la librairie de pp65, les lymphocytes T spécifiques vont sécréter de l'IFN γ . Le réactif de capture d'IFN γ s'attache à la surface de ces cellules. L'ajout d'un anticorps anti-IFN γ couplé à un fluorochrome et d'un anticorps secondaire anti-fluorochrome couplée à une bille magnétique va permettre l'enrichissement des lymphocytes T pp65 spécifiques.

7.3.4 Technique alternative d'enrichissement

Une méthode alternative classique pour enrichir des lymphocytes T est le tri via des tétramères par cytométrie en flux. Les tétramères CMH, des oligomères de quatre sous-unités de CMH, permettent de détecter directement les lymphocytes T antigène spécifiques. Par cytométrie en flux, les lymphocytes T antigène spécifiques préalablement incubés avec les tétramères couplés à un fluorochrome sont détectés. Toutefois, les tétramères sont restreints à des HLA précis. La majorité des tétramères disponibles correspondent au HLA-A*0201. De plus, il est connu que les tétramères activent la voie du TCR, ce qui pourrait avoir des effets néfastes sur la qualité des lignées obtenues. Dans le contexte d'une librairie de peptides, il faudrait alors un tétramère pour chacun des antigènes potentiels, soit de 138 pour la librairie pp65. Outre le coût onéreux, l'ensemble de ces tétramères n'est pas disponible ou bien la fréquence des lymphocytes T réactifs serait trop faible pour être détectée.

Une autre alternative serait une sélection par cytométrie en flux en se basant sur les marqueurs de surface tels que le CD137 et le CD40L. Le CD137 et le CD40L sont des récepteurs de costimulation de la famille du TNF exprimée par les lymphocytes T activés principalement et respectivement par les CD8 et les CD4. Cependant, ce type de sélection ne permettrait pas de s'assurer que les lymphocytes T soient pathogène spécifiques. Pour ce faire, il faudrait faire un marquage intracellulaire qui ciblerait l'IFN γ par exemple, ce qui implique la fixation (liaison covalente de toutes les molécules cellulaires qui se trouvent rapprochées les unes des autres) des cellules. Évidemment, la fixation des cellules empêche de les remettre en culture et certainement de les injecter à un patient.

De plus, nous avons choisi la sélection immunomagnétique, car contrairement à un tri par cytométrie en flux, elle est déjà approuvée par Santé-Canada dans le contexte clinique. Le tout permettant donc la translation plus simple en clinique.

7.3.5 Différenciation et épuisement des lignées de lymphocytes T

Puisque le nombre de cellules ainsi triées est extrêmement faible (entre $0,2 \cdot 10^6$ et $0,04 \cdot 10^6$ cellules), nous avons utilisé un protocole rapide d'expansion dans le but d'obtenir un nombre suffisant de lymphocyte T pour au moins une dose de thérapie cellulaire (entre $40 \cdot 10^6$ et $80 \cdot 10^6$ cellules). Dans le contexte de la thérapie cellulaire, la différenciation et l'absence de l'épuisement des lymphocytes T a un rôle clé dans le succès du contrôle du pathogène. Il est primordial d'avoir une balance entre les Tem et Tcm, afin d'obtenir une réponse optimale et une survie à long terme des cellules infusées chez le patient. Même dans les lignées générées à partir d'un répertoire naïf et donc ayant reçu à plusieurs reprises des stimulations et dont la culture *ex vivo* est beaucoup plus longue que celle à partir d'un répertoire mémoire, il y a une balance entre les Tcm et Tem et très peu de cellules expriment des marqueurs d'épuisements.

7.3.6 Amélioration

Des améliorations au protocole pourrait être faites puisqu'il subsiste encore de l'alloréactivité détectable à la fin de certaines cultures. Le test de cytotoxicité qui permet d'évaluer cette alloréactivité est fait par cytométrie en flux. D'abord, des PBMC autologues et allogéniques (au moins 3 sur 4 allèles de différentes) sont activées avec de la PHA, afin d'acquérir la capacité de présenter des antigènes. Ces PHA blasts exprimant le CMH I et II ainsi que le CD80 et CD86 sont alors marquées de différentes couleurs. La moitié des PHA blasts autologues sont pulsé

avec la librairie de pp65. Les deux types de cibles sont incubés à différents ratio avec de lignée de lymphocytes T pathogène spécifiques, avant être analysé par cytométrie en flux.

Les causes exactes de l'alloréactivité observée ne sont pas connues. Toutefois, il est possible qu'à la fin de la culture les cellules soient trop réactives. En effet, les lignées de lymphocytes T pp65 spécifiques lysent parfois les cibles autologues non pulsées (données non-montrées). Pour s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un effet «bystander » ou encore que les peptides soient transférés des cellules chargées à la surface des cellules non chargées (par diffusion passive), il faudrait faire le test de cytotoxicité en séparant les cibles autologues pulsées et non pulsées.

Il existe diverses techniques permettant l'élimination de cellules alloréactives dont l'efficacité est relative. Parmi celles-ci, il y a la déplétion avec des billes immunomagnétiques ou des immunotoxines spécifiques contre des marqueurs d'activation (CD25, CD69, CD71) ou encore le tri des cellules non-activées ou non-prolifératives en utilisant des techniques de dilution de colorant. ²⁰⁹⁻²¹⁴

Une technique prometteuse pour éliminer l'alloréactivité qui pourrait être conjuguer notre stratégie thérapeutique est la photodéplétion. ²¹⁵ Brièvement, cette technique repose sur l'incubation d'une molécule photosensible qui pénètre préférentiellement dans les cellules activées. Ensuite, il suffit d'exposer les cellules à une lumière UV, les cellules contenant la molécule photosensible sont ainsi éliminées. Cette technique a déjà prouvé son efficacité dans le cadre d'une étude préclinique de ATCH pour limiter la GVHD. Ainsi, il serait alors possible de, soit photodépléter tous les PBMC avant le protocole de stimulation de répertoire naïf, soit uniquement dans les lignées générées qui présentent de l'alloréactivité résiduelle à la fin de la

culture. Il suffirait alors de stimuler les PBMC ou lignées générées avec les CPA du patient en présence de la molécule photosensible.

7.4 Conclusion et perspectives

En résumé, nous avons d'une part démontrée que les chambres LRSC sont une source équivalente à celle du sang périphérique pour la génération de produit T en thérapie cellulaire et, d'autre part, valider un protocole permettant de générer des lignées de lymphocyte T à partir d'un répertoire mémoire et naïf. Les LRSC sont une excellente opportunité pour les recherches faites à partir de PBMC.

Dans le contexte de la thérapie cellulaire, les LRSC pourraient permettre la génération de lignées éduquées pour éliminer d'autres virus (Adénovirus, EBV, BK virus, varicelle etc.) ou diverses tumeurs. La modification génétique des lymphocytes T est depuis plusieurs années en émergence et, à cette fin, les LRSC seraient une source de cellules idéales. Ces modifications génétiques visent principalement quatre aspects des lymphocytes T : l'épuisement, la survie, l'activation et l'efficacité.

Afin de contrer l'épuisement des lignées, il est envisageable de les modifier génétiquement pour diminuer ou supprimer l'expression de divers récepteurs inhibiteurs seuls ou en combinaison. Pour ce faire, le domaine extracellulaire et transmembranaire inhibiteur (PD-1, TIM3, LAG3, etc.) peut être relié à un domaine cytoplasmique activateur (CD38, CD28, etc.).

L'activation optimale des lignées générées est un facteur essentiel à leur efficacité pour le contrôle de la croissance tumorale ou de la charge virale. Des études ont déjà démontré que la modification génétique de ces lignées pour les faire produire diverses cytokines telle que l'IL-2, l'IL-15 augmente leur survie et prolifération. Cependant, la surexpression d'IL-12 permet certes d'augmenter leur activation mais induit une mort précoce de ces cellules.

La transduction rétrovirale de molécules anti-apoptotiques telle que bcl-xl semble être une stratégie intéressante pour augmenter la survie à long terme des lignées y compris lorsqu'elles se trouvent dans un environnement favorisant la mort cellulaire.²¹⁶ Il a été démontré que l'augmentation de la signalisation de la voie de l'IL-2 via l'expression transgénique d'IL-2 conduit à une augmentation de l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 favorisant la survie cellulaire.^{217,218}

L'une des dernières révolutions dans le traitement des cancers consiste en la modification génétique de lymphocytes T pour qu'elles expriment un récepteur T spécifique ou encore un récepteur antigénique chimérique (CAR), ce qui permet de leur apporter une spécificité d'antigène exprimé par une tumeur ou un virus particulier.²¹⁹⁻²²¹ Plusieurs générations de CAR ont permis d'augmenter leur efficacité et diminuer les risques qui leur sont associés.²²²⁻²²⁴ Notamment, l'une des dernières générations, les SUPRA CAR, permet une fine régulation de leur activation, évitant ainsi toute toxicité.²²⁵ Ils sont aussi particulièrement intéressants car chaque SUPRA CAR pourrait répondre à une multitude d'antigènes.

Bibliographie

1. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. *Science* **327**, 291–295 (2010).
2. Palm, N. W. & Medzhitov, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **227**, 221–233 (2009).
3. Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G. & Long, E. O. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol. Rev.* **214**, 73–91 (2006).
4. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Philadelphia, S. P., p, U.2009. *Cellular and Molecular Immunology. 7/E Elseiver Saunders.* doi:10.1016/B978-1-4160-3123-9.50003-6
5. Blum, J. S., Wearsch, P. A. & Cresswell, P. Pathways of Antigen Processing. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 443–473 (2013).
6. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology* **13**, 227–242 (2013).
7. Wieczorek, M. *et al.* Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front. Immunol.* **8**, 292 (2017).
8. Horton, R. *et al.* Gene map of the extended human MHC. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 889–899 (2004).

9. Barker, J. N. *et al.* Serious Infections after Unrelated Donor Transplantation in 136 Children: Impact of Stem Cell Source. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **11**, 362–370 (2005).
10. Vandebosch, K. *et al.* Varicella-zoster virus disease is more frequent after cord blood than after bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **14**, 867–871 (2008).
11. Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B. & Lawrence, T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J.* **33**, e201488027–1116 (2014).
12. Owen, J. A., Punt, J. & Stranford, S. A. *Kuby immunology.* (2013).
13. Sun, J. C., Williams, M. A. & Bevan, M. J. CD4⁺ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8⁺ T cells after acute infection. *Nature Immunology* **5**, 927–933 (2004).
14. Janssen, E. M. *et al.* CD4⁺ T-cell help controls CD8⁺ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* **434**, 88–93 (2005).
15. Shedlock, D. J. Requirement for CD4 T Cell Help in Generating Functional CD8 T Cell Memory. *Science* **300**, 337–339 (2003).
16. Borst, J., Ahrends, T., Bąbała, N., Melief, C. J. M. & Kastenmüller, W. CD4⁺ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* **18**, 635–647 (2018).
17. Provine, N. M. *et al.* Immediate Dysfunction of Vaccine-Elicited CD8⁺ T Cells Primed in the Absence of CD4⁺ T Cells. *J Immunol* **197**, 1809–1822 (2016).

18. Greyer, M. *et al.* T Cell Help Amplifies Innate Signals in CD8⁺ DCs for Optimal CD8⁺ T Cell Priming. *Cell Rep* **14**, 586–597 (2016).
19. Wilson, E. B. & Livingstone, A. M. Cutting edge: CD4⁺ T cell-derived IL-2 is essential for help-dependent primary CD8⁺ T cell responses. *J Immunol* **181**, 7445–7448 (2008).
20. Janssen, E. M. *et al.* CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* **421**, 852–856 (2003).
21. Kumamoto, Y., Mattei, L. M., the, S. S. P. O.2011. CD4⁺ T cells support cytotoxic T lymphocyte priming by controlling lymph node input. *National Acad Sciences* 2014.11.032
22. Bedoui, S., Heath, W. R., reviews, S. M. I.2016. CD4⁺ T- cell help amplifies innate signals for primary CD8⁺ T- cell immunity. *Wiley Online Library*
23. Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition* (Garland Science, 2001).
24. Ettinger, R., Kuchen, S. & Lipsky, P. E. The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease. *Immunol. Rev.* **223**, 60–86 (2008).
25. Kuchen, S. *et al.* Essential Role of IL-21 in B Cell Activation, Expansion, and Plasma Cell Generation during CD4⁺ T Cell-B Cell Collaboration. *J Immunol* **179**, 5886–5896 (2007).

26. Weant, A. E., Michalek, R. D., Khan, I. U., Immunity, B. H. 2008. Apoptosis regulators Bim and Fas function concurrently to control autoimmunity and CD8+ T cell contraction. *Elsevier* 2007.12.014
27. Schmaltz, C. *et al.* Differential use of Fas ligand and perforin cytotoxic pathways by donor T cells in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. *Blood* **97**, 2886–2895 (2001).
28. Golstein, P. & Griffiths, G. M. An early history of T cell-mediated cytotoxicity. *Nature Reviews Immunology* **18**, 527–535 (2018).
29. Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. & Trapani, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology* **15**, 388–400 (2015).
30. Metkar, S. S. *et al.* Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* **16**, 417–428 (2002).
31. Thiery, J. *et al.* Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood* **115**, 1582–1593 (2010).
32. Vassalli, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 411–452 (1992).
33. Huang, S. *et al.* Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* **259**, 1742–1745 (1993).
34. Kurd, N. & Robey, E. A. T- cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. *Immunol. Rev.* **271**, 114–126 (2016).

35. Baxter, A. G. & Hodgkin, P. D. Activation rules: the two-signal theories of immune activation. *Nature Reviews Immunology* **2**, 439 (2002).
36. Lafferty, K. J. & Woolnough, J. The origin and mechanism of the allograft reaction. *Immunol. Rev.* **35**, 231–262 (1977).
37. Mueller, D. L., Jenkins, M. K. & Schwartz, R. H. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 445–480 (1989).
38. Schwartz, R. H. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 305–334 (2003).
39. Curtsinger, J. M. *et al.* Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol* **162**, 3256–3262 (1999).
40. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. **22**, 333–340 (2010).
41. Curtsinger, J. M., Valenzuela, J. O., Agarwal, P., Lins, D. & Mescher, M. F. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* **174**, 4465–4469 (2005).
42. Valenzuela, J., Schmidt, C. & Mescher, M. The roles of IL-12 in providing a third signal for clonal expansion of naive CD8 T cells. *J Immunol* **169**, 6842–6849 (2002).
43. Schmidt, C. S. & Mescher, M. F. Peptide antigen priming of naive, but not memory, CD8 T cells requires a third signal that can be provided by IL-12. *J Immunol* **168**, 5521–5529 (2002).
44. Keppler, S. J., Theil, K., Vucikujja, S. & Aichele, P. Effector T-cell differentiation during viral and bacterial infections: Role of direct IL-12 signals for cell fate

- decision of CD8(+) T cells. *European Journal of Immunology* **39**, 1774–1783 (2009).
45. Cox, M. A., Harrington, L. E. & Zajac, A. J. Cytokines and the inception of CD8 T cell responses. *Trends Immunol.* **32**, 180–186 (2011).
 46. Richer, M. J., Nolz, J. C. & Harty, J. T. Pathogen-specific inflammatory milieu tune the antigen sensitivity of CD8(+) T cells by enhancing T cell receptor signaling. *Immunity* **38**, 140–152 (2013).
 47. Vignali, D. A. A. & Kuchroo, V. K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Publishing Group* **13**, 722–728 (2012).
 48. González-Navajas, J. M., Lee, J., David, M. & Raz, E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature Reviews Immunology* **12**, 125 (2012).
 49. Feau, S., Arens, R., Togher, S. & Schoenberger, S. P. Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8(+) memory T cells. *Nature Publishing Group* **12**, 908–913 (2011).
 50. Cui, W., Joshi, N. S., Jiang, A. & Kaech, S. M. Effects of Signal 3 during CD8 T cell priming: Bystander production of IL-12 enhances effector T cell expansion but promotes terminal differentiation. *Vaccine* **27**, 2177–2187 (2009).
 51. Joshi, N. S. *et al.* Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8+ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity* **27**, 281–295 (2007).
 52. Wiegering, V. *et al.* Varicella-zoster virus infections in immunocompromised patients - a single centre 6-years analysis. *BMC Pediatrics* *2011 11:1* **11**, 31 (2011).

53. Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR) *et al.* Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. in **44**, 453–558 (2009).
54. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–712 (1999).
55. van den Broek, T., Borghans, J. A. M. & van Wijk, F. The full spectrum of human naive T cells. *Nature Reviews Immunology* **18**, 363–373 (2018).
56. Beverley, P. C. Functional analysis of human T cell subsets defined by CD45 isoform expression. *Semin. Immunol.* **4**, 35–41 (1992).
57. Gattinoni, L., Klebanoff, C. A. & Restifo, N. P. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer* **12**, 671–684 (2012).
58. Curtsinger, J. M., Lins, D. C. & Mescher, M. F. CD8⁺ Memory T Cells (CD44^{high}, Ly-6C⁺) Are More Sensitive than Naive Cells (CD44^{low}, Ly-6C⁻) to TCR/CD8 Signaling in Response to Antigen. *J Immunol* **160**, 3236–3243 (1998).
59. Wherry, E. J. *et al.* Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature Immunology* **4**, 225–234 (2003).
60. Cho, B. K., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H. N. & Chen, J. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 2976–2981 (1999).
61. Sanders, M. E. *et al.* Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2, and LFA-1) and three other molecules

- (UCHL1, CDw29, and Pgp-1) and have enhanced IFN-gamma production. *J Immunol* **140**, 1401–1407 (1988).
62. Mackay, C. R., Marston, W. L. & Dudler, L. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *Journal of Experimental Medicine* **171**, 801–817 (1990).
63. Buckle, A. M. & Hogg, N. Human memory T cells express intercellular adhesion molecule-1 which can be increased by interleukin 2 and interferon-gamma. *European Journal of Immunology* **20**, 337–341 (1990).
64. Garcia, S., DiSanto, J. & Stockinger, B. Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation. *Immunity* **11**, 163–171 (1999).
65. Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A. & Rocha, B. Response of naïve and memory CD8⁺ T cells to antigen stimulation *in vivo*. *Nature Publishing Group* **1**, 47–53 (2000).
66. Croft, M., Bradley, L. M. & Swain, S. L. Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol* **152**, 2675–2685 (1994).
67. Inaba, K., Metlay, J. P., Crowley, M. T., Witmer-Pack, M. & Steinman, R. M. Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int. Rev. Immunol.* **6**, 197–206 (1990).

68. Zimmermann, C., Prévost-Blondel, A., Blaser, C. & Pircher, H. Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences. *European Journal of Immunology* **29**, 284–290 (1999).
69. Bachmann, M. F., Barner, M., Viola, A. & Kopf, M. Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *European Journal of Immunology* **29**, 291–299 (1999).
70. Beadling, C. & Slifka, M. K. Differential regulation of virus-specific T-cell effector functions following activation by peptide or innate cytokines. *Blood* **105**, 1179–1186 (2005).
71. Rogers, P. R., Dubey, C. & Swain, S. L. Qualitative Changes Accompany Memory T Cell Generation: Faster, More Effective Responses at Lower Doses of Antigen. *J Immunol* **164**, 2338–2346 (2000).
72. Pihlgren, M., Dubois, P. M., Tomkowiak, M., Sjögren, T. & Marvel, J. Resting memory CD8⁺ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro. *Journal of Experimental Medicine* **184**, 2141–2151 (1996).
73. Stout, R. D. & Suttles, J. T cells bearing the CD44^{hi} ‘memory’ phenotype display characteristics of activated cells in G1 stage of cell cycle. *Cell. Immunol.* **141**, 433–443 (1992).
74. Blackburn, S. D. *et al.* Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Publishing Group* **10**, 29–37 (2009).

75. Blackburn, S. D. *et al.* Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Immunology* **10**, 29–37 (2008).
76. West, E. E. *et al.* PD-L1 blockade synergizes with IL-2 therapy in reinvigorating exhausted T cells. *J. Clin. Invest.* **123**, 2604–2615 (2013).
77. Im, S. J. *et al.* Defining CD8⁺ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* **537**, 417–421 (2016).
78. Petrovas, C. *et al.* PD-1 is a regulator of virus-specific CD8⁺ T cell survival in HIV infection. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 2281–2292 (2006).
79. Freeman, G. J., Wherry, E. J., Ahmed, R. & Sharpe, A. H. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 2223–2227 (2006).
80. Velu, V. *et al.* Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* **458**, 206–210 (2009).
81. Brahmer, J. R. *et al.* Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3167–3175 (2010).
82. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 677–704 (2008).
83. 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* **181**, 6738–6746 (2008).

84. Youngblood, B. *et al.* Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells. *Immunity* **35**, 400–412 (2011).
85. Lafon, M. *et al.* Detrimental contribution of the immuno-inhibitor B7-H1 to rabies virus encephalitis. *J Immunol* **180**, 7506–7515 (2008).
86. McPherson, R. C. *et al.* Epigenetic modification of the PD-1 (Pdccl1) promoter in effector CD4(+) T cells tolerized by peptide immunotherapy. *Elife* **3**, 765 (2014).
87. Wherry, E. J. *et al.* Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* **27**, 670–684 (2007).
88. Liu, J. *et al.* Targeting PD-1 and Tim-3 Pathways to Reverse CD8 T-Cell Exhaustion and Enhance Ex Vivo T-Cell Responses to Autologous Dendritic/Tumor Vaccines. *J. Immunother.* **39**, 171–180 (2016).
89. Bengsch, B. *et al.* Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8+ T Cell Exhaustion. *Immunity* **45**, 358–373 (2016).
90. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H. & Riley, J. L. 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* **173**, 945–954 (2004).
91. 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.* **209**, 1201–1217 (2012).

92. Sheppard, K.-A. *et al.* PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett.* **574**, 37–41 (2004).
93. 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* **16**, 1147–1151 (2010).
94. Liang, H. & Ward, W. F. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ* **30**, 145–151 (2006).
95. Workman, C. J. & Vignali, D. A. A. The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells. *European Journal of Immunology* **33**, 970–979 (2003).
96. Workman, C. J. *et al.* Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo. *J Immunol* **172**, 5450–5455 (2004).
97. Blackburn, S. D., Shin, H. & Freeman, G. J. *Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by α PD-L1 blockade.* (Proceedings of the ..., 2008).
98. Butler, N. S. *et al.* Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. *Nature Publishing Group* **13**, 188–195 (2012).
99. Monney, L. *et al.* Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* **415**, 536–541 (2002).

100. Fourcade, J. *et al.* Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8⁺ T cell dysfunction in melanoma patients. *J. Exp. Med.* **207**, 2175–2186 (2010).
101. Hwang, E. S., Szabo, S. J., Schwartzberg, P. L. & Glimcher, L. H. T Helper Cell Fate Specified by Kinase-Mediated Interaction of T-bet with GATA-3. *Science* **307**, 430–433 (2005).
102. Lee, Y. K. *et al.* Late Developmental Plasticity in the T Helper 17 Lineage. *Immunity* **30**, 92–107 (2009).
103. Wilson, C. B., Rowell, E. & Sekimata, M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nature Reviews Immunology* **9**, 91–105 (2009).
104. Ouyang, W. *et al.* Inhibition of Th1 Development Mediated by GATA-3 through an IL-4-Independent Mechanism. *Immunity* **9**, 745–755 (1998).
105. Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., Immunity, W. S. 2003. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12R β 2 chain or T-bet. *Elsevier*
106. Usui, T. *et al.* T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 755–766 (2006).
107. Gerlach, C. *et al.* One naive T cell, multiple fates in CD8⁺ T cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 1235–1246 (2010).
108. Stemmerger, C. *et al.* A single naive CD8⁺ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity* **27**, 985–997 (2007).

109. Sarkar, S. *et al.* Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 625–640 (2008).
110. Badovinac, V. P., Porter, B. B. & Harty, J. T. CD8⁺ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nature Immunology* **5**, 809–817 (2004).
111. Badovinac, V. P., Messingham, K. A. N., Jabbari, A., Haring, J. S. & Harty, J. T. Accelerated CD8⁺ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat Med* **11**, 748–756 (2005).
112. Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Opinion-decision making in the immune system: Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nature Reviews Immunology* **2**, 982–987 (2002).
113. Pollizzi, K. N. *et al.* Asymmetric inheritance of mTORC1 kinase activity during division dictates CD8⁺ T cell differentiation. *Nature Publishing Group* 1–10 (2016). doi:10.1038/ni.3438
114. Metz, P. J. *et al.* Regulation of Asymmetric Division by Atypical Protein Kinase C Influences Early Specification of CD8⁺ T Lymphocyte Fates. *Scientific Reports* **6**, 19182 (2016).
115. Kakaradov, B. *et al.* Early transcriptional and epigenetic regulation of CD8⁺ T cell differentiation revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature Publishing Group* 1–14 (2017). doi:10.1038/ni.3688
116. Oliaro, J. *et al.* Asymmetric Cell Division of T Cells upon Antigen Presentation Uses Multiple Conserved Mechanisms. *J Immunol* **185**, 367–375 (2010).

117. Ben Youngblood *et al.* Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. *Nature* **552**, 404–409 (2017).
118. Akondy, R. S. *et al.* Origin and differentiation of human memory CD8 T cells after vaccination. *Nature* **552**, 362–367 (2017).
119. Wang, D. *et al.* The Transcription Factor Runx3 Establishes Chromatin Accessibility of cis-Regulatory Landscapes that Drive Memory Cytotoxic T Lymphocyte Formation. *Immunity* **48**, 659–674.e6 (2018).
120. Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G. & Lembo, D. The human cytomegalovirus. *Pharmacology & Therapeutics* **98**, 269–297 (2003).
121. Ogawa-Goto, K. *et al.* Binding of human cytomegalovirus to sulfated glucuronyl glycosphingolipids and their inhibitory effects on the infection. *Journal of General Virology* **79**, 2533–2541 (1998).
122. Ogawa-Goto, K. *et al.* Microtubule Network Facilitates Nuclear Targeting of Human Cytomegalovirus Capsid. *J. Virol.* **77**, 8541–8547 (2003).
123. Nguyen, N. L., Loveland, A. N. & Gibson, W. Nuclear Localization Sequences in Cytomegalovirus Capsid Assembly Proteins (UL80 Proteins) Are Required for Virus Production: Inactivating NLS1, NLS2, or Both Affects Replication to Strikingly Different Extents. *J. Virol.* **82**, 5381–5389 (2008).
124. Cepeda, V., Esteban, M. & Ramos, A. F. Human cytomegalovirus final envelopment on membranes containing both trans- Golgi network and endosomal markers. *Cellular Microbiology* **12**, 386–404 (2010).
125. Goodrum, F. D., Jordan, C. T., High, K. & Shenk, T. Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: A model for

- latency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 16255–16260 (2002).
126. Maciejewski, J. P. *et al.* Infection of hematopoietic progenitor cells by human cytomegalovirus. *Blood* **80**, 170–178 (1992).
127. Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P. & Sinclair, J. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *Journal of General Virology* **77**, 3099–3102 (1996).
128. Reeves, M. B., Lehner, P. J., Sissons, J. G. P. & Sinclair, J. H. An in vitro model for the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation in dendritic cells by chromatin remodelling. *Journal of General Virology* **86**, 2949–2954 (2005).
129. Sinclair, J. & Sissons, P. Latent and Persistent Infections of Monocytes and Macrophages. *INT* **39**, 293–301 (1996).
130. Söderberg-Nauclér, C., Fish, K. N., Cell, J. N. 1997. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Elsevier*
131. Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J. G. P., Borysiewicz, L. K. & Sinclair, J. H. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of General Virology* **72**, 2059–2064 (1991).
132. Zhuravskaya, T. *et al.* Spread of Human Cytomegalovirus (HCMV) After Infection of Human Hematopoietic Progenitor Cells: Model of HCMV Latency. *Blood* **90**, 2482–2491 (1997).

133. Isaacson, M. K., Juckem, L. K. & Compton, T. in *Human Cytomegalovirus* 85–100 (Springer, Berlin, Heidelberg, 2008). doi:10.1007/978-3-540-77349-8_5
134. Compton, T. *et al.* Human Cytomegalovirus Activates Inflammatory Cytokine Responses via CD14 and Toll-Like Receptor 2. *J. Virol.* **77**, 4588–4596 (2003).
135. Boehme, K. W., Guerrero, M. & Compton, T. Human Cytomegalovirus Envelope Glycoproteins B and H Are Necessary for TLR2 Activation in Permissive Cells. *J Immunol* **177**, 7094–7102 (2006).
136. Reddehase, M. J. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nature Reviews Immunology* **2**, 831–844 (2002).
137. Biassoni, R. *et al.* Human natural killer cell receptors and co- receptors. *Immunol. Rev.* **181**, 203–214 (2001).
138. Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G. & Kiessling, R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* **319**, 675–678 (1986).
139. Ravetch, J. V. & Lanier, L. L. Immune Inhibitory Receptors. *Science* **290**, 84–89 (2000).
140. Tomasec, P. *et al.* Surface Expression of HLA-E, an Inhibitor of Natural Killer Cells, Enhanced by Human Cytomegalovirus gpUL40. *Science* **287**, 1031–1033 (2000).
141. Ulbrecht, M. *et al.* Cutting Edge: The Human Cytomegalovirus UL40 Gene Product Contains a Ligand for HLA-E and Prevents NK Cell-Mediated Lysis. *J Immunol* **164**, 5019–5022 (2000).

142. Beck, S. & Barrell, B. G. Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* **331**, 269–272 (1988).
143. Chapman, T. L., Heikema, A. P., Immunity, P. B.1999. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Elsevier*
144. Cosman, D. *et al.* A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Elsevier*
145. Prod'homme, V. *et al.* The Human Cytomegalovirus MHC Class I Homolog UL18 Inhibits LIR-1+ but Activates LIR-1- NK Cells. *J Immunol* **178**, 4473–4481 (2007).
146. Arnon, T. I. *et al.* Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nature Publishing Group* **6**, 515–523 (2005).
147. Prod'homme, V. *et al.* Human cytomegalovirus UL141 promotes efficient downregulation of the natural killer cell activating ligand CD112. *Journal of General Virology* **91**, 2034–2039 (2010).
148. Tomasec, P. *et al.* Downregulation of natural killer cell-activating ligand CD155 by human cytomegalovirus UL141. *Nature Publishing Group* **6**, 181–188 (2005).
149. Stern-Ginossar, N. *et al.* Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nature Publishing Group* **9**, 1065 (2008).
150. Ashiru, O. *et al.* NKG2D Ligand MICA Is Retained in the cis-Golgi Apparatus by Human Cytomegalovirus Protein UL142. *J. Virol.* **83**, 12345–12354 (2009).

151. Bennett, N. J. *et al.* Intracellular Sequestration of the NKG2D Ligand ULBP3 by Human Cytomegalovirus. *J Immunol* **ji_1000789** (2010). doi:10.4049/jimmunol.1000789
152. Wills, M. R. *et al.* Human Cytomegalovirus Encodes an MHC Class I-Like Molecule (UL142) That Functions to Inhibit NK Cell Lysis. *J Immunol* **175**, 7457–7465 (2005).
153. Opal, S. M. & DePalo, V. A. Anti-Inflammatory Cytokines. *Chest* **117**, 1162–1172 (2000).
154. Smith, L. K. *et al.* Interleukin-10 Directly Inhibits CD8+T Cell Function by Enhancing N-Glycan Branching to Decrease Antigen Sensitivity. *Immunity* **48**, 299–312.e5 (2018).
155. Ljungman, P., Hakki, M. & Boeckh, M. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Hematology/Oncology Clinics of North America* **25**, 151–169 (2011).
156. Hebart, H. & Einsele, H. Clinical aspects of cmv infection after stem cell transplantation. *Hum. Immunol.* **65**, 432–436 (2004).
157. Abdala, E. *et al.* Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clinics* **70**, 515–523 (2015).
158. Fietze, E. *et al.* Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation* **58**, 675–680 (1994).
159. Rubin, R. H. Impact of Cytomegalovirus Infection on Organ Transplant Recipients. *Rev Infect Dis* **12**, S754–S766 (1990).

160. Sasazuki, T. *et al.* Effect of Matching of Class I HLA Alleles on Clinical Outcome after Transplantation of Hematopoietic Stem Cells from an Unrelated Donor. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199810223391701> **339**, 1177–1185 (2009).
161. Janelle, V., Carli, C., Taillefer, J., Orio, J. & Delisle, J.-S. Defining novel parameters for the optimal priming and expansion of minor histocompatibility antigen-specific T cells in culture. *Journal of Translational Medicine* **13**, 123 (2015).
162. Morgan, G. Thomas' Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *British Journal of Haematology* **126**, 162–162 (2004).
163. Goodrich, J. M. *et al.* Ganciclovir Prophylaxis To Prevent Cytomegalovirus Disease after Allogeneic Marrow Transplant. *Ann Intern Med* **118**, 173–178 (1993).
164. Salzberger, B., Bowden, R. A., Hackman, R. C., Davis, C. & Boeckh, M. Neutropenia in Allogeneic Marrow Transplant Recipients Receiving Ganciclovir for Prevention of Cytomegalovirus Disease: Risk Factors and Outcome. *Blood* **90**, 2502–2508 (1997).
165. Takami, A. *et al.* High incidence of cytomegalovirus reactivation in adult recipients of an unrelated cord blood transplant. *Haematologica* **90**, 1290–1292 (2005).
166. diseases, K. S. C. I.2002. Opportunistic infections in patients with and patients without acquired immunodeficiency syndrome. *academic.oup.com*
167. Ljungman, P., Griffiths, P., diseases, C. P. C. I.2002. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *academic.oup.com*
168. Fishman, J. A. & Rubin, R. H. Infection in Organ-Transplant Recipients. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199806113382407> **338**, 1741–1751 (2009).

169. Rooney, C. M. *et al.* Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *The Lancet* **345**, 9–13 (1995).
170. Papadopoulos, E. B. *et al.* Infusions of Donor Leukocytes to Treat Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *N Engl J Med* **330**, 1185–1191 (1994).
171. Heslop, H. E. Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma. *N Engl J Med* **331**, 679 (1994).
172. Walter, E. A. *et al.* Reconstitution of Cellular Immunity against Cytomegalovirus in Recipients of Allogeneic Bone Marrow by Transfer of T-Cell Clones from the Donor. *N Engl J Med* **333**, 1038–1044 (1995).
173. Riddell, S. R. *et al.* Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* **257**, 238–241 (1992).
174. Doubrovina, E. *et al.* Adoptive immunotherapy with unselected or EBV-specific T cells for biopsy-proven EBV+ lymphomas after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* **119**, 2644–2656 (2012).
175. Haque, T. *et al.* Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* **110**, 1123–1131 (2007).
176. Khanna, R. *et al.* Activation and adoptive transfer of Epstein–Barr virus-specific cytotoxic T cells in solid organ transplant patients with posttransplant lymphoproliferative disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 10391–10396 (1999).

177. Knörck, A. *et al.* Quantity, quality, and functionality of peripheral blood cells derived from residual blood of different apheresis kits. *Transfusion* **58**, 1516–1526 (2018).
178. Dietz, A. B. *et al.* A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers. *Transfusion* **46**, 2083–2089 (2006).
179. Néron, S. *et al.* Characterization of mononuclear cells remaining in the leukoreduction system chambers of apheresis instruments after routine platelet collection: a new source of viable human blood cells. *Transfusion* **47**, 1042–1049 (2007).
180. Lemieux, J., Jobin, C., Simard, C. & Néron, S. A global look into human T cell subsets before and after cryopreservation using multiparametric flow cytometry and two-dimensional visualization analysis. *Journal of Immunological Methods* **434**, 73–82 (2016).
181. Pfeiffer, I. A. *et al.* Leukoreduction system chambers are an efficient, valid, and economic source of functional monocyte-derived dendritic cells and lymphocytes. *Immunobiology* **218**, 1392–1401 (2013).
182. Nordgren, I. K. Leukoreduction system chambers provide a valuable source of functional monocytes for the monocyte activation test by comparison with internationally validated methods. *Journal of Immunological Methods* **428**, 42–49 (2016).
183. Peytour, Y., Villacreces, A., Chevaleyre, J., Ivanovic, Z. & Praloran, V. Discarded leukoreduction filters: A new source of stem cells for research, cell engineering and therapy? *Stem Cell Research* **11**, 736–742 (2013).

184. Feuchtinger, T. *et al.* Safe adoptive transfer of virus- specific T- cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology* **134**, 64–76 (2006).
185. Comoli, P. *et al.* Infusion of autologous Epstein-Barr virus (EBV)–specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood* **99**, 2592–2598 (2002).
186. Savoldo, B. *et al.* Treatment of solid organ transplant recipients with autologous Epstein Barr virus–specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs). *Blood* **108**, 2942–2949 (2006).
187. Bollard, C. M., Rooney, C. M. & Heslop, H. E. T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease. *Nature Reviews Clinical Oncology* **2012 9:9 9**, 510–519 (2012).
188. Heslop, H. E. *et al.* Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* **115**, 925–935 (2010).
189. Withers, B. *et al.* Long-term control of recurrent or refractory viral infections after allogeneic HSCT with third-party virus-specific T cells. *Blood Advances* **1**, 2193–2205 (2017).
190. Tzannou, I. *et al.* Off-the-Shelf Virus-Specific T Cells to Treat BK Virus, Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *Journal of Clinical Oncology* **35**, 3547–3557 (2017).

191. Leen, A. M. *et al.* Multicenter study of banked third party virus-specific T-cells to treat severe viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **121**, blood-2013-02-486324-5123 (2013).
192. Barker, J. N. *et al.* Successful treatment of Epstein-Barr virus (EBV)-associated post-transplant lymphoma after cord blood transplant using third-party EBV-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Blood* **116**, blood-2010-04-281873-5049 (2010).
193. Bao, L., Dunham, K., Stamer, M., Mulieri, K. M. & Lucas, K. G. Expansion of Cytomegalovirus pp65 and IE-1 Specific Cytotoxic T Lymphocytes for Cytomegalovirus-Specific Immunotherapy Following Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **14**, 1156–1162 (2008).
194. Hanley, P. J. *et al.* 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 (2009).
195. Comoli, P. *et al.* Successful In Vitro Priming of EBV-Specific CD8+ T Cells Endowed with Strong Cytotoxic Function from T Cells of EBV-Seronegative Children. *Am. J. Transplant.* **6**, 2169–2176 (2006).
196. Popescu, I. *et al.* Ex Vivo Priming of Naïve T Cells Into EBV- Specific Th1/Tc1 Effector Cells by Mature Autologous DC Loaded with Apoptotic/Necrotic LCL. *Am. J. Transplant.* **3**, 1369–1377 (2003).
197. Savoldo, B. *et al.* Generation of EBV-Specific CD4+ Cytotoxic T Cells from Virus Naive Individuals. *J Immunol* **168**, 909–918 (2002).

198. Aguilar, C., Husain, S. & Lortholary, O. Recent advances in understanding and managing infectious diseases in solid organ transplant recipients. *F1000Res* **7**, 661 (2018).
199. Teira, P. *et al.* Early cytomegalovirus reactivation remains associated with increased transplant-related mortality in the current era: a CIBMTR analysis. *Blood* **127**, 2427–2438 (2016).
200. Kondo, E. *et al.* Identification of novel CTL epitopes of CMV-pp65 presented by a variety of HLA alleles. *Blood* **103**, 630–638 (2004).
201. Slezak, S. L. *et al.* CMV pp65 and IE-1 T cell epitopes recognized by healthy subjects. *Journal of Translational Medicine* **5**, 17 (2007).
202. Wölfl, M. & Greenberg, P. D. Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8⁺ T cells. *Nature Publishing Group* **9**, 950–966 (2014).
203. Yang, S. *et al.* Modulating the differentiation status of ex vivo-cultured anti-tumor T cells using cytokine cocktails. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 727–736 (2013).
204. Del Vecchio, M. *et al.* Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res* **13**, 4677–4685 (2007).
205. Watford, W. T., Moriguchi, M., Morinobu, A. & O'Shea, J. J. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 361–368 (2003).

206. Li, Y., Bleakley, M. & Yee, C. IL-21 Influences the Frequency, Phenotype, and Affinity of the Antigen-Specific CD8 T Cell Response. *J Immunol* **175**, 2261–2269 (2005).
207. Cieri, N. *et al.* IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood* **121**, 573–584 (2013).
208. Liu, S. *et al.* IL-21 synergizes with IL-7 to augment expansion and anti-tumor function of cytotoxic T cells. *International Immunology* **19**, 1213–1221 (2007).
209. McIver, Z. A. *et al.* Immune reconstitution in recipients of photodepleted HLA-identical sibling donor stem cell transplantations: T cell subset frequencies predict outcome. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **17**, 1846–1854 (2011).
210. Bastien, J.-P., Roy, J. & Roy, D. C. Selective T-Cell Depletion for Haplotype-Mismatched Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Seminars in Oncology* **39**, 674–682 (2012).
211. Mielke, S., Solomon, S. R. & Barrett, A. J. Selective depletion strategies in allogeneic stem cell transplantation. *Cytotherapy* **7**, 109–115 (2009).
212. Mavroudis *et al.* Specific depletion of alloreactive T cells in HLA- identical siblings: a method for separating graft- versus- host and graft- versus- leukaemia reactions. *British Journal of Haematology* **101**, 565–570 (1998).
213. Martins, S. L. R. *et al.* Functional assessment and specific depletion of alloreactive human T cells using flow cytometry. *Blood* **104**, 3429–3436 (2004).
214. Godfrey, W. R., Krampf, M. R., Taylor, P. A. & Blazar, B. R. Ex vivo depletion of alloreactive cells based on CFSE dye dilution, activation antigen selection, and dendritic cell stimulation. *Blood* **103**, 1158–1165 (2004).

215. Mielke, S. *et al.* A clinical-scale selective allodepletion approach for the treatment of HLA-mismatched and matched donor-recipient pairs using expanded T lymphocytes as antigen-presenting cells and a TH9402-based photodepletion technique. *Blood* **111**, 4392–4402 (2008).
216. Eaton, D., Gilham, D. E., O'Neill, A. & Hawkins, R. E. Retroviral transduction of human peripheral blood lymphocytes with bcl-x_L promotes *in vitro* lymphocyte survival in pro-apoptotic conditions. *Gene Therapy* **2002** 9:8 **9**, 527–535 (2002).
217. Ahmed, N. N., Grimes, H. L., Bellacosa, A., Chan, T. O. & Tsichlis, P. N. Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 3627–3632 (1997).
218. Liu, K. & Rosenberg, S. A. Transduction of an IL-2 Gene into Human Melanoma-Reactive Lymphocytes Results in Their Continued Growth in the Absence of Exogenous IL-2 and Maintenance of Specific Antitumor Activity. *J Immunol* **167**, 6356–6365 (2001).
219. Davila, M. L. *et al.* Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Science Translational Medicine* **6**, 224ra25–224ra25 (2014).
220. Grupp, S. A. *et al.* Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoal215134> **368**, 1509–1518 (2013).
221. Maude, S. L. *et al.* Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* **371**, 1507–1517 (2014).

222. Kloss, C. C., Condomines, M., Cartellieri, M., Bachmann, M. & Sadelain, M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat. Biotechnol.* **31**, 71–75 (2013).
223. Lanitis, E. *et al.* Chimeric Antigen Receptor T Cells with Dissociated Signaling Domains Exhibit Focused Antitumor Activity with Reduced Potential for Toxicity In Vivo. *Cancer Immunology Research* **1**, 43–53 (2013).
224. Roybal, K. T. *et al.* Engineering T Cells with Customized Therapeutic Response Programs Using Synthetic Notch Receptors. *Cell* **167**, 419–432.e16 (2016).
225. Cho, J. H., Collins, J. J. & Wong, W. W. Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. *Cell* **173**, 1426–1438.e11 (2018).

