



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

Ecole Doctorale BioSE Biologie-Santé-Environnement

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Yingying WANG

Sélection immunomagnétique des lymphocytes

T antiviraux IFN- γ ⁺ : *Analyse quantitative, fonctionnelle*

et composition en sous-populations lymphocytaires T

Le 31 Octobre 2014

Membres du jury :

**Rapporteurs: Professeur Jean-Hugues DALLE
Docteur Henri VIÉ**

**CHU-Robert Débré, Paris
INSERM-UMR892, Nantes**

**Examineurs: Professeur Chantal FINANCE
Docteur Delphine SAUCE**

**UMR7565, Nancy
INSERM-UMR-S945, Paris**

**Directeur de thèse: Professeur Danièle BENSOUSSAN
Co-directeur de thèse: Docteur Véronique DECOT**

**UMR7365, Nancy
UMR7365, Nancy**

**Membres invités: Professeur Jean-François STOLTZ
Docteur Laurence CLEMENT**

**UMR7365, Nancy
CHU-Nancy, Nancy**

UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine et FR 3209-IMoPA-Biopôle.

Remerciements

A Madame le Professeur Danièle BENSOUSSAN

Merci d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci pour votre disponibilité, votre écoute, vos conseils et votre patience. Ces années à vos côtés m'ont permis d'acquérir de nombreuses connaissances scientifiques. Soyez assurée de mon profond respect et de ma grande reconnaissance.

A Madame le Docteur Véronique DECOT

Merci d'avoir accepté de co-diriger cette thèse. Merci pour votre aide et votre disponibilité pour les nombreuses manipulations notamment en cytométrie. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jean-Hugues DALLE

Merci d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Je vous suis très reconnaissante pour les conseils que vous m'avez apportés dans le cadre du comité de thèse.

A Monsieur le Docteur Henri VIÉ

Je suis sensible à l'honneur que vous me faites d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Je vous remercie pour les remarques constructives que vous avez formulées.

A Madame le Professeur Chantal FINANCE

Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de m'avoir éclairée de vos conseils dans le cadre du comité de thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon plus profond respect.

A Madame le Docteur Delphine SAUCE

Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury et pour votre aide précieuse apportée lors de l'étude des sous-populations lymphocytaires.

A toutes les personnes qui contribuent à la collaboration entre Nancy et Wuhan

A Monsieur le Professeur Jean-François STOLTZ

Merci pour votre soutien et vos encouragements. Merci pour votre aide pour trouver les financements et pour votre mobilisation pour faire vivre la collaboration franco-chinoise.

A Monsieur le Professeur ZHOU Yunfeng

Merci pour votre soutien et vos encouragements.

Un grand merci également

A Monsieur le Professeur Gilbert FAURE

A Monsieur le Professeur Jacques HUBERT

A Monsieur le Professeur Alain GERARD

A Madame le Docteur Mariama TRAORE

A tous mes collègues et mes amis de France et de Chine

Merci pour votre aide au quotidien, votre soutien et votre amitié. Les mots sont faibles pour vous exprimer ma profonde reconnaissance et ma gratitude pour tout ce que vous m'avez apporté.

A Madame le docteur Lamia AÏSSI-ROTHÉ

Merci de m'avoir accompagnée lors de mes premiers pas au laboratoire et de m'avoir transmis toutes tes connaissances.

A tous mes amis à l'UTCT

Estelle, Isabelle, Brigitte F, Brigitte S, Coralie, Vanessa, Virginie, Kevin, Laureline, Valérie, Stéphanie, Olivia, Catherine

A tous mes amis à l'EFS

Marie-Jeanne, Evelyne, Amandine, Jessica, Patrick

A tous mes amis au laboratoire HLA

Claire, Maxime, Ilham, Anne

A ceux du laboratoire d'immunologie et à la plateforme Nancytomique

Monsieur le Professeur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT

Madame le Docteur Sandra AUDONNET

Madame Huili CAI

A tous mes amis au BIOPOLE

Ghislaine, Monique, Brigitte, Nathalie, Leïla, Nasser, Reine

A mes collègues du service d'Hématologie à l'hôpital Mercy

Monsieur le Docteur Bernard CHISTIAN

Madame le Docteur Véronique DORVAUX

Madame le Docteur Isabelle GUIBAUD

Madame le Docteur Alina ZAMFIR

Madame le Docteur Oana BALASANU

Mlle Marie MULLER

Mlle Delphine SERRE

Mlle Charlotte BELIER

Mlle Lucianne SCHILMER

Aux stagiaires de passage :

Loic FIEVET, Neslihan ULAS, Mélanie GUIOT, Valentine WANG,

Fahima, Fallone, Hamia, Emilie, Laure, Gabrielle

Aux futurs doctorants :

Chongsheng QIAN, Yu XIONG, Caroline LAROYE

A mes chers donateurs de sang

pour leur générosité à donner des tubes et des poches

Fatima, Thomas,
Ghislaine, Monique,
Nasser, Reine,
Cédric, Jessica,
Loic R, Cécile,
Léonore, Catherine,
Sandra, Justine
Brigitte F, Brigitte S,
Laureline, Valérie,
Coralie, Vanessa, Estelle,
Virginie, Kevin,
Stéphanie, Olivia,
Danièle, Véronique,
Catherine, Sandra,
Anne, Fred, Marie
Yueying, Feng,
Fengwei, Rui,
Yihua, Qian,
Gaili, Haixia,
Xianqin, Jun,
Zheng, Yang

A mes amis

A mes amis français

Madame Evelyne GARREAUX (Pour son aide à l'apprentissage du français)

Caroline et Béatrice

Famille BONINI

Martine LANG, Ghislaine, Martine, Catherine

Monsieur et Madame NOWAK

Monsieur et Madame HEINEQUIN (Pour les corrections dans mon manuscrit)

A mes amis chinois en France

Qian CAO, Lingli YUAN, Rui LI, Yihua LIU, Xianglei WU, Ling ZHAO,

Kun YANG, Tieyuan ZHU, Siwei DONG, Zhen LI

Yueying LI, Song XU, Zheng ZHANG,

Yu XIONG, Chongsheng QIAN, Chaojie WEI,

Feng ZHENG, Min CHEN, Xianqin MAO, Jun QIN,

Qian TU, Gaili CHEN, Haixia DING, Huili CAI, Yong HU

Lin ZHANG, Chen LI, Zhe XIE, Qiuji WU,

Chenxi XIA, Yong WANG

.....

A mes amis en Chine

Huan, Shuna, Lei, Jinghe, Lingyan, Peili,

Ling, Lingli,

Xiuxia, Hongru, Fang

Dongwei, Sheng

A mon professeur d'anglais Mme CAI Wujing qui m'accompagne depuis le collège et qui m'aime comme sa fille.

A ma famille

A ma maman et mon papa

A ma sœur et ma nièce

A mon frère, ma belle-sœur et leur petite princesse

Et mami, mes tantes, mes oncles, mes cousines et cousins

SOMMAIRE

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUE

1. La greffe de cellules souches hématopoïétiques	26
2. Effet bénéfique et Effets néfastes de l'allogreffe	29
2.1 Effet bénéfique : L'effet du greffon contre la leucémie (Effet GvL)	29
2.1.1 Les différents antigènes intervenant dans l'effet GvL	
2.2 Effet néfaste : La réaction du greffon contre l'Hôte (GvHD)	30
2.2.1 Classification de GvHD	
2.2.2 La physiopathologie de la GvHD	
2.2.3 La GvHD aiguë	
2.2.3.1 Description clinique et facteurs de risque	
2.2.3.2 Prophylaxie de la GvHDa	
2.2.3.3 Traitement	
2.2.4 La GvHD chronique	
2.2.4.1 Description clinique et facteurs de risque	
2.2.4.2 Traitement de la GvHDc	
2.2.5 Nouvelles approches dans le traitement de la GvHD	
2.3 Modalités favorisant l'effet GvL et limitant la GvHD	41
2.4 La non-prise ou Rejet de greffe	42
3. Reconstitution Immunitaire	43
3.1 Cinétique de la reconstitution immunitaire	

3.2 La reconstitution immunitaire T	
3.2.1 Expansion des lymphocytes T du donneur	
3.2.2 Reconstitution des lymphocytes T naïfs	
3.2.3 Stratégies pour renforcer la reconstitution de lymphocytes T	
3.2.4 Facteurs influençant la reconstitution des lymphocytes T	
3.3 La reconstitution immunitaire B	
4. Les infections virales	47
5. Lien entre infections virales et GvHD	49

Partie 2 VIROLOGIE

I L'Adénovirus humain (ADV)	51
1. Historique	
2. Taxonomie	
3. Structure	
4. Cycle viral	
4.1 Latence et réactivation	
5. Épidémiologie	
6. Réponse immunitaire	
6.1 L'immunité innée	
6.2 L'immunité humorale	
6.3 L'immunité cellulaire	
7. Manifestations cliniques	
7.1 Atteintes respiratoires	
7.2 Atteintes oculaires	
7.3 Atteintes intestinales	
7.4 Infections chez les sujets immunodéprimés	
8. Reconstitution immunitaire	
9. Traitement des infections à ADV	
II Le Virus Epstein-Barr (EBV)	62
1. Historique	

- 2. Taxonomie**
- 3. Structure**
- 4. Cycle viral**
 - 4.1 Latence et réactivation**
 - 4.1.1 différents types de latence**
 - 4.1.2 Description de différents produits de gènes de latence**
 - 4.2 Le cycle lytique**
- 5. Épidémiologie**
- 6. Réponse immunitaire**
 - 6.1 La réponse humorale à L'EBV**
 - 6.2 Réponse immune cellulaire**
 - 6.2.1 *Réponse immune cellulaire innée***
 - 6.2.2 *Réponse immune cellulaire adaptative***
 - 6.2.2.1 Réponse cellulaire T-CD8+**
 - 6.2.2.2 Réponse cellulaire T-CD4⁺**
- 7. Physiopathologie d'une infection persistente liée à l'EBV**
- 8. Malignités liées à EBV**
- 9. Reconstitution immunitaire spécifique anti-EBV**
- 10. Traitements des infections à EBV**

Partie 3 IMMUNOTHERAPIE CELLULAIRE ADOPTIVE 77

- 1. Immunothérapie non spécifique : Donor Lymphocyte Infusion (DLI) 79**
- 2. La Déplétion alloréactive 80**
- 3. Immunothérapie spécifique anti-infectieuse 82**
 - 3.1 Production des CTL anti-virus par culture cellulaire 82**
 - 3.1.1 *Les CTL anti-EBV***
 - 3.1.2 *Les CTL anti-ADV***
 - 3.1.3 *Les CTL anti-CMV***
 - 3.1.4 Les CTL dirigés contre plusieurs virus**

3.1.4.1	<i>Les CTL anti-ADV/EBV</i>	
3.1.4.2	<i>Les CTL anti-EBV/CMV</i>	
3.1.4.3	<i>Les CTL dirigés contre trois virus ou plus : CTL multipathogènes</i>	
3.1.5	<i>Les Effets secondaires survenant après l'injection de CTL anti-infectieux</i>	
3.1.6	<i>Les Limites de la production de CTL anti-viraux par culture cellulaire</i>	
3.2	Production des CTL par techniques immunomagnétiques	97
3.2.1	<i>Production des CTL par le biais des tétramères</i>	
3.2.2	<i>Production des CTL sur la base de la sécrétion d'IFN-γ</i>	
3.2.3	<i>Les limites de ces approches</i>	
3.2.4	<i>Production de CTL sur la base de l'expression de marqueurs d'activation</i>	
3.3	Production des CTL à partir de donneurs n'ayant aucune immunité vis-à-vis des virus concernés	106
3.4	Production de CTL de tierce partie	107
	REVUE 1	110
	REVUE 2	128
	Partie 4 LES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES T	
1.	Présentation des sous populations de lymphocytes T	132
2.	Différenciation lymphocytaire	134
3.	Sous-populations T au sein des CTL	137

OBJECTIFS DE TRAVAIL

RESULTATS

1. Article 1 **146**

Utilisation d'une combinaison de pools peptidiques antigéniques latents et lytiques issus du virus Epstein-Barr (EBNA1, 3 et BZLF1) afin de permettre une stimulation rapide et efficace des lymphocytes T spécifiques de l'EBV dans le cadre d'une immunothérapie adoptive

2. Article 2	166
Etude des sous-populations de lymphocytes T spécifiques de virus chez les donneurs sains et après isolement par technique immunomagnétique basée sur la sécrétion d'IFN-γ	
3. Article en préparation	190
Génération de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) bispécifiques anti- adénovirus (ADV) et anti-Epstein-Barr-virus (EBV)	
1. Introduction	
2. Matériels et Méthodes	
3. Résultats	
4. Discussions	
DISCUSSION	210
1-Application clinique de VSTs	
2-Les Sous-populations lymphocytaires T	
3-Accessibilité des VSTs	
4-Amélioration des performances des VSTs	
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	223
BIBLIOGRAPHIE	226
ANNEXES	260

ARTICLE 3:

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

D'aveni M, Aissi-Rothé L, Venard V, Salmon A, Falenga A, Decot V, Clement L, Virion JM, Wang Y, Latger-Cannard V, Tomoviak C, Stoltz JF, Bordigoni P, Bensoussan D.

Transplant Immunol. 2011, 24:224-232.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

ARTICLE

Article 1:

Combination of Epstein -Barr virus Nuclear Antigen 1, 3 and lytic antigen BZLF1 peptide pools allows fast and efficient stimulation of EBV specific T cells for adoptive immunotherapy

Yingying WANG, Lamia AÏSSI-ROTHÉ, Jean Marc VIRION, Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT, Neslihan ULAS, Sandra AUDONNET, Alexandra SALMON, Laurence CLEMENT, Véronique VENARD, Hélène JEULIN, Jean-François STOLTZ, Véronique DECOT, Danièle BENSOUSSAN.

Cytotherapy. 2014 Jan;16(1):122-34

Article 2: (Soumis)

Virus-specific T cell subsets in human peripheral blood and after IFN- γ immunomagnetic selection

Yingying WANG, Chongsheng QIAN, Huili CAI, Caroline LAROYE, Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT, Laurence CLEMENT Jean-François STOLTZ, Véronique DECOT, Danièle BENSOUSSAN

Article 3: (en préparation)

Generation of bi-specific Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) against Epstein-Barr virus and Adenovirus for adoptive immunotherapy

Yingying WANG, Loïc FIEVET, Jean-François STOLTZ, Véronique DECOT, Danièle BENSOUSSAN.

Article 4:

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

D'aveni M, Aissi-Rothé L, Venard V, Salmon A, Falenga A, Decot V, Clement L, Virion JM, Wang Y, Latger-Cannard V, Tomoviak C, Stoltz JF, Bordigoni P, Bensoussan D.

Transplant Immunol. 2011, 24:224-232.

REVUE

REVUE 1

Immunothérapie adoptive anti-virale après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Wang YY*, Aïssi-Rothé L*, Decot V, Stoltz JF, Bensoussan D.

Virologie. 2012;16(6):345-55

REVUE 2

Apport des méthodes d'isolement immunomagnétique de lymphocytes T cytotoxiques dans la restauration rapide d'une immunité antivirale après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Aïssi-Rothé L, Decot V, Wang Y, Stoltz JF, Bensoussan D.

Revue Francophone des Laboratoires. 2012; 439: 55-60

COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES

COMMUNICATIONS ORALES

- 1-7ème forum de cancéropôle du Grand-Est. Strasbourg, 25-26 Novembre 2014.
- 2-5th China-France International Symposium of Stem cells. Kunming CHINE, 9-10 Decembre 2013.
- 3-Satellite meeting of the 8th Scientific Meeting of the Lorraine Pole for Cartilage Engineering, Nancy, 23-23 Septembre 2013.
- 4-Meeting of Nancy-Wuhan on Regenerative Medicine within the Framework of the Research Lab without Wall, Wuhan CHINE, 20 Juin 2013.
- 5-DocSciLor, Pont-à-Mousson, le 6 Juin 2013.
- 6-Clinical perspectives of the adoptive transfer of specific T lymphocytes, Nante, 21-22 Novembre 2012.
- 7-16th SARLORLUX, Nancy, le 28 Novembre, 2012.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

- 1-Société Française de Bioingénierie Cellulaire et Tissulaire. Bretagne, 17-19 septembre 2014.
- 2-18th SARLORLUX, Nancy, le 11 Septembre, 2014.
- 3-Journées de l'Ecole Doctorale BioSE de Nancy. Nancy, le 01 Avril 2014.
- 4-40th European bone marrow transplantation. Milan, 30 Mars– 2 April 2014.
- 5-9^{ème} journée de recherche biomédicale. Nancy, le 21 Mars 2014.
- 6-Société Française de Greffe, de Moelle et de Thérapie Cellulaire. Lyon, 7-8 Novembre 2013.
- 7-8^{ème} journée de recherche biomédicale. Nancy, le 23 Mai 2013.
- 8-Oncotrans 2013. Reims, 27-28 Juin 2013.
- 9- 39th European bone marrow transplantation. Londres, 07– 12 April 2013.
- 10-6ème forum de cancéropôle du Grand-Est. Strasbourg, 13-14 novembre 2012.
- 11-Société Française de Greffe, de Moelle et de Thérapie Cellulaire. Paris, 25-26 octobre 2012.
- 12-Young Researcher in Life Science. Paris, 14-16 may 2012.

13-Société Française de Greffe, de Moelle et de Thérapie Cellulaire. Paris, 27-28 octobre 2011.

14-Société Française de Bioingénierie Cellulaire et Tissulaire (6ème congrès). Reims, 28-30 septembre 2011.

15-Oncotrans 2011. Nancy, 5-6 Septembre, 2011.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADV	: Adénovirus
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
BCR	: <i>B cell receptor</i>
BART	: <i>Rightward Transcripts of the BamHI A region</i>
BrdU	: 5-Bromo-2'-deoxyuridine
CDA	: <i>Cytokine IFN-γ Detection Assay</i>
CSH	: Cellules Souches Hématopoïétiques
CSP	: Cellules Souches Périphériques
CPA	: Cellules Présentatrices d'Antigène
CMH	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CSM	: Les cellules souches mésenchymateuses
CMV	: Cytomégalovirus
CML	: Culture Mixte Lymphocytaire.
CMN	: Cellules Mononucléées
CNT	: Cellules nucléées totales
CTL	: Lymphocytes T Cytotoxiques
CAR	: <i>Coxsackievirus Adenovirus Receptor</i>
CNP	: Carcinomes indifférenciés du nasopharynx
cpm	: coup par minute
DLI	: <i>Donor Lymphocyte Infusion</i> (injection de lymphocytes du donneur)
DC	: Cellules Dendritiques
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DELFA	: Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay
EBV	: Virus d'Epstein Barr
EBNA	: <i>Epstein Barr Nuclear Antigen</i>
EBER	: <i>EBV Encoded small RNA</i>
FGF-7	: <i>Fibroblast Growth Factor 7</i>

GvL : Graft *versus* Leukemia
G-CSF : Facteur de Croissance Granulocytaire
GvHD : *Graft versus Host Disease*
GvHDa : Réaction du greffon contre l'hôte aiguë
GvHDc : Réaction du greffon contre l'hôte chronique
GMP : *Good Manufacturing Practice*
HLA : *Human Leukocyte Antigen*
HvG : Host *versus* Graft effect
HSV : Virus Herpès Simplex
HHV-4 : *Human Herpes Virus 4*
ICAM1: Intracellular Adhesion Molecule 1
IGF-1 : *Insulin Growth Factor 1*
KGF : *Keratinocyte Growth Factor*
LAL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde
LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire
LPS : *Lipopolysaccharide*
LB : Lymphome Burkitt
LCL : Lignées Cellulaires Lymphoblastoïdes
LMP : *Latent Membrane Protein*
LNH : Lymphome non-Hodgkinien
LP : *Leader Protein*
miHAs : antigènes mineurs d'histocompatibilité
MA : conditionnement myéloablatif
MA : Membrane Antigens
MLR: *Mixed Lymphocyte Reaction*
MNI : Mononucléose infectieuse
MO : Moelle Osseuse
NMA : Conditionnement non myéloablatifs

ND : Non Déterminé

ORF : *Open Reading Frame*

OMS : Organisation Mondiale de Santé

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PEC : Photophérèse Extra-Corporelle

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PHA : Phytohémagglutinine

PMA/Iono : Phorbol 12-Myristate 13-Acetate/Ionomycine

PTLD : *Post-transplant Lymphoproliferative Disease* (syndrome lymphoprolifératif)

PBS : *Phosphate buffered saline*

RANTES: *Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and presumably Secreted*

RS : Relargage Spontané

RT : Relargage Total

SAL : Sérum Anti-Lymphocytaire

SAB : Sérum AB

SAC : *Staphylococcus aureus Cowan strain I*

SFC : *Spots Forming Cells*

Treg : Les lymphocytes T régulateurs

TRM : Transplantation Related Mortality (La mortalité liée à la transplantation)

TRECs : *T-cell receptor rearrangement excision DNA circles*

TEC : Cellules Epithéliales Thymiques

TCR : *T cell receptor*

TP : *Terminal Protein* (protéine terminale)

T_{SCM} : Les lymphocytes T à Cellules Souches T Mémoires

T_N : Les lymphocytes T naïfs

T_{CM} : Les lymphocytes T à mémoires centrales

T_{EM} : Les lymphocytes T à mémoires effectrices

T_{EFF} : Les lymphocytes T effecteurs

VZV: *Varicelle-Zona Virus*

VARNA : *Viral associated-RNA*

VCA : *Viral Capsid Antigens*

ZEBRA : *BamHI Z Epstein-Barr Replication Activator*

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Physiopathologie de GvHD (3 phases) (Harris A *et al.*., 2013).
- Figure 2.** Infections opportunistes au cours des différentes phases suivant la greffe de CSH (Tomblyn M *et al.*, 2009).
- Figure 3.** Représentation schématique de l'Adénovirus (d'après Freymuth, 2003).
- Figure 4.** Représentation du virus d'Epstein-Barr (d'après Nicolas et Meyohas, 2003).
- Figure 5.** Réponse immunitaire cellulaire vis-à-vis des différentes protéines lytiques (IE : très précoce, E : précoce, L : tardive) et latentes du virus Epstein-Barr (d'après Hislop *et al.*, 2007).
- Figure 6.** Mécanisme de persistance de l'EBV *in vivo* (Thorley-Lawson *et al.*, 2013).
- Figure 7.** Stratégie d'immunothérapie adoptive.
- Figure 8.** Procédure de génération de CTLs mutivirus.
- Figure 9.** Méthodes d'isolement des lymphocytes T antiviraux.
- Figure 10.** Sous-populations lymphocytaires T: présentation des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles (Gattinoni et Restifo, 2013).
- Figure 11.** Deux modèles proposés de la différenciation des lymphocytes T (Restifo et Gattinoni, 2013).
- Figure 12.** Modèles possibles de la différenciation des lymphocytes T mémoire (Ahmed *et al.*, 2009).
- Figure 13.** Comparaison entre les pools de peptides « PepTivators-EBV » et les LCL.
- Figure 14.** Comparaison entre les pools de peptides « PepTivators-EBV »
- Figure 15.** Concentration optimale de l'antigène de stimulation « PepMix »
- Figure 16.** Détermination du temps optimal de stimulation avec l'antigène EBV (PepMix/PepT-EBNA1/PepT-BZLF1).
- Figure 17.** Comparaison de valeur absolues des VSTs en mono-spécifique et en bispécifique.
- Figure 18.** Comparaison de la réponse IFN- γ après stimulation antigénique entre les CTL mono-spécifiques et bispécifiques et les CMN avant sélection.

Figure 19. Réponse proliférative des CTL vis-à-vis des antigènes spécifiques et d'un antigène non relevant.

Figure 20. Cytotoxicité des CTL mono-spécifiques et bispécifiques à un rapport de 40:1 après expansion *in vitro*.

Figure 21. Test d'alloréactivité.

Figure 22. Comparaison de la réponse IFN- γ après stimulation antigénique par ces deux pools de Peptides par technique Elispot IFN- γ chez donneurs saints.

Figure 23. Comparaison de cytotoxicité pour les CTL produit avec milieu de culture différents.

Figure 24. Les cellules sécrétant IFN- γ en faible intensité ne sont pas sélectionnées par le système immunomagnétique.

Figure 25. Exemple de donneur présentant une sécrétion d'IFN- γ de faible intensité en réponse à la stimulation par l'antigène : enrichissement insuffisant dans la fraction positive.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Le choix de la source est souvent fonction de la pathologie, de la disponibilité de CSH HLA compatibles (Cheuk *et al.*, 2013).

Tableau II. Gradation de la GvHDa : pour chaque organe (EMBT 2008).

Tableau III. Gradation de la GvHDa selon la classification de Glucksberg (EMBT 2008).

Tableau IV. Propriétés des adénovirus humains.

Tableau V. Protéines de latence de l'EBV et leurs principales fonctions.

Tableau VI. Tumeurs liés à l'EBV(Rickinson 2014).

Tableau VII. Essais cliniques utilisant des CTL anti-EBV produit par culture cellulaire après allogreffe de CSH.

Tableau VIII. Essais cliniques utilisant des CTL anti-CMV après allogreffe de CSH.

Tableau IX. Essais cliniques utilisant des CTL Bi-virus et CTL Multivirus après allogreffe de CSH.

Tableau X. Résultats d'essais cliniques utilisant des CTL anti-viraux produit par technique immunomagnétique par le biais de multimères.

Tableau XI. Résultats d'essais cliniques utilisant des CTL produits par la technique immunomagnétique basée sur sécrétion de l'IFN- γ .

Tableau XII. Sécrétion d'IFN- γ évaluée par Elispot en réponse aux différents antigènes EBV (donneurs avec typage HLA classe I connu).

Tableau XIII. Fréquence des lymphocytes T spécifiques anti-ADV et anti-EBV chez les 3 donneurs sains évaluée par cytomètre et technique Elispot IFN- γ .

Tableau XIV. Résultats de production de CTL bispécifiques anti-ADV et anti-EBV.

Tableau XV. Facteur d'expansion (Le pourcentage de CD3 IFN- γ a été calculé sur le nombre de CNT).

Tableau XVI. Comparaison de la capacité d'expansion des lymphocytes CD4⁺IFN- γ ⁺ et CD8⁺IFN- γ ⁺ bi et mono-spécifiques.

Tableau XVII. Comparaison de spécificité antigénique en ICC et en Elispot IFN- γ .

INTRODUCTION

Partie 1 ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES

1. La greffe de cellules souches hématopoïétiques

Depuis la notion de cellules souches proposée par *Alexander Maksimov* en 1908 qui émettait l'hypothèse de l'existence de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) et la réalisation de l'anastomose vasculaire permettant la transplantation de vaisseaux et de rein par *Alexis Carrel* en 1912, les connaissances sur la transplantation et les CSH ont considérablement progressé grâce aux greffes de CSH effectuées chez les animaux, puis chez l'Homme au cours des années 1950-1960 (*ED Thomas* a initié la greffe de CSH chez l'Homme en 1955) (*Baron et al.*, 2003). En 1959, trois publications optimistes ont incité les médecins à s'intéresser à la greffe de CSH. Au Danemark, deux patients ayant une Leucémie Aiguë Lymphoblastique (LAL) à un stade avancé ont été traités par une radiothérapie intense et une greffe de moelle osseuse avec leur fratrie jumelle. En France, 4 victimes d'irradiation sur 5 ont été traitées par le Dr *Mathé* avec une greffe de moelle osseuse allogénique (*Mathé et al.*, 1965). Enfin, un patient ayant une LAL au stade terminal a été traité avec succès par une autogreffe. Ensuite, grâce à la découverte par *Jean Dausset* du système HLA (*Human Leukocyte Antigen*), puis à la mobilisation des cellules souches périphériques (CSP) dans le sang circulant, la découverte des CSH dans le sang de cordon et la mise en évidence de l'effet *Graft versus Leukemia* (GvL), qui représentent les principales avancées dans le domaine, le recours à la greffe de CSH s'est généralisé.

Deux grands types de greffes de CSH existent : l'**autogreffe** et l'**allogreffe**. L'autogreffe est réalisée avec les cellules souches du patient lui-même. L'allogreffe est réalisée dans la majorité des cas, à partir des CSH d'un donneur sain compatible, qui peut être géno-identique lorsqu'il est issu de la fratrie du receveur et a hérité des mêmes allèles HLA parentaux que le receveur, ou non apparentée lorsque le donneur est inscrit sur un fichier de donneurs volontaires et que le typage HLA allélique est très proche voire similaire à celui du receveur.

Les principales sources de CSH utilisables lors d'une allogreffe sont :

La moelle osseuse (MO) : il s'agit de la source historique de CSH. Elle est prélevée chez le donneur sous anesthésie générale au niveau des crêtes iliaques. On peut prélever chez le donneur au maximum 20ml/kg de poids du donneur. Elle permet une sortie d'aplasie en environ 21 jours en situation autologue. Le prélèvement est invasif mais représente toujours aujourd'hui une source importante de CSH en situation allogénique.

Les Cellules Souches Périphériques (CSP) : Elles sont obtenues par aphérèse après mobilisation des CSH chez le donneur par injection de facteur de croissance granulocytaire (G-CSF). Elles permettent une sortie d'aplasie en environ 11 jours en situation autologue. La quantité de CSH

CD34+ greffées est plus importante qu'avec la MO. De par la mobilisation par G-CSF, les cellules injectées sont plus matures et on observe avec ce type de greffon un taux plus important de réaction du greffon contre l'hôte, Graft *versus* Host Disease (GvHD), dû à l'action des lymphocytes T du greffon contre les tissus du receveur.

Anasetti *et al* ont montré qu'il n'y a pas de différence en terme de survie après allogreffe de MO ou de CSP. Cependant, on observe une proportion plus importante de non prise avec les greffes de MO et significativement plus de GvHD chronique survenant à plus de 100 jours post-greffe avec les CSP (Anasetti *et al.*, 2012).

Les CSH issues du sang de cordon : Le sang de cordon est collecté à la naissance des bébés dans des maternités habilitées, après obtention du consentement maternel, puis cryoconservé dans des banques de sang de cordon, après réduction de volume. Ces banques se sont développées afin d'une part, d'augmenter la diversité des typages HLA et d'autre part, d'assurer une disponibilité rapide des greffons. Cependant, cette source de greffons présente quelques inconvénients tels qu'une richesse moindre en CSH, avec une sortie d'aplasie plus tardive, en environ 30 jours et un retard de reconstitution immunitaire, du fait de l'immaturité des cellules injectées. De plus, il ne sera pas possible d'avoir recours au donneur une seconde fois, notamment pour recueillir des lymphocytes pour favoriser l'effet GvL chez le receveur.

Chaque source présente des avantages et des inconvénients qui sont synthétisés dans le Tableau I. Le choix de la source est souvent fonction de la pathologie, de l'âge de receveur et de la disponibilité de CSH HLA compatibles (Cheuk *et al.*, 2013).

Tableau I. Comparaison des sources différentes: MO; CSP et SP

	MO	CSP	Sang du cordon
Délai nécessaire à la recherche et l'obtention du greffon	3-6 mois	3-6 mois	2-4 semaines
Volume de prélèvement	500-2000 ml	50-300 ml	25-150 ml
Effets indésirables pour les donneurs	Risque d'infection, de lésions, d'hémorragie et risques liés à l'anesthésie générale etc...	Risque d'hémorragie, d'infection, de thrombose, d'hypotension, de troubles électrolytiques, etc...	Aucun
Dose minimale pour greffe	CNT: 2×10^8 /kg	CD34+: 2×10^6 /kg	CNT: 2.5×10^7 /kg
Possibilité à donner une dose de cellules souches supplémentaires	Possible	Possible	Impossible
Typage HLA	Plus strict (9-10 sur 10 identique, en allélique)	Plus strict (9-10 sur 10 identique, en allélique)	Moins strict (4-6 sur 6 identique, générique)
Sortie d'aplasie (PNN>500)	Environ 3 semaines	Environ 2 semaines	Environ 4 semaines
Reconstitution immunitaire	Rapide	Rapide	Lente
Risque de GvHD	Moyen	Haut	Faible
Risque d'infection post Greffe	Faible	Faible	Elevé
Risque de transmission de virus latents	Elevé	Elevé	Faible
Possibilité de transmission CMV	Elevé	Elevé	Faible
Risque de rechute pour les patients à haut risque	Elevé	Faible	Elevé

2. Effet bénéfique et Effets néfastes de l'allogreffe

2.1 Effet bénéfique : L'effet du greffon contre la leucémie (Effet GvL)

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

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

Enfin, l'induction d'une rémission chez les patients en rechute par l'injection de lymphocytes du donneur (DLI) est la preuve la plus évidente du rôle de l'alloréactivité (Fefer *et al.*, 2007). L'efficacité clinique de l'effet GvL dépend du type d'hémopathie maligne. En effet, celui-ci est très important dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) : environ 15% des patients greffés en phase chronique avec une moelle non manipulée présentent une rechute contre plus de 70% lorsque la moelle est déplétée en cellules T (Dhédin et Vernant, 2010). Dans cette pathologie, l'effet GvL peut être potentialisé par l'injection de lymphocytes du donneur (DLI) dans la prévention de la rechute. L'effet GvL est également notable dans la Leucémie Aiguë Myéloïde (LAM) qui bénéficie de

l'apport des DLI en présence de signes précurseurs ou avérés de rechute (Dhédin et Vernant, 2010). En revanche, l'effet GvL semble moins efficace dans les LAL, probablement du fait d'une présentation antigénique moins performante, les cellules présentatrices d'antigène (CPA) étant d'origine myéloïde.

2.1.1 Les différents antigènes intervenant dans l'effet GvL

Bien que les cibles antigéniques de l'effet GvL soient encore peu connues, elles peuvent néanmoins être classées en trois grandes catégories :

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

2.2 Effet néfaste : La réaction du greffon contre l'Hôte (GvHD)

La GvHD correspond à l'attaque par les cellules immunitaires du donneur des cellules des tissus du receveur. Environ 70% des patients allogreffés développent une GvHD, et 30% en décèdent. Les trois principes fondamentaux nécessaires au développement d'une GvHD ont été décrits par Billingham en 1961:

- le greffon doit contenir des cellules immunocompétentes

- il doit subsister une incompatibilité en terme d'antigènes majeurs ou mineurs d'histocompatibilité entre le receveur et le donneur

- l'hôte doit être suffisamment immunodéprimé pour être incapable de rejeter le greffon (Sackstein R 2006).

La GvHD peut être aiguë (GvHDa) ou chronique (GvHDc) en fonction du délai de survenue post-greffe. En effet, la GvHDa survient dans les 100 premiers jours post-greffe. La GvHDc qui s'apparente à un syndrome auto-immun avec des manifestations cliniques variables pouvant atteindre de nombreux organes survient après J₁₀₀. Cependant, avec les nouveaux conditionnements non myéloablatifs (NMA), on observe des manifestations cliniques typiques des GvHDa après J₁₀₀. Ainsi, depuis 2005, la distinction entre GvHDa et GvHDc est faite sur le type de manifestations cliniques et non plus sur le délai de survenue après la greffe.

2.2.1 Classification de la GvHD

La GvHD est habituellement classée en grade en fonction du degré de sévérité. Les grades de la GvHDa est défini selon la classification de Glucksberg en fonction du nombre de tissus atteints (peau, intestins, foies, etc...) et de la gravité d'atteinte de chaque tissu (Tableau II et III).

Tableau II. Gradation de la GvHDA : pour chaque organe (EMBT 2008)

Stade clinique	PEAU (rash maculo-papuleux) (% surface corporelle)	INTESTIN (Diarrhée) (ml/jour)	FOIE (Bilirubine) (en $\mu\text{mol/L}$)
+	<25%	Diarrhée > 500ml/j <i>ou</i> nausées, anorexie ou vomissements.	34-50
++	25-50%	Diarrhée > 1000 ml/j	51-102
+++	>50%	Diarrhée > 1500 ml/j	103-255
++++	Erythrodermie généralisée avec formation de bulles et desquamation (epidermolyse bulleuse)	Diarrhée > 1500 ml/j et douleurs abdominales sévères +/- iléus +/- sang dans les selles	>255

Tableau III. Gradation de la GvHDA selon la classification de Glucksberg (EMBT 2008)

Grade	Peau	Intestin ou Foie	Etat général
I	+ à ++++	0	0
II	+ à +++	+	+
III	++ à +++	++ à +++	++

De même, la GvHDc est maintenant définie selon la classification de la workshop du NIH en fonction du nombre d'organes ou de sites impliqués en prenant en compte l'impact fonctionnel (EMBT 2008). Un score est attribué pour chaque organe selon la sévérité de l'atteinte : de 0 (pas d'atteinte) à 3 (atteinte sévère). Après avoir attribué un score à chaque organe, il est retenu un diagnostic de :

* *Forme mineure* (GvHDc 1) : atteinte de 1 ou 2 organes de score 1 maximum

* *Forme modérée* (GvHDc 2) :

- atteinte d'un organe (score 2),
- ou au moins 3 organes (de score 1 maximum)

- ou atteinte des poumons (score 1)

* *Forme sévère (GvHDc 3) :*

- atteinte d'au moins un organe (score 3)
- ou atteinte du poumon (score 2)

2.2.2 La physiopathologie de la GvHDa

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

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

Ferrara et Reddy ont proposé trois étapes pour le mécanisme de la GvHD aiguë (Ferrara et Reddy, 2006):

La GvHDa se décompose schématiquement en 3 phases (Figure 1) :

- **Pré-phase (Lésions tissulaires et activation des cellules présentatrices d'antigène) :**

Cette première phase débute avant la greffe, au moment du conditionnement. Des lésions tissulaires de l'épithélium et de l'endothélium provoquées par le conditionnement myéloablatif entraînent la sécrétion massive, par les cellules de l'hôte, de cytokines de l'inflammation comme le Tumor Necrosis Factor (TNF)- α et l'IL-1. Les cytokines vont activer les cellules présentatrices des antigènes (CPA) et entraînent une surexpression des molécules d'adhésion, des molécules de co-stimulation et des molécules HLA du receveur. Cette activation va induire l'apoptose des cellules endothéliales de la muqueuse du système digestif qui sera endommagée. L'altération de la muqueuse digestive contribue à la libération du Lipopolysaccharide (LPS) des bactéries commensales dans la circulation qui a pour conséquence l'activation des macrophages *via* les récepteurs Toll (Toll Like Receptors : TLR). Les macrophages libèrent alors des cytokines inflammatoires.

- **Phase afférente (activation, différenciation et migration des lymphocytes T du donneur) :**

Les Lymphocytes T (LT) présents dans le greffon vont être activés après reconnaissance des peptides considérés comme étrangers présentés par les molécules HLA des CPA. Les travaux de Schlomchik ont montré que les CPA de l'hôte jouaient un rôle pré-dominant dans le déclenchement de la réaction de GvHD, notamment par le biais de molécules HLA de classe I (Schlomchik *et al.*, 1999). Koyama *et al.*, ont apporté la preuve que les CPA du receveur étaient également impliquées dans le déclenchement d'une GvHD dépendante des molécules HLA de classe II (Koyama *et al.*, 2012). De plus, ils ont montré que les CPA d'origine non hématopoïétique étaient particulièrement efficaces pour induire cette GvHD contrairement aux CPA hématopoïétiques comme les DC conventionnelles ou plasmocytoïdes. De plus, les CPA du donneur (du greffon), exclusivement d'origine hématopoïétique, jouent un rôle important dans l'activation des lymphocytes T CD4⁺ par présentation indirecte de peptides. Des études de déplétion, ont mis en évidence que les DC conventionnelles sont impliquées dans ce processus (Markey *et al.*, 2009).

Ces phénomènes entraînent des modifications biochimiques au sein des Lymphocytes T (LTc) conduisant à l'activation de protéines kinases C et de tyrosine kinases, aboutissant à la transcription des gènes de l'IL-2, IL-12, de l'IFN- γ et de leurs récepteurs. Ces cytokines produites en réponse à une stimulation vont participer à l'activation et l'induction de la cytotoxicité T, de la réponse NK de cellules du donneur et à l'activation des cellules phagocytaires de l'hôte.

- **Phase efférente (Effet délétère des cytokines inflammatoires) :**

Il s'agit de la phase la plus complexe et la moins bien connue. Elle correspond à la lyse des cellules des tissus cibles.

La synergie entre la libération préalable de cytokines pro-inflammatoires lors de l'étape de conditionnement et les lésions secondaires à l'activation lymphocytaire médiée par les cytokines TH1 inflammatoires et les effecteurs cellulaires (LTc et cellules NK) aboutit aux lésions de la GvHDa et induisent l'apoptose des cellules des tissus cibles. Les 3 voies habituelles de destruction tissulaire vont alors entrer en jeu. Les mécanismes apoptotiques peuvent être médiés par la voie des perforines-granzymes B, par le système Fas/Fas ligand et des lésions peuvent être directement causées par les cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IFN- γ et TNF- α).

L'ensemble des cytokines sécrétées constitue ce que Ferrara nomme : « l'orage cytokinique »

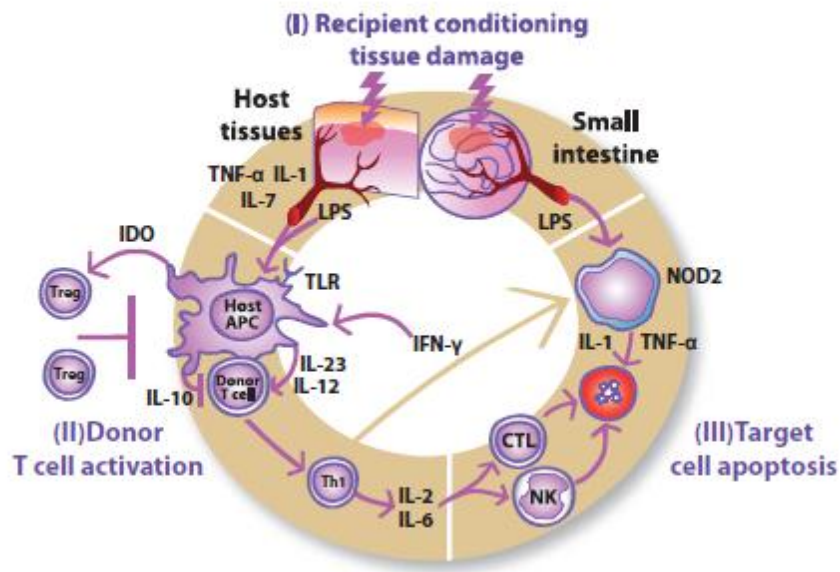


Figure 1. Physiopathologie de GvHD (3 phases) (Harris *et al.*, 2013). **Phase I:** La sécretion des cytokines inflammatoire suite à les dommages tissulaires après le conditionnement et l’activation des CPAs du receveur. **Phase II:** L’activation lymphocytaire et leur sécretion cytokinique. **Phase III:** La prolifération et différenciation des lymphocytes T cytotoxiques et NK , et les effects néfastes des ces cellules effectrices.

2.2.3 Les manifestations cliniques de la GvHDa et les traitements

2.2.3.1 Description clinique et facteurs de risque :

La GvHDa se caractérise par trois atteintes préférentielles : des lésions cutanées (érythèmes), des lésions hépatiques (cholestases), des lésions du tube digestif (diarrhées), ainsi que par une atteinte diffuse du système immunitaire et du thymus en particulier (Ferrara et Deeg, 1991). Elle se produit chez 35 à 45% des patients qui reçoivent un greffon géno-identique et chez 60 à 80% des patients qui reçoivent un greffon non apparenté (Ferrara *et al.*, 2009).

Les facteurs associés à la survenue d’une GvHDa sont (Koreth et Antin, 2008):

- L’incompatibilité HLA sur un ou plusieurs loci.

- L'origine des cellules du greffon (un greffon issu d'un sang placentaire contient des cellules tolérogènes qui contribuent à moins de GvHDa comparé à la Moelle Osseuse et aux CSP).
- La dose de lymphocytes T (une déplétion de 2-3 Log des lymphocytes T CD3+ peut réduire le risque de GvHDa).
- Les autres facteurs de risque concernent l'âge élevé du receveur ou du donneur, un donneur de sexe féminin, les maladies sous-jacentes comme une hémopathie en phase évolutive, un conditionnement renforcé et la survenue d'une infection (en particulier liée au cytomégalo virus (CMV)).

2.2.3.2 Prophylaxie de la GvHDa

Une prophylaxie de la GvHDa est systématiquement instaurée au décours de l'allogreffe. Elle est fonction du type de greffon (moelle osseuse, CSP ou sang placentaire), du type de donneur (apparenté ou non) et du type de conditionnement. Cette prophylaxie vise principalement à inactiver ou éliminer les lymphocytes T du greffon soit en réalisant une déplétion T *in vivo* par le sérum anti-lymphocytaire (SAL) ou *in vitro*, soit en inhibant leur prolifération en utilisant du méthotrexate ou du mycophénolate mofétil ou leur activation *via* l'usage d'inhibiteurs de la calcineurine tels que la ciclosporine ou le FK 506.

2.2.3.3 Traitement

En cas de survenue d'une GvHDa, et ce malgré la prophylaxie administrée, le traitement de première ligne consiste en l'administration de corticoïdes tels que la méthylprednisone, à la dose de 2 mg/kg/j, puis selon la réponse clinique à 14 jours, une décroissance de la corticothérapie sera réalisée progressivement (Martin *et al.*, 2012).

En cas de cortico-résistance ou de cortico-dépendance, des traitements de deuxième ligne sont proposés. Il n'y a pas de consensus sur le traitement de 2ème ligne. Le mycophénolate mofétil, les inhibiteurs du récepteur de l'IL-2, les anticorps anti-TNF α , le sérum anti-lymphocytaire (SAL), des bolus de méthotrexate ou la photophérèse extra-corporelle (PEC) peuvent être indifféremment utilisés.

2.2.4 La GvHD chronique

2.2.4.1 Description clinique et facteurs de risque :

La GvHDc est susceptible de survenir chez environ 33% des receveurs ayant reçu un greffon géno-identique, et chez 49% des receveurs ayant reçu un greffon non apparenté (Michallet *et al.*, 2001).

Les facteurs de risque sont l'âge élevé du patient ou du donneur, le degré de compatibilité tissulaire, l'utilisation d'un greffon issu d'un donneur non apparenté, l'utilisation de CSP par rapport à la MO, la survenue de la GvHDa préalable et des injections de lymphocytes T du donneur (Dean et Bishop, 2003; Cutler *et al.*, 2001).

2.2.4.2 Traitement de la GvHDc

Le traitement de première ligne comporte des corticoïdes associés éventuellement à de la ciclosporine, selon la sévérité des atteintes.

Le traitement de 2ème ligne n'est pas codifié, mais certains immunosuppresseurs semblent plus efficaces selon les atteintes. Par exemple, on reconnaît l'efficacité de la photochimiothérapie extracorporelle en cas d'atteinte cutanée et des inhibiteurs de la tyrosine kinase dans les formes sclérodermiques. D'autres traitements sont utilisés en 2ème ligne tels que le rituximab ou les inhibiteurs de mTor (rapamycine).

Le traitement de la GvHDc s'accompagne d'une prophylaxie anti-infectieuse et de mesures associées telles que les larmes artificielles, le support nutritionnel et la crème solaire protectrice (Wolff *et al.*, 2010).

2.2.5 Nouvelles approches dans le traitement de la GvHD (Mastaglio *et al.*, 2010)

Trois approches de thérapie cellulaire ou génique intéressantes sont susceptibles d'être utilisées pour anticiper ou traiter la GvHD :

- La manipulation du greffon

La déplétion du greffon en lymphocytes T est réalisée pour les greffes à haut risque de GvHD telles que les allogreffes haplo-identiques (en situation partiellement incompatible). Elle est effectuée par la sélection positive des cellules CD34+ (Ho et Soiffer, 2001). En revanche, elle présente des

inconvenients majeurs, tels qu'un risque de non prise ou de rejet plus élevé, une incidence de rechutes plus élevée, et une aggravation du déficit immunitaire post-greffe (Dean et Bishop, 2003). Pour éviter ces complications, la réinjection de lymphocytes T du donneur déplétés en lymphocytes T alloréactifs a été proposée (André-Schmutz *et al.*, 2002) ou encore la réinjection de lymphocytes T du donneur transfectés avec le gène de la thymidine kinase qui rend les cellules transfectées sensibles au Gancyclovir pour traiter les GvHD éventuellement déclenchées par cette immunothérapie (Tiberghien *et al.*, 2001).

- Les lymphocytes T régulateurs (Treg)

Plusieurs essais cliniques d'injections de lymphocytes T régulateurs en prévention ou en traitement de la GvHD survenant au décours d'une allogreffe de CSH sont actuellement en cours. Nous rapporterons ici les résultats de 2 études publiées qui illustrent bien la diversité des stratégies de productions et des contextes d'administration.

Brunstein *et al.* rapportent les résultats d'une étude de faisabilité chez 23 patients ayant reçu une double allogreffe de sang placentaire puis ayant reçu une dose ($0,1$ à 30×10^5 Treg/kg) de phénotype : $CD25^+CD127^-FoxP3^+$, préparés à partir d'une troisième unité de sang placentaire après sélection immunomagnétique des cellules $CD25^+$ puis expansion en culture. Aucun effet indésirable n'a été rapporté et en comparaison d'un groupe contrôle historique n'ayant pas reçu de Treg, les auteurs décrivent une diminution de l'incidence de la GvHD de grade II-IV (43 vs 61, $P=0,05$) (Brunstein *et al.*, 2011).

L'équipe de Vélardi a préparé des Treg à partir d'une leukaphérèse grâce à une technique immunomagnétique en deux étapes : déplétion $CD8$ et $CD19$ suivie d'une sélection positive $CD25^+$ (Di Ianni *et al.*, 2011). Dans cette étude, 28 patients avec hémopathie maligne de haut risque ont reçu un greffon haplo-identique de cellules souches périphériques après sélection positive $CD34^+$ ainsi qu'une dose de lymphocytes T conventionnels ($0,5$ à 1×10^6 $CD3/kg$). Au préalable, à J-4 de la transplantation, les patients ont reçu une dose de 2×10^6 Treg/kg. Aucune prophylaxie de la GvHD

n'a été administrée. Parmi les 28 patients inclus dans l'étude, 26 sont évaluable. Deux patients sur 26 ont présenté une GvHda de grade supérieur ou égal à II mais aucun patient n'a présenté de GvHDc.

- Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Les CSM ont des propriétés immunomodulatrices et leur rôle dans la prévention de la GvHD a été confirmé dans des modèles animaux comme la souris et le chien (Baron et Storb, 2012).

Chez l'Homme, quatre études cliniques s'intéressant à l'effet des CSM *en prophylaxie* de la GvHD ont montré une diminution du grade de la GvHD suggérant un effet contributif des CSM dans la prévention de la GvHD (Lazarus *et al.*, 2005; Ning *et al.*, 2008; Baron *et al.*, 2010; Kuzmina *et al.*, 2012). Dans ces 4 études, 113 patients ont reçu des CSM en même temps que la greffe de CSH. Dans les 3 premières études, toutes de phase I, la bonne tolérance des CSM a été rapportée et leur impact sur la diminution de l'incidence et de la gravité de la GvHD a été suggéré. Lazarus *et al.*, ont rapporté que seulement 28% des patients qui avaient reçu une allogreffe génoidentique avaient développé une GvHda de grade II-IV. Le faible effectif et l'absence de groupe contrôle constituent ici des limites pour l'interprétation des résultats (Lazarus *et al.*, 2005). Baron *et al.*, a rapporté chez 20 patients allogreffés recevant des CSM une incidence cumulative sur 100 jours de la GvHda de 45% et une incidence cumulée de décès liés à la GvHD à un an de 10% et l'a comparée à un groupe historique : 56% et 31% respectivement (Baron *et al.*, 2010). La seule étude d'efficacité, comparative et randomisée a montré une diminution significative de l'incidence de la GvHda puisqu'un patient sur 19 a présenté une GvHD (5,3%) dans le groupe recevant les CSM en prophylaxie au moment de la sortie d'aplasie post-allogreffe de CSH comparé à 6/18 patients dans le groupe contrôle. Cependant, les auteurs eux-mêmes soulignent le faible effectif de l'étude (Kuzmina *et al.*, 2012).

Le rôle des CSM dans le *traitement* de la GvHD cortico-résistante a été rapporté pour la première fois chez un enfant de 9 ans par K Le Blanc (Le Blanc *et al.*, 2004). Une rémission complète d'une GvHda de grade IV résistante à tous les traitements immunosuppresseurs a été observée suite à

l'administration de CSM haplo-identiques. Puis, la même équipe a publié une étude menée par l'EBMT et portant sur 55 patients (30 adultes et 25 enfants) présentant une GVHDa cortico-résistante et traités avec des CSM allogéniques provenant de donneurs intra-familiaux géno-identiques ou haplo-identiques ou de donneurs non apparentés (Le Blanc *et al.*, 2008). Aucune toxicité n'a été déplorée. Une rémission complète de la GvHD a été observée chez 30 patients et une amélioration chez 6 patients. La mortalité liée à la transplantation (TRM) à un an de la greffe était significativement plus faible chez les patients en rémission complète alors que la survie globale à 2 ans était significativement augmentée. Ces deux études démontrent l'effet des CSM sur la GvHDa cortico-résistante et mettent en évidence l'efficacité et la sécurité des CSM provenant d'un donneur tierce partie (Kim *et al.*, 2013). La spécialité Prochymal, CSM produites par la société Osiris, a été utilisée dans une étude clinique randomisée en association avec les corticoïdes en première ligne de traitement de la GvHD. Une réponse initiale a été observée chez 94% des patients, en l'absence de toute toxicité (Kebriaei *et al.*, 2009). Cette spécialité a également été utilisée dans une étude compassionnelle chez 12 enfants présentant des GvHDa de grade II à IV cortico-résistantes. Une réponse complète a été observée chez 7/12 patients, les autres présentant une réponse partielle (Prasad *et al.*, 2011). D'autres études ont été publiées avec de faibles nombres de patients (Von Bonin *et al.*, 2009; Lucchini *et al.*, 2010). Dans l'ensemble, ces études soulignent une efficacité des CSM dans le traitement de la GvHDa. Cependant, des essais cliniques randomisés plus larges sont encore nécessaires.

Toutes les études mentionnées ci-dessus ont utilisé des CSM produites à partir de Moelle osseuse. On peut noter que des CSM de tissu adipeux (n=6) ont été utilisées dans le traitement des GvHDa de grade III-IV cortico-réfractaires permettant d'obtenir une réponse complète dans 83% des cas (Fang *et al.*, 2006). De même, des CSM de sang de cordon (n=2) ont été administrées pour des GvHDa de grade IV conduisant à une réponse complète dans les 2 cas (Wu *et al.*, 2011).

Peu d'études se sont intéressées à l'effet des CSM dans le traitement de la GvHDc et la plupart ne concernent que peu de patients (de 3 à 5 patients) (Muller *et al.*, 2008; Lucchini *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010). Seule l'étude pilote de Weng *et al.* a porté sur 19 patients qui ont reçu des CSM en même temps que les traitements immunosuppresseurs préconisés (Weng *et al.*, 2010). Si quelques rémissions complètes sont observées (21%), ce sont des réponses partielles qui prédominent (52%). Ces résultats sont retrouvés dans les trois études à faible effectif. Une fois encore, des études incluant un plus grand nombre de patients sont nécessaires pour statuer sur une efficacité des CSM sur la GvHDc et définir les conditions de cette efficacité.

2.3 Modalités favorisant l'effet GvL et limitant la GvHD

Des stratégies pour séparer la GvHD et l'effet GvL ont été développées au cours des deux dernières décennies. La plupart de ces approches ont été basées sur le paradigme que GvHD et GvL peuvent être séparés par (i) l'abrogation de la libération des cytokines pro-inflammatoires à l'aide d'un conditionnement d'intensité réduite (RIC) souvent complété par l'injection de DLI ou (ii) l'augmentation de la spécificité des cellules immunitaires des donneurs contre des antigènes associés à une tumeur par la thérapie génique, la vaccination ou d'autres formes de manipulation. De nouvelles approches émergent actuellement pour contribuer à séparer les effets GvHD et GvL (Mcclune et Weisdorf, 2010; Roddie et Peggs, 2011; Brusic et Wu, 2012; Casucci *et al.*, 2012) :

- La modulation du microenvironnement pro-inflammatoire du receveur en agissant sur les cytokines telles que l'IL-23 ou l'IL-21, les cellules dendritiques ou les Toll Like Receptors (TLR).
- La modulation de la migration des cellules du donneur en agissant sur l'expression des selectines ou chimiokines (CD62L ou CCR2) contribuant à la migration des cellules du greffon. Les cellules sont alors orientées vers la moelle osseuse où elles exercent un effet GvL plutôt que vers les tissus comme la peau, l'intestin ou le foie où elles génèrent la GvHD.
- La modulation de l'effet des LT par administration de LT régulateurs.

2.4 La non-prise ou Rejet de greffe

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

- la disparité HLA entre donneur et receveur (Mehta *et al.*, 2004),
- l'utilisation d'un conditionnement non myéloablatif,
- l'utilisation d'un greffon pauvre en cellules CD34+,
- la déplétion en cellules T du greffon (Green *et al.*, 1999).

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

- La modification du conditionnement en le rendant plus immunosuppresseur afin de détruire les lymphocytes T résiduels de l'hôte (utilisation de SAL, ...).
- L'augmentation du nombre de cellules souches périphériques CD34+ contenues dans le greffon par l'utilisation d'un greffon de CSP plus riche en cellules CD34+ qu'un greffon médullaire.

En cas de rejet, dans quelques cas, une seconde greffe a été réalisée avec succès. Il apparaît alors préférable de choisir un greffon de CSP (Molina *et al.*, 1995).

3. Reconstitution Immunitaire

Les systèmes hématopoïétique et immunitaire du receveur détruits par le conditionnement de l'allogreffe, se reconstituent à partir des cellules contenues dans le greffon (CSH et cellules immunitaires).

Pour le système hématopoïétique, la récupération complète des 3 lignées (leucocytes, hématies et plaquettes) nécessite environ 100 jours.

Pour le système immunitaire, il faut distinguer la reconstitution de l'immunité cellulaire de celle de l'immunité humorale.

3.1 Cinétique de la reconstitution immunitaire (Storek et al., 2008)

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

Les polynucléaires neutrophiles en quantité très réduite pendant la phase d'aplasie (neutropénie) suivant le conditionnement, se reconstituent en environ 14 jours après une allogreffe de CSP, 21 jours après une allogreffe de MO et 30 jours après une allogreffe de sang placentaire. Les infections survenant pendant cette phase sont principalement des infections bactériennes.

Les cellules NK impliquées dans l'immunité innée se reconstituent très rapidement. Elles se normalisent dans la première semaine et fonctionnellement dans le premier mois suivant l'allogreffe ou au maximum en trois mois. La sous-population NK qui se développe en premier est CD56bright c'est-à-dire sécrétrice de cytokines. Puis, très rapidement, apparaît la sous-population NK CD56dim cytotoxique. La contraction de la population NK peut ne survenir qu'après 1 an.

Le temps de normalisation pour les cellules dendritiques (DC) varie en fonction de leur type : il faut 6 mois pour les cellules de Langerhans et environ 1 an pour les DC conventionnelles ou plasmacytoides (Geddes et Storek, 2006).

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

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

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

3.2 La reconstitution immunitaire T

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la reconstitution immunitaire T fait appel à deux mécanismes distincts qui se succèdent dans le temps. Le premier est une expansion des lymphocytes T matures présents dans le greffon et le second, plus tardif, une génération *de novo* de lymphocytes T naïfs dépendante du thymus du receveur. Cette deuxième étape est indispensable pour l'obtention d'un répertoire T diversifié, sans lequel le risque d'infections opportunistes et de rechute leucémique est élevé et aggravé par la survenue d'une GvHD nécessitant la mise en place d'un traitement immunosuppresseur (Seggewiss *et al.*, 2010).

3.2.1 Expansion des lymphocytes T du donneur

Les lymphocytes T matures du donneur répondent rapidement aux agents pathogènes rencontrés antérieurement par le donneur. Ils sont le plus fréquemment dirigés contre les herpès virus qui se réactivent périodiquement, comme le CMV ou le virus d'Epstein Barr (EBV) qu'ils maintiennent sous contrôle (Toubert et Charon, 2001). Ils sont à l'origine de la majorité des expansions oligoclonales rencontrées chez les adultes sains, particulièrement dans la population CD8+. En effet, les lymphocytes T CD8+ sont sujets à cette expansion, conduisant à l'inversion fréquente du rapport CD4/CD8 après allogreffe de CSH (Toubert *et al.*, 2001). Les LT matures sont responsables de l'apparition de l'effet GvHD (les cellules T alloréactives) mais également de la protection contre la rechute et les maladies infectieuses (les cellules T non alloréactives) (Koh *et al.*, 2007). D'ailleurs, la fréquence et la sévérité de la GvHD sont moindres lorsque le greffon est déplété en lymphocytes T ou dans les greffons de sang placentaires qui ne contiennent pas cette population. De plus, dans ce dernier contexte, la survenue d'infections est plus fréquente.

3.2.2. Reconstitution des lymphocytes T naïfs

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

La contribution du thymus dans la récupération des lymphocytes T naïfs dépend de plusieurs facteurs: le degré d'involution thymique associé à l'âge, la prise des CSH du greffon, et l'étendue de

l'altération thymique liée aux traitements administrés avant la greffe et au cours du conditionnement et de la GvHD. De plus, il est clairement admis que la GvHD est délétère pour le thymus. En effet, plusieurs études rapportent que la GvHD est associée à un répertoire T restreint et à un taux de TRECs diminué (Weinberg *et al.*, 2001).

3.2.3 Stratégies pour renforcer la reconstitution de lymphocytes T (Brink *et al.*, 2013)

- *Les facteurs de croissance*

Des études pré-cliniques ont montré le rôle du FGF-7 (Fibroblast Growth Factor 7, également connu sous le nom de KGF, Keratinocyte Growth Factor) dans la protection des cellules épithéliales thymiques (TEC). En effet, après exposition des TEC à du FGF7 exogène, les cellules stromales thymiques prolifèrent et expriment plusieurs facteurs de croissance et de différenciation qui favorisent la thymopoïèse. Ce facteur de croissance a été évalué dans des études cliniques (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2009). Une première étude clinique comparative portant sur 100 patients, 60 patients recevant la palifermine (protéine de 140 acides aminés stabilisée par la suppression des 23 premiers acides aminés N-terminaux à la différence du KGF humain endogène) n'a pas montré de bénéfice important ni sur l'incidence de GvHD ni sur celle des infections à CMV (Levine *et al.*, 2008).

- *Les cytokines*

L'interleukine-2 (IL-2) présente des effets pléiotropiques sur la réponse immunitaire. Les études cliniques ont montré que l'IL-2 peut améliorer le nombre de cellules NK et pourrait augmenter l'effet GvL, conduisant à une réduction des taux de rechute après HSCT (Perillo *et al.*, 2002). De plus, l'administration d'IL-2 lors de l'injection de lymphocytes du donneurs (DLI) a permis de mettre en rémission complète des patients qui n'avaient pas répondu à une DLI seule (Nadal *et al.*, 2004). Cependant il a été montré que l'IL-2 avait tendance à favoriser le développement de LT régulateurs, population fortement consommatrice de cette cytokine au détriment des cellules NK (Mahmud *et al.*, 2013).

L'IL-7 peut promouvoir la survie et la différenciation des cellules immatures triple négatives et des thymocytes matures simple positifs. De plus, elle augmente le nombre de cellules T par expansion périphérique sans génération *de novo* (Sportès *et al.*, 2008). Une étude clinique de phase I consistant à traiter 12 patients avec trois doses différentes d'IL-7 a montré une augmentation du nombre des lymphocytes CD3, CD4 et CD8, une amélioration de leur fonction et une plus grande diversité des TCR (Perales *et al.*, 2012).

L'IL-15 peut renforcer la reconstitution immunitaire par promouvoir la survie et prolifération de cellules NK et lymphocyte T CD8 (Alpdogan *et al.*, 2005).

- *L'hormone de croissance*

L'hormone de croissance peut renforcer la reconstitution immunitaire en favorisant la production d'IGF-1 (Insulin Growth Factor 1) qui donne un signal anti-apoptose (Taub et Longo, 2005).

3.2.4 Facteurs influençant la reconstitution des lymphocytes T

- *L'âge des patients*

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

- *La source du greffon*

Le type de greffon influe sur la reconstitution immunitaire. Une étude sur 95 patients après allogreffe de CSH en situation : CSP génoidentique (n=33), CSP non apparentée (n=33) ou provenant de sang placentaire (n= 29), montre que le niveau de lymphocytes CD3, CD4 et CD8 est plus faible au bout de 6 mois chez les patients ayant reçu une greffe de sang placentaire comparé aux patients ayant reçu greffon génoidentique ou non apparenté (Kanda *et al.*, 2012) . En effet, les greffons de sang placentaire renferment très peu de lymphocytes T matures susceptibles de s'expandre. De plus, le sang placentaire contient des Treg possédant des propriétés suppressives supérieures à celles des Treg de l'adulte. Ces facteurs expliquent la fréquence élevée des épisodes infectieux dans les allogreffes de sang placentaire (Seggewiss et Einsele, 2010).

- *La manipulation du greffon*

La déplétion en lymphocytes T alloréactifs *in vitro* ou *in vivo* visant à réduire l'incidence de la GvHD peut avoir pour conséquence de retarder la reconstitution de lymphocytes T.

- *Le conditionnement*

Le conditionnement de type myéloablatif par rapport au conditionnement de type non myéloablatif induit une altération plus grave des tissus thymiques, limitant la reconstitution des lymphocytes T *de novo*.

- *Le degré de compatibilité du greffon et la maladie du greffon contre l'hôte*

3.3 La reconstitution immunitaire B

L'immunité humorale comprend majoritairement les anticorps sécrétés par les lymphocytes B et les protéines du complément. De plus, la mise en place d'une réponse immunitaire humorale optimale nécessite l'interaction des lymphocytes B avec les lymphocytes T CD4⁺ TH2.

La fonction des lymphocytes B ne se normalise qu'après 2 ans bien que leur nombre commence à se normaliser à partir de 3 mois. Pourtant, grâce à la demi-vie longue des Ig G dans le sérum et la survie des plasmocytes après le conditionnement, le dosage des Ig peut être normal sans baisse importante (Bemark *et al.*, 2012).

Les lymphocytes B suivent 5 étapes de développement selon le modèle actuel : les lymphocytes B transitionnels, les lymphocytes B naïfs, les lymphocytes B du centre germinatif, les lymphocytes B mémoires et les lymphocytes B sous forme plasmocytaire. Ces lymphocytes de phases différentes ont des phénotypes différents (Bemark *et al.*, 2012). La population B a initialement été décrite comme normalisée dans le sang périphérique dans les 3 mois post-greffe. Cependant, cette population B émergente était fortement CD5⁺, CD38⁺, IgM⁺ et IgD⁺ (Storek *et al.*, 1993). De plus, elle était fonctionnellement déficiente avec un défaut de réponse proliférative vis-à-vis du SAC (*Staphylococcus aureus Cowan strain I*) et un défaut de production d'Ig *in vitro* (Small *et al.*, 1990). Une étude plus récente montre que la population B transitionnelle, de phénotype CD24^{high} et CD38^{high}, peut se normaliser dans les 5 mois après l'allogreffe (Marie-Cardine *et al.*, 2008). Progressivement, cette population transitionnelle diminue au profit des lymphocytes B matures, de façon concomitante à la récupération de la fonctionnalité (Wardemann *et al.*, 2003).

4 . Les infections virales (Tomblyn *et al.*, 2009)

Le faible contingent de lymphocytes T greffés, comparé à la taille du compartiment cellulaire T chez une personne immunocompétente, ainsi que le nombre extrêmement limité de précurseurs immunitaires du donneur présents dans le greffon contribuent également à la lenteur de la reconstitution immunitaire chez le receveur. Tous ces facteurs rendent le receveur susceptible à un grand nombre d'infections opportunistes.

Des modèles qui permettent de définir les complications infectieuses qui surviennent à différents temps après la transplantation ont été avancés, pour la plupart dans le cas de greffe avec conditionnement myéloablatif (MA). Un tel modèle est illustré par la figure 3 et comporte trois phases principales :

- **Phase I : la phase précédant la prise de greffe** (15-45 jours après la greffe de CSH). Les risques d'infections bactériennes ou fongiques à *Candida* ou *Aspergillus* sont très importants du fait de la neutropénie prolongée et des dommages cutanéomuqueux (mucites) ne permettant pas une barrière

efficace de défense. De plus, la réactivation du Virus Herpès Simplex (HSV) peut survenir lors de cette phase.

- **Phase II :** *la phase suivant la prise de greffe* (30-100 jours après la greffe de CSH). Il s'agit de la phase où le déficit de l'immunité cellulaire est très important. La gravité du déficit dépend de la GvHD et du traitement immunosuppresseur qui est administré. Les infections survenant au cours de cette phase sont le plus souvent dues aux virus de la famille des *Herpès virus*, notamment le CMV. Des infections à germes opportunistes tels que *Pneumocystis jiroveci* ainsi que des infections fongiques dues à l'*Aspergillus* peuvent survenir dans cette phase.

- **Phase III :** *la phase tardive* (100 jours après la greffe de CSH). Pendant cette phase, les patients ayant une GvHDc présentent un risque plus élevé d'infections. Les agents infectieux les plus fréquemment impliqués sont le CMV, le virus de la varicelle-zona (VZV) et les bactéries encapsulées comme *Streptococcus pneumoniae*.

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

En revanche, les complications infectieuses dues à l'EBV, au CMV, à l'adénovirus (ADV) et aux agents fongiques (principalement *Aspergillus fumigatus* et *Candida species*) survenant lors des phases II et III contribuent largement à la morbidité et la mortalité associée à l'allogreffe. En effet, les infections post-greffe sont responsables de 17% des décès après allogreffe géno-identique et de 21% des décès après allogreffe non apparentée (Loberiza *et al.*, 2003). Ces infections sont liées à un déficit quantitatif et qualitatif prolongé de l'immunité cellulaire spécifique.

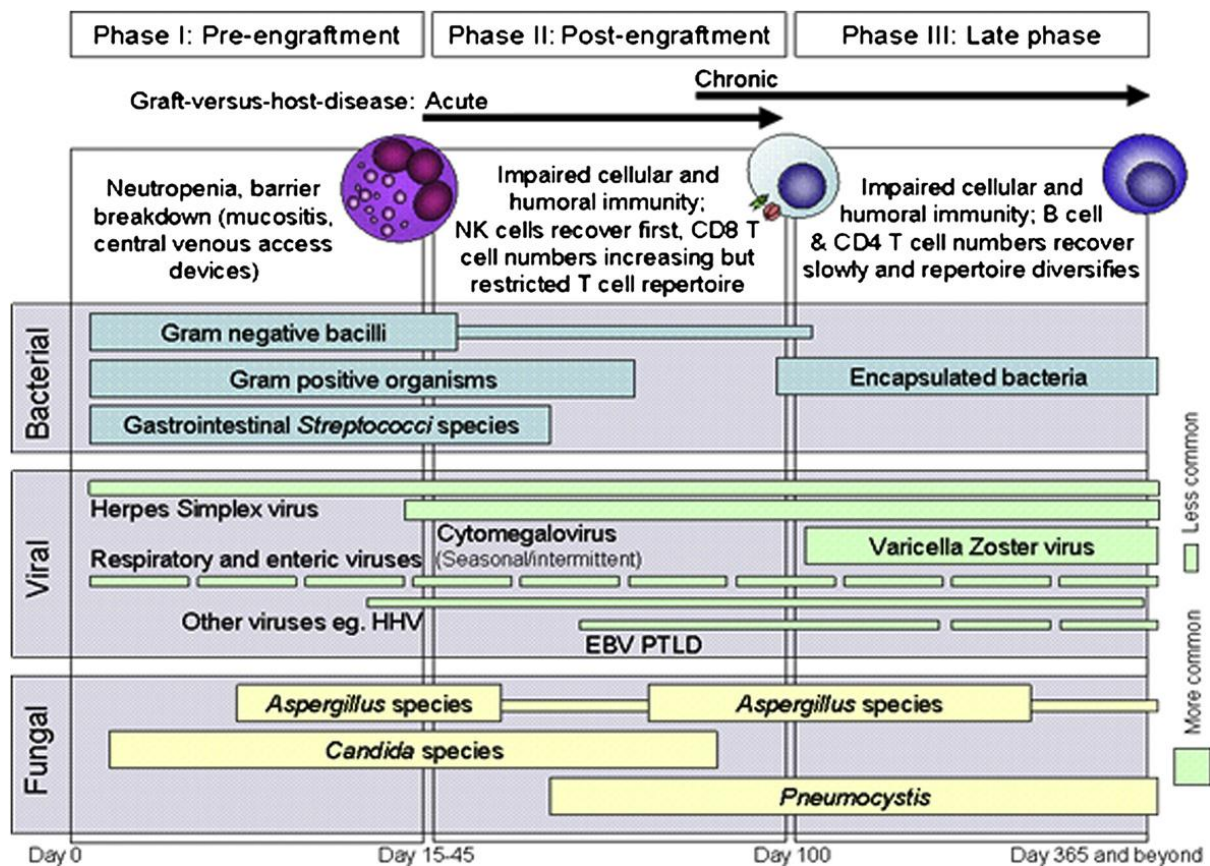


Figure 2. Infections opportunistes au cours des différentes phases suivant la greffe de CSH (Tomblyn *et al.*, 2009).

5. Lien entre infections virales et GvHD

Le rôle de la GvHD dans la survenue d'une réactivation CMV est reconnu depuis plusieurs années (Miller *et al.*, 1986). En revanche, depuis près de 20 ans, le rôle des Herpès virus dans la physiopathologie de la GvHD est évoqué mais demeure relativement controversé (Appleton *et al.*, 1993). Une première étude a montré que les patients qui présentaient une Polymerase Chain Reaction (PCR) positive CMV ou une PCR positive HHV6 ou les deux simultanément dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) développaient plus fréquemment une GvHD de grade $\geq$ II ($p < 0.05$, $p < 0.05$ et $p < 0.01$, respectivement) (Takemoto *et al.*, 2000). Plus récemment, une étude multivariée a montré qu'une réactivation HHV6 était étroitement corrélée à une plus grande probabilité de survenue d'une GvHD de grade $\geq$ II à J₃₀, J₅₀ et J₁₀₀ ($p < 0,0028$) (Wang *et al.*, 2008). Cependant, cette étude n'a pas permis de montrer un lien significatif entre la réactivation CMV et le développement d'une GvHD. Cantoni *et al.*, rapportent quant eux des résultats différents puisqu'ils démontrent sur une cohorte de 530 patients que les épisodes de réactivation du CMV sont étroitement corrélés à la survenue d'une GvHD de grade $\geq$ II (Cantoni *et al.*, 2010). Le mécanisme sous-jacent n'est pas clairement identifié.

Dans un modèle murin, il a été montré que le CMV diminuait le seuil d'induction d'une réaction de GvHD (Via *et al.*, 1990). Récemment, il a été montré dans un modèle murin que l'infection à CMV peut induire une GvHD après HSCT (Palaniyandi *et al.*, 2013).

Il semble que les infections à Herpès virus favoriseraient la survenue d'une GvHD en modifiant le système immunitaire du receveur. Le mécanisme fondamental peut reposer sur le partage de TCR (T cell receptor) entre l'antigène viral et l'antigène allogénique.

En 2010, Amir *et al* a mis en évidence cette réactivité croisée entre antigène viral et antigène allogénique en testant des cellules T spécifiques de l'EBV, du CMV, du VZV et de l'influenzae virus contre un panel de cellules cibles de type HLA connu. Quarante-cinq pour cent des clones T spécifiques de virus ont réagi contre des cibles présentant un antigène HLA allogénique (Amir *et al.*, 2010). Les auteurs ont également montré que le même TCR était responsable de l'activité contre l'antigène viral et l'antigène allogénique. Melenhorst *et al* a confirmé que les lymphocytes T spécifiques anti-EBV et anti-CMV possèdent une activité allogénique. Il a mis en évidence que les deux types de lymphocytes T : lymphocytes T naifs et mémoires jouent un rôle dans cette activité allogénique (Melenhorst *et al.*, 2011).

Outre cette réactivité croisée, trois hypothèses ont été proposées par Wang *et al*, pour expliquer l'interaction entre les infections et la survenue d'une GvHD: **1) la régulation du système immunitaire du receveur serait altérée directement ou indirectement par les Herpès virus.** Par exemple, les infections HHV6, en supprimant les fonctions lymphocytaires T, entraînent un déséquilibre immunitaire en faveur de l'immunité du donneur (Flamand *et al.*, 1995). **2) le seuil d'induction d'une réaction de GvHD serait diminué.** En effet, HHV6 favoriserait l'expression des molécules HLA de classe I et II à la surface des cellules du receveur, permettant une plus grande activation des lymphocytes T du donneur (Inoue *et al.*, 1997). **3) l'expression de molécules clés et de cytokines impliquées dans le développement de la GvHD serait augmentée.** Ainsi il a été montré qu'HHV6 augmentait l'expression d'ICAM1 (Intracellular Adhesion Molecule), de l'IL-1, du TNF- α et de RANTES (Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and presumably Secreted) (Grivel *et al.*, 2003).

Peu d'équipes cliniques administrent à ce jour une prophylaxie médicamenteuse des infections à CMV après allogreffe de CSH. Selon Cantoni *et al*, il serait intéressant d'étudier l'effet d'une stratégie prophylactique du CMV sur l'incidence de la GvHD. C'est également dans ce contexte que l'administration de CTL multi-virus en prophylaxie pourrait limiter les réactivations virales et réduire l'incidence de la GvHD.

Partie 2 VIROLOGIE

Présentation des principaux virus rencontrés après allogreffe de CSH

Dans cet exposé, nous ne nous intéresserons qu'à l'Adénovirus et au virus d'Epstein-Barr qui ont été ensuite la « cible » de l'immunothérapie adoptive que nous avons développée et étudiée.

L'Adénovirus humain (ADV)

1. Historique

En 1953, WP Rowe *et al*, en recherchant des « virus du rhume », ont mis en évidence un agent qui était une des causes d'une maladie respiratoire aiguë (Rowe 1966). Ils ont isolé les cellules adénoïdes de l'amygdale de l'homme, ont identifié l'agent viral et l'ont nommé « Adénovirus » (ADV).

2. Taxonomie

L'ADV humain appartient à la famille des *Adenoviridae* et au genre *Mastadenovirus*. Actuellement, il y a probablement plus de 55 sérotypes d'ADV différents répartis en 7 espèces A-G sur la base de propriétés structurales ou biologiques distinctes (Jones *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2010; Hendrickx *et al.*, 2014) (Tableau IV).

Tableau IV. Propriétés des adénovirus humains.

Espèces	Sérotipe	Oncogénicité	% G+C	% d'homologie
A	12,18,31	Forte	48-49	8-69
B	3,7,11,14,16,21,34,35,50	Faible	50-52	89-94
C	1,2,5,6	0	57-59	99-100
D	8,9,10,13,15,17,19- 30,32,33,36-49,51,53,54	0	58	94-99
E	4	0	57-61	-
F	40,41	0	57-59	62-69
G	52	ND	ND	ND

ND : non déterminé

3. Structure

L'ADV est de taille moyenne, non enveloppé.

Il comprend deux parties :

Le génome est un ADN double brin linéaire de 36kb et d'approximativement 40 gènes.

La capside qui est de forme icosaédrique mesure 70-90 nm de diamètre et comprend 252 capsomères, incluant 240 hexons et 12 pentons. Chaque penton consiste en une base et une spicule glycoprotéique, appelée fibre, terminée par une sphère de 4 nm de diamètre qui possède une activité hémagglutinante, cette dernière interagit avec les récepteurs de la cellule (Figure 3).

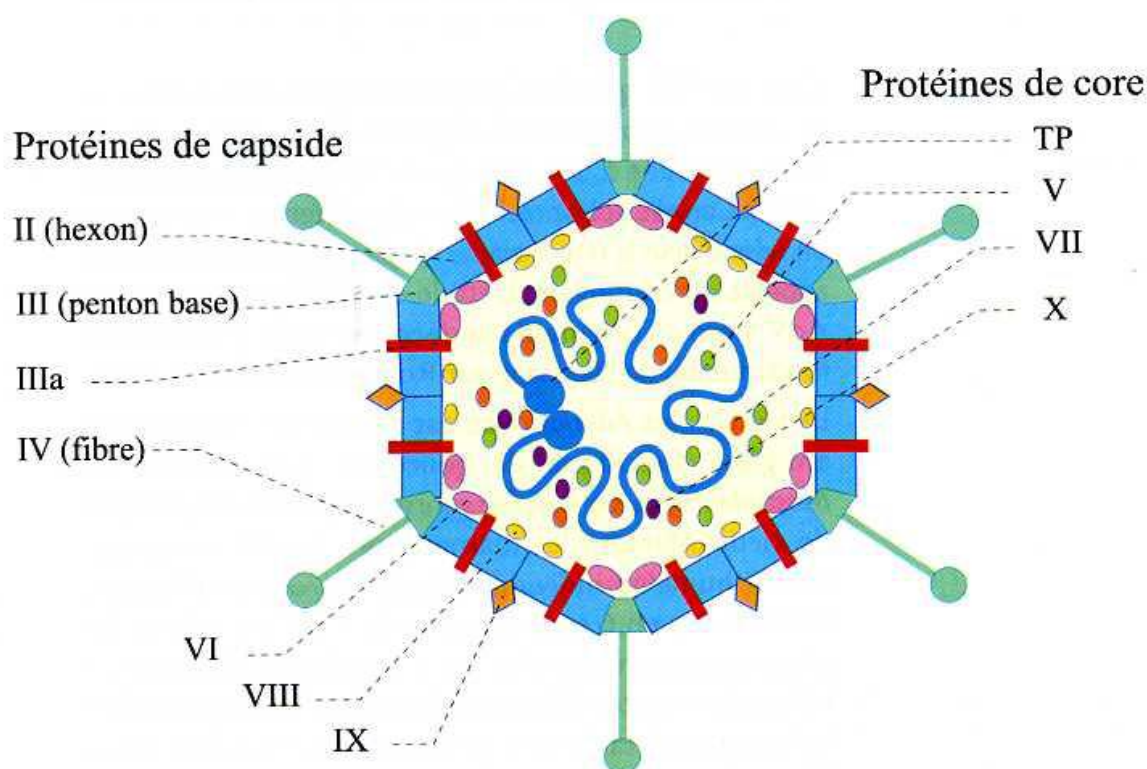


Figure 3. Représentation schématique de l'Adénovirus (d'après Freymuth, 2003).

La particule virale est composée de onze protéines parmi lesquelles la protéine Hexon, le penton et la protéine fibre. La protéine hexon est composée de l'association de trois molécules de polypeptide II. Les protéines VI, VIII et IX forment les liaisons entre les capsomères. L'association de cinq molécules du polypeptide III forme le penton (base) et trois copies du polypeptide IV forment la protéine de fibre. Cette dernière contient des sites spécifiques de sérotypes et de certains déterminants antigéniques qui sont responsables de l'hémagglutination *in vitro* (par exemple : antigène Y). A l'exception des espèces B, tous les autres ADV utilisent les récepteurs coxsakie (Roelvink *et al.*, 1998).

Le *core* est constitué de quatre protéines connues et du génome viral. Les polypeptides VII, analogues d'histones sont les principaux constituants du core. Les polypeptides V et Mu sont des protéines basiques au contact avec l'ADN viral. La protéine terminale (TP, terminal protein) est liée

de façon covalente avec l'extrémité 5' de l'ADN viral. Elle permet l'initiation de la réplication de l'ADN viral et l'attachement du génome viral à la matrice nucléaire.

Le génome de l'ADV correspond à 30 à 40 ORF (Open Reading Frame). Il comporte de courtes séquences répétées inversées aux extrémités qui interviennent dans la réplication de l'ADN. Les deux brins d'ADN sont transcrits. Il est constitué de gènes très conservés comme celui de la protéine hexon, ou au contraire très variables comme les gènes précoces (early, E).

4. Cycle viral

La pénétration de l'ADV dans la cellule hôte se fait par l'intermédiaire de la protéine fibre / hémagglutinine par le domaine carboxy-terminal et le récepteur cellulaire coxsackie adénovirus (*coxsackievirus adenovirus receptor, CAR*), membre de la superfamille des immunoglobulines. Le virus pénètre par endocytose et en quelques minutes, l'ADN viral est injecté dans le noyau cellulaire. Seul 10% de l'ADN viral après réplication et 20% des protéines hexon sont incorporés dans les virions.

Pendant la phase précoce, les régions E1A et E1B sont transcrites en premier, puis suivent les régions E3 et E4. Les premières codent des protéines de régulation et des protéines activant le gène qui code pour p53 régulant les mécanismes d'apoptose, les secondes codent des protéines qui bloquent les mécanismes de défense antivirale (E3), ou qui régulent l'expression des gènes viraux ou cellulaires (E4).

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

Latence et réactivation

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

5. Épidémiologie

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

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

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

Les atteintes oculaires à ADV 8, 19 et 37, ou intestinales à ADV 40 et 41, sont endémiques ou épidémiques. Chez les enfants les infections à ADV constituent moins de 5% des étiologies des infections aiguës des voies respiratoires inférieures nécessitant l'hospitalisation.

Les infections respiratoires à ADV se transmettent surtout par contact direct ou indirect avec les sécrétions respiratoires (aérosols, mains sales). Les souches entériques sont transmises par la voie fécale et orale. La contamination oculaire, aboutissant à des conjonctivites, se fait parfois par l'eau des piscines ou le matériel d'ophtalmologie (Viswalingam 1993).

6. Réponse immunitaire

La protéine hexon constitue le composant majeur de la capside et joue le rôle principal dans l'établissement de la réponse immunitaire adoptive (humorale ou cellulaire). Les protéines penton et fibre jouent également un rôle dans l'induction des anticorps neutralisants (Hong *et al.*, 2003; Bradley *et al.*, 2012).

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

- inhibition des fonctions de l'IFN- γ par l'association virale ARN et E1A (protéine précoce de l'ADV),
- inhibition intrinsèque de l'apoptose cellulaire et régulation de l'expression des molécules du CMH de classe I à la surface des cellules infectées (Blair *et al.*, 2004).

6.1 L'immunité innée

Le système inné constitue la première ligne de défense contre les intrusions virales et permet de faire entrer en jeu l'immunité adaptative. Cette immunité repose sur un certain nombre de facteurs solubles comme des facteurs de coagulation (facteur X notamment), le système du complément, les immunoglobulines pré-existantes et les défensines. Mais elle repose également sur des facteurs intrinsèques membranaires comme les Toll like receptors (TLR) (Nazir et Metcalf, 2005 ; Hendrickx *et al.*, 2014).

On peut subdiviser schématiquement ce système en quatre catégories :

- La Défense mécanique, par exemple la toux qui donne une force physique permettant le balayage du virus.
- La Défense chimique
Cette défense est réalisée par les petites molécules chimiques comme les peptides antimicrobiens, les défensines, la cathelicidine, la thrombicidine et les surfactants pulmonaires qui sont libérés par les cellules épithéliales, les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules pulmonaires.
- La Défense cellulaire
Il s'agit des macrophages, des cellules dendritiques, des neutrophiles et des cellules épithéliales, qui soit phagocytent et tuent les agents infectieux directement, soit contribuent à l'initiation de la réponse immunitaire adaptative cellulaire en présentant les antigènes aux lymphocytes T au sein des organes lymphoïdes secondaires, soit enfin, secrètent des cytokines contribuant à la défense cytokinique.
- La Défense cytokinique
Il s'agit des cytokines chimiotactiques et non chimiotactiques comme le TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ et G-CSF (Di Paolo *et al.*, 2014).

6.2 L'immunité humorale

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

Les receveurs de CSH présentant une virémie à ADV montrent une augmentation du taux d'anticorps spécifiques anti-sérotypes lorsqu'ils maîtrisent l'infection (Heemskerk *et al.*, 2005).

Il a été démontré que l'anticorps monoclonal anti-hexon peut bloquer l'infection par arrêt du transport cytoplasmique dépendant des microtubules (Smith *et al.*, 2008).

6.3 L'immunité cellulaire

L'immunité cellulaire est importante pour permettre une rémission après une infection aiguë. Elle joue un rôle majeur dans le contrôle d'une infection à ADV. En réponse à une infection, il est constaté une augmentation des lymphocytes T puis un retour à la normale une fois le contrôle de l'infection assuré. Les patients immunodéprimés, qui n'ont pas de cellules immunitaires effectrices, présentent un haut risque d'infection à ADV. Des études ont rapporté le rôle prédominant des lymphocytes T CD4 dans le contrôle de l'infection (Sester *et al.*, 2002; Heemskerk *et al.*, 2003-2005). Les auteurs ont montré que le déficit en lymphocytes T CD4 était de mauvais pronostic dans la

survenue d'une infection à ADV et la maladie invasive. Quant aux lymphocytes T CD8, aucune différence significative n'est rapportée dans la littérature ce qui paraît être une originalité de cette infection. Chatziandreou *et al.*, expliquent le rôle prépondérant des lymphocytes T CD4 par leur pouvoir cytotoxique. Ils ont mis en évidence une forte concentration de perforine dans les lymphocytes T CD4 anti-ADV associée à un pouvoir cytotoxique élevé *in vitro* (Chatziandreou *et al.*, 2006). Molinier-Frenkel *et al.*, ont montré que la plupart des lymphocytes reconnaissent les 3 protéines majeures de la capsid : l'hexon, le penton et la fibre tétramérique (Molinier *et al.*, 2000). Et parmi ces 3 protéines, il semble que l'hexon soit la cible principale des lymphocytes (Molinier *et al.*, 2002). Olive *et al.*, ainsi que Tang *et al.*, sont les premiers à avoir décrit des épitopes immunodominants dans la protéine hexon. Ils ont montré que ces épitopes présentés par le CMH de classe I et II se situaient dans des régions très conservées de la protéine (Olive *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2004), ce qui pourrait expliquer la « cross-réactivité » des lymphocytes T avec différents sérotypes d'adénovirus (Heemskerk *et al.*, 2003; Leen *et al.*, 2004).

7. Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques peuvent être sous trois formes (Taniguchi *et al.*, 2012) :

L'infection asymptomatique : le virus est détecté dans les liquides biologiques du corps (Sang, selles, urine , etc...) sans signes ou symptômes cliniques.

La maladie ADV localisée : le virus est détecté dans les organes en présence de signes et symptômes.

La maladie ADV diffuse : deux organes ou plus sont impliqués ; ou un organe est impliqué avec une charge virale élevée dans le plasma ($>10^4$ copies/mL).

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

7.1 Atteintes respiratoires

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

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

Les sérotypes les plus courants sont les ADV 1, 2, 5, 6. Les ADV 4 et 7. Ils peuvent provoquer de véritables épidémies. Les formes graves et rares sont principalement dues à l'ADV 7 : la détresse respiratoire est alors associée à des signes nerveux de type méningite et à des troubles de la conscience. La mortalité peut atteindre 30% (Echavarria *et al.*, 2008).

7.2 Atteintes oculaires

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

Des atteintes plus sévères de type kérato-conjonctivite, parfois hémorragique, sont observées avec l'ADV 8, mais aussi les ADV 19 et 37. La kératite superficielle apparaît après une incubation de 8 jours, notamment chez des sujets présentant des microtraumatismes de la conjonctive. Elle évolue sous un mode épidémique dans les milieux où l'empoussièrement est important ou dans les services d'ophtalmologie. L'évolution est lente mais l'infection est majoritairement résolutive sans séquelles (Tebruegge et Curtis, 2010)

7.3 Atteintes intestinales

Les gastroentérites aiguës à ADV constituent 5 à 15% des gastroentérites nécessitant une hospitalisation et sont le plus souvent dues aux ADV 40 et 41 dans 67% des cas. Les atteintes intestinales peuvent être des diarrhées de courte durée accompagnant une infection respiratoire à ADV, de la fièvre et des vomissements. Chez les enfants, les infections à ADV se manifestent par des excréments asymptomatiques dans les selles.

7.4 Infections chez les sujets immunodéprimés

Les infections à ADV chez les patients immunodéprimés, sont souvent sévères et sont l'une des principales causes de mortalité et de morbidité chez les receveurs de CSH. Cette manifestation résulte généralement de la réactivation d'infections latentes dans le tissu lymphoïde (amygdales par ADV 1, 2 et 5) ou du rein (par ADV 11, 34 et 35). Elles sont caractérisées par de multiples localisations, avec la survenue de cystites hémorragiques, de méningo-encéphalites, les pneumonies et les hépatites étant les localisations les plus fréquentes et les plus graves (Walls *et al.*, 2003). La diarrhée est la manifestation clinique la plus commune (Echavarria *et al.*, 2008). L'ADV est généralement détecté dans les 100 jours post-greffes de CSH, en moyenne vers J₅₈.

8. Reconstitution immunitaire

Les études sur l'infection ADV après HSCT rapportent une incidence entre 5 et 47% (Echavarria *et al.*, 2008; Gustafson *et al.*, 2008; Verdeguer *et al.*, 2011; Taniguchi *et al.*, 2012). Cette incidence varie en fonction du conditionnement réalisé, de la réalisation d'une déplétion T *in vivo* ou *in vitro*, de la mise en place d'un monitoring viral systématique, et de la sensibilité des méthodes de détection utilisées.

Concernant la reconstitution immunitaire anti-ADV après allogreffe de CSH, 5 études ont été publiées à ce jour qui ont toutes été réalisées chez l'enfant. Les techniques mises en œuvre pour

l'étude de la reconstitution immunitaire ADV ont été l'Elispot IFN- γ et les cytokines intracellulaires. Les multimères ne sont pratiquement pas utilisés car d'une part, ils ne sont pas disponibles pour tous les typages HLA et d'autre part la réponse immunitaire ADV étant faible (en moyenne un Log de moins que la réponse EBV ou CMV, données du laboratoire), elle est en dessous du seuil de détection de la technique des tétramères.

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

La deuxième étude prospective a porté sur 46 enfants après allogreffe de CSH déplétée en lymphocytes T (Feuchtinger *et al.*, 2005). Vingt et un patients ont réactivé l'ADV et 7 d'entre eux sont décédés. Les auteurs ont étudié par cytokines intracellulaires la population CD4⁺IFN- γ ⁺ spécifique de l'ADV. Ils ont montré l'absence complète de lymphocytes T spécifiques chez les 7 patients décédés. Chez les 14 patients ayant survécu après réactivation ADV, ils ont observé une fréquence élevée de T CD4⁺IFN- γ ⁺ ($0,56 \pm 0,5\%$), comparable à celle de donneurs sains (en moyenne $0,38\%$) et surtout supérieure à celle retrouvée chez les patients sans réactivation ADV ($0,12 \pm 0,1\%$) ($p=0,0031$). Ces données suggèrent qu'une fréquence de cellules T spécifiques de l'ADV comparable à celle des donneurs sains protège les patients d'infections ADV affectant le pronostic vital.

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

Une autre étude s'est attachée à montrer par la technique de cytokines intracellulaires les profils de sécrétion de cytokines (IL-2 et IFN- γ) des T CD4⁺ spécifiques au cours de la reconstitution immunitaire après une allogreffe de CSH réalisée chez 37 enfants parmi lesquels 2 ont présenté une réactivation ADV (Guérin *et al.*, 2011). Les résultats montrent que chez la majorité des patients n'ayant pas réactivé l'ADV, les cellules T CD4 spécifiques produisent majoritairement de l'IFN- γ et

ne prolifèrent pas *in vitro* entre le 1^{er} et le 3^{ème} mois post-greffe alors qu'ils acquièrent un profil IFN- γ /IL-2 et prolifèrent entre le 3^{ème} et le 6^{ème} mois post-greffe. La modification du profil cytokinique signe probablement la capacité de maîtriser les réactivations virales. Aucune récupération immunitaire spécifique de l'ADV n'a été retrouvée chez les 2 patients ayant réactivé l'ADV.

Une étude de Suédoise s'intéressant plus particulièrement au monitoring viral par PCR a étudié 1184 échantillons sanguins chez 97 patients (77 adultes et 20 enfants). Parmi les 97 patients, 5 (2 adultes et 3 enfants) ont eu au moins une fois une charge virale ADV positive (incidence 5%). La présence d'une réponse immunitaire spécifique a été étudiée à trois temps chez 12 patients adultes par Elispot IFN- γ entre 1 et 3 mois post-greffe. Les auteurs rapportent une réponse positive au moins une fois pour 7 patients (plus de 40 Spots Forming Cells : SFCs/10⁶ PBMC) (Öhrmalm *et al.*, 2011).

Zandvliet rapporte une étude de reconstitution immunitaire anti-ADV chez 13 patients (7 enfants et 6 adultes) après allogreffe de CSH par marquage de cytokines intracellulaires après stimulation et après culture *in vitro* pendant une semaine. En phase de virémie ADV, les lymphocytes T CD8 anti-ADV n'ont pas été détectés et les lymphocytes T CD4 anti-ADV ont été détectés chez deux patients. En phase de résolution de la virémie ADV, les lymphocytes T CD8 anti-ADV ont été détectés chez 7 patients et les lymphocytes T CD4 anti-ADV ont été détectés chez les 13 patients (Zandvliet *et al.*, 2010).

Enfin, Geyeregger *et al.* a utilisé pour la première fois la technique des multimères après expansion cellulaire *in vitro* pour étudier la reconstitution immunitaire anti-ADV chez 10 patients présentant de l'ADV dans les selles. Parmi eux, trois présentaient une virémie. Pendant la phase de virémie, les lymphocytes T anti-ADV n'ont pas été détectés que ce soit par la technique des multimères après culture ou par la technique de l'*IFN- γ Detection Assay* (CDA) de Miltenyi. Après résolution de l'infection virale, les lymphocytes T anti-ADV ont été détectés chez 9/9 patients évaluables par multimères après expansion des PBMC *in vitro*. Une analyse par IFN- γ Detection Assay a été réalisée chez 4 patients et a permis de détecter les lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques anti-ADV à chaque fois (Geyeregger *et al.*, 2013).

9. Traitements des infections à ADV

Actuellement, il n'y a pas de traitement antiviral spécifique pour l'ADV, bien que les médicaments tels que le ganciclovir, vidarabine, ribavirine et le cidofovir soient utilisés (Arav-Boger *et al.*, 2000; Legrand *et al.*, 2001; Bordigoni *et al.*, 2001; Hoffman *et al.*, 2001).

Les études cliniques sur les patients immunodéprimés se sont concentrées sur le cidofovir et la ribavirine mais des essais contrôlés et randomisés manquent encore.

- La ribavirine est un analogue de la purine avec une activité *in vitro* ciblant l'ARN ou l'ADN des virus. Différents mécanismes d'action ont été proposés, incluant l'inhibition de la coiffe de l'ARN, l'inhibition directe de la polymérase virale, et l'augmentation de mutations dans l'ADN néosynthétisé. L'effet indésirable le plus rencontré est une anémie réversible.

Son utilisation avec succès a été rapportée dans le traitement des cystites hémorragiques induites par l'ADV, de la pneumonie après greffe de CSH et des hépatites après greffe de foie (Arav-Boger *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 1999). Néanmoins, d'autres auteurs ont décrit les échecs thérapeutiques (Chakrabarti *et al.*, 1999; Hale *et al.*, 1999). Les succès de la ribavirine semblent liés au traitement précoce et aux sérotypes d'ADV impliqués. Une étude plus récente évaluant ce médicament *in vitro* montre que seulement l'espèce C (sérotypes 1, 2, 5 et 6) est sensible à la ribavirine (Morfin *et al.*, 2005). Elle est maintenant pratiquement abandonnée pour traiter les infections à ADV.

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

Les schémas de traitement proposés par l'équipe de Houston et celle de Londres présentent quelques similitudes.

Pour l'équipe de Houston, la charge virale « seuil » de mise en place d'un traitement pré-emptif par cidofovir varie en fonction du risque de développer une infection à ADV (Lindmans *et al.*, 2010). Pour un risque intermédiaire, la charge virale « seuil » est de 1000 copies/ml et entraîne la mise en place d'un traitement par cidofovir à 1mg/kg/j 3 fois par semaine accompagné si possible d'une diminution du traitement immunosuppresseur. En cas d'échec du traitement, cette équipe préconise l'injection de CTL anti-ADV si ce traitement est disponible ou dans le cas contraire la poursuite du cidofovir.

Pour l'équipe de Londres, la mise en place d'un traitement pré-emptif par cidofovir est réalisée après l'obtention de deux résultats consécutifs de PCR ADV supérieurs à 1000 copies/ml (WY Ip *et al.*, 2013). La posologie préconisée est de 5 mg/kg par semaine pendant 2 semaines, accompagnée si possible d'une diminution du traitement immunosuppresseur. Ensuite, chez les patients à haut risque, la posologie doit être maintenue et si la PCR devient supérieure à 10 000 copies/ml, l'injection de CTL anti-ADV est recommandée.

Quant aux recommandations européennes, elles préconisent la même attitude concernant la mise en place du cidofovir et déconseillent la ribavirine en cas de maladie à ADV. Elles réservent les CTL anti-ADV aux patients ne répondant pas aux traitements antiviraux et suggèrent qu'elles soient réalisées dans le cadre d'essais cliniques dans des centres expérimentés (Matthes-Martin *et al.*, 2012). A travers ces trois schémas thérapeutiques, on se rend compte que le seul médicament utilisé est le cidofovir et que son efficacité n'est pas constante. En cas d'échec, l'immunothérapie adoptive devient alors la seule alternative.

Le Virus d'Epstein-Barr (EBV)

1. Historique

En 1958, Denis Burkitt (1911-1993), chirurgien anglais, décrit une tumeur faciale chez les enfants africains en rapport avec une prolifération de lymphocytes B (Burkitt, 1958). Ce lymphome, dit de Burkitt (LB), représente alors la tumeur la plus fréquente chez ces enfants dans certaines régions d'Afrique de l'Est. C'est en 1961, en assistant à une conférence de Denis Burkitt sur ce lymphome africain qui se répartit selon des facteurs géographiques et climatiques faisant suspecter une influence virale, qu'Anthony Epstein décide de rechercher ce possible virus. En 1964, l'établissement de lignées cellulaires à partir d'explants de LB permet à Epstein, Achong et Barr d'identifier des particules de type *herpèsvirus* par microscopie électronique dans ces lignées cultivées *in vitro* (Epstein *et al.*, 1964).

En 1968, des études séro-épidémiologiques démontrèrent que l'EBV infecte plus de 95% de la population et qu'il constitue l'agent étiologique d'une maladie anciennement connue, la *mononucléose infectieuse* (Henle *et al.*, 1968). A partir de 1970, on détecte le génome viral dans les cellules malignes de LB et de carcinomes indifférenciés du nasopharynx (CNP), ce qui confirme l'association de ce virus à des cancers chez l'homme (Henle et Henle, 1970). Sa capacité à immortaliser les lymphocytes B *in vitro* en lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) et à provoquer des lymphomes chez le primate est alors démontrée et conforte l'EBV dans son rôle d'agent oncogène chez l'homme. Depuis lors, l'EBV a été impliqué dans de nombreuses pathologies bénignes ou malignes d'origine épithéliale ou lymphoïde. En 1984, l'EBV est le premier virus humain dont le génome est entièrement séquencé (Baer *et al.*, 1984).

2. Taxonomie

EBV (ou HHV-4, pour *Human Herpes Virus 4*) appartient à la famille des *Herpesviridae* humains qui compte 8 membres. Il fait partie de la sous-famille des *Gamma Herpesviridae* et du genre *Lymphocryptovirus*.

Les différentes souches d'EBV peuvent être classées en 2 types (EBV-1 et EBV-2) sur la base du polymorphisme de leurs gènes EBNA2 (EBV Nuclear Antigen 2), 3A, 3B et 3C. Des études de séroprévalence ont montré que la souche EBV-1 est majoritaire dans les pays occidentaux, alors que la souche EBV-2 ne prévaut que dans certaines zones d'Afrique Equatoriale et de Nouvelle-Guinée (Macswen et Crawford, 2003). De plus, une microhétérogénéité supplémentaire existe parmi ces deux souches, notamment dans les régions répétées du génome viral, donnant ainsi de nombreux isolats différents.

3. Structure

Le virion d'EBV possède une structure commune à tous les Herpes virus, à savoir, du centre vers la périphérie :

Un nucléoïde qui contient l'ADN génomique viral de 172 kpb sous forme linéaire double brin.

La capside qui est de forme icosaédrique (20 faces et 12 sommets) mesure 100-120 nm de diamètre et comporte 162 capsomères (150 hexamères et 12 pentamères).

Le tégment qui est composé de nombreuses protéines virales et cellulaires. Ce tégment n'a pas de structure particulière, même si quelques structures fibrillaires peuvent y être retrouvées.

L'enveloppe constituée d'un double feuillet lipidique dérivé des membranes de la cellule hôte au niveau desquelles le virus a exprimé ses antigènes de membrane. L'expression des glycoprotéines d'enveloppe, qui appartiennent aux antigènes de membrane, confère au virion un aspect "spiculé". C'est grâce à l'une d'entre-elles, la gp350/220 que le virus se fixe aux cellules hôtes *via* son récepteur CD21 (ou CR2, récepteur d'un composant du complément).

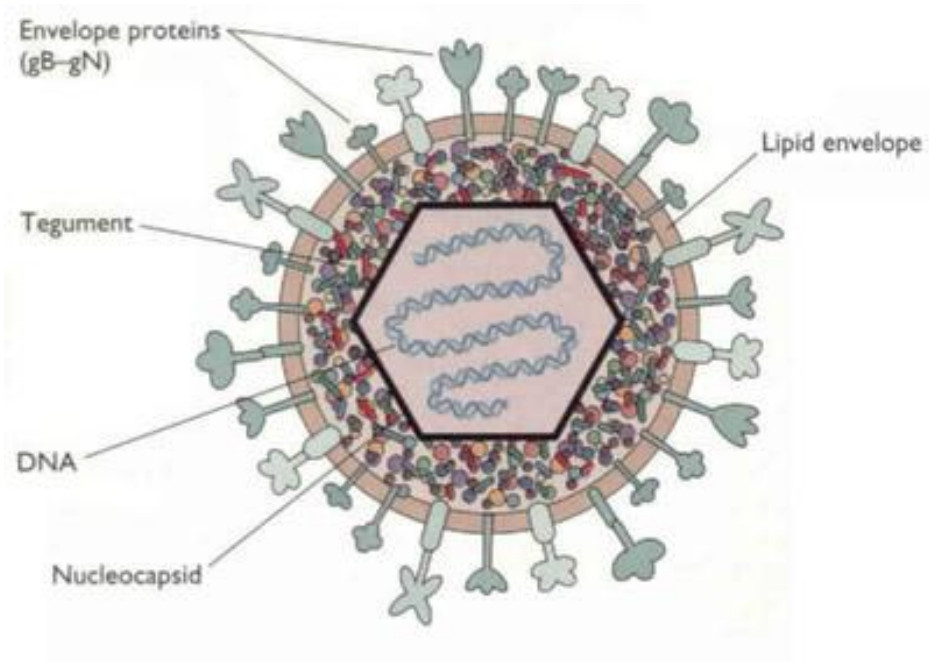


Figure 4. Représentation du virus d'Epstein-Barr (d'après Nicolas et Meyohas, 2003).

Comme tous les herpèsvirus, l'EBV a un cycle de vie qui se décompose en deux étapes: (i) la phase de latence qui maintient à long terme le virus dans l'hôte, et (ii) la phase lytique ou productive qui permet la production et la diffusion de particules virales. Chez l'hôte, l'EBV est majoritairement retrouvé à l'état latent.

4. Cycle viral

L'EBV infecte les cellules épithéliales et préférentiellement les lymphocytes B, d'une part *via* la glycoprotéine d'enveloppe gp350 qui se lie à la molécule CD21, récepteur du C3d du complément exprimé à la surface des lymphocytes B, d'autre part par la liaison entre la glycoprotéine gp42 et les

molécules HLA de classe II comme co-récepteur (Borza et Hutt- Fletcher, 2002). Chaque cellule infectée par l'EBV comporte de multiples copies extrachromosomiques du virus sous sa forme épisomique ou circulaire (Nicolas et Meyohas, 2003). La fixation de l'EBV sur son récepteur induit l'activation du lymphocyte B qui devient transcriptionnellement compétent. L'EBV est donc un puissant «mitogène B» (Rickinson et Lane, 2000). Après infection, la phase de latence est associée à l'expression de dix protéines de latence et de deux ARN non codants. *In vitro*, le passage à la phase de production virale peut survenir spontanément dans certaines cellules, ou bien après activation par des agents inducteurs.

4.1 Cycle de latence

Il est possible, *in vitro*, d'immortaliser des lymphocytes B par l'EBV et d'obtenir des LCL. Ces dernières sont très peu permissives à la réplication virale (cycle lytique) et le virus s'y maintient dans un état dit "de latence".

Au total, il y a 11 gènes de latence, regroupés en 3 principales familles :

- Les gènes qui codent les 6 protéines Epstein Barr Nuclear Antigen (EBNA) : EBNA1,2,3A,3B,3C et LP.
- Les gènes qui codent les 3 protéines Latent Membrane Protein (LMP) : LMP1, 2A, 2B,
- Les gènes qui codent les petits ARN EBER (EBV Encoded RNA) et BART

L'expression des protéines de latence contribue aux propriétés d'immortalisation et/ou de transformation de l'EBV en influençant la machinerie cellulaire afin de contrôler la croissance et/ou la survie des cellules infectées.

4.1.1 différents types de latence (Raphaël et al., 2005 et Thorley-Lawson 2001)

Le profil d'expression des gènes de latence n'est pas identique dans tous les contextes cellulaires d'infection par l'EBV.

On distingue ainsi 4 types (0, I, II et III) de latence *in vivo*, en fonction des différents gènes qui sont exprimés. Il faut noter que les ARN EBER1 et 2 s'expriment dans chacune des latences. Quant aux ARN BART, ils sont exprimés au moins en partie lors des latences I, II et III mais, aucune donnée n'existe sur leur statut durant la latence 0.

-La **latence de type 0**, définie *in vivo* chez le sujet séropositif et absence d'expression de la protéine.

-La **latence de type I** est celle que l'on trouve dans le lymphome de Burkitt. Elle se caractérise par la seule présence de la protéine EBNA1 et un phénotype cellulaire particulier. En effet, les cellules expriment à leur surface les marqueurs CD10 et CD77, et peu ou pas d'antigènes d'activation cellulaire et de molécules d'adhésion (Rowe *et al.*, 1990).

-La **latence de type II** (appelée aussi programme par défaut) est caractéristique du carcinome du nasopharynx (CNP), de la maladie de Hodgkin et de certains lymphomes T/NK et se caractérise par l'expression des protéines EBNA1, LMP1, LMP2A et LMP2B.

-La **latence de type III** (appelée aussi programme de croissance) se retrouve dans les LCL transformées *in vitro* par EBV et dans les lymphoproliférations des sujets immunodéprimés. Elle s'accompagne de l'expression des 9 protéines de latence EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA-LP, LMP1, LMP2A et LMP2B.

4.1.2 Description de différents produits de gènes de latence (Young *et* Rickinson, 2004)(Tableau V)

-La famille des EBNAs

Dans un premier temps, l'expression des protéines EBNA (EBV Nuclear Antigen) est initiée à partir du promoteur Wp puis, lorsque la transformation cellulaire est établie, c'est le promoteur Cp qui prend le relais.

-EBNA1

La protéine **EBNA1** est retrouvée dans tous les types de latence et, de ce fait, dans toutes les pathologies associées à EBV. En effet, les propriétés biologiques de la protéine EBNA1 sont indispensables au maintien du virus dans la cellule en prolifération. Quelques études montrent également l'importance de la protéine EBNA1 pour la transformation cellulaire. De plus, indépendamment de sa fonction de maintien du génome viral, EBNA1 semble impliquée dans l'inhibition de l'apoptose des cellules B infectées par EBV quel que soit le type de latence exprimée par le virus (Kennedy *et al.*, 2003). De plus, EBNA1 possède des séquences répétées Gly-Ala, dont la fonction principale est de stabiliser la protéine mature, entravant ainsi la présentation antigénique (Levitskaya *et al.*, 1995).

-EBNA2 et EBNA-LP

Les protéines **EBNA2** et **EBNA-LP** sont localisées dans le noyau et font partie des premières protéines virales exprimées dans les lymphocytes B infectés par EBV, dès l'arrivée du génome viral dans le noyau. Elles sont essentielles à l'immortalisation cellulaire induite par EBV.

-Les EBNA3

Les protéines **EBNA3** (EBNA3A, 3B et 3C) sont localisées dans le noyau, associées à la matrice nucléaire et au nucléoplasme. Elles régulent l'expression de gènes cellulaires et se fixent à certaines protéines cellulaires comme RBP-Jk. Le rôle de EBNA3B n'est pas bien connu. Les protéines EBNA3A et EBNA3C sont essentielles à la transformation des lymphocytes B *in vitro*.

-La famille des LMPs

-LMP1

LMP1 est une protéine de membrane ayant une demi-vie courte (environ 3h). Elle est fortement associée au cytosquelette et forme constitutivement des agrégats dans la membrane plasmique, même en l'absence de facteurs de croissance exogènes ou d'autres protéines virales. Elle est considérée comme l'oncogène majeur de l'EBV, et par le biais du facteur NF- κ B induit la transcription des gènes anti-apoptiques. LMP1 présente des propriétés immortalisantes et transformantes, et est responsable de nombreux changements phénotypiques dans les cellules infectées par l'EBV.

-Les LMP2

Les ARNm de LMP2A et LMP2B sont transcrits à partir du même gène mais de promoteurs différents. Le rôle de LMP2B n'est pas bien connu. La protéine LMP2A inhibe le passage de la latence au cycle lytique en bloquant la voie de signalisation du BCR (Merchant, Swart *et al.* 2001). De plus, LMP2A est capable de participer à la transformation des cellules épithéliales avec un effet protecteur sur l'apoptose induite par une translocation *c-myc*. Donc LMP2A peut avoir un rôle clé non seulement dans le maintien de la latence chez les porteurs sains, mais également en tant qu'activateur de la carcinogénèse EBV-dépendante (Lin *et al.*, 2009).

-Les ARN viraux EBER et BART

Les ARN **EBER** (EBV Encoded RNA) sont des petits ARN nucléaires non polyadénylés qui sont exprimés dans tous les programmes de latence de l'EBV. Ils sont tous deux transcrits par l'ARN polymérase III et à un moindre degré par l'ARN polymérase II. Les ARN EBER semblent impliqués dans l'épissage des transcrits EBNA et LMP. Ils sont aussi impliqués dans des mécanismes anti-apoptotiques.

Les ARN **BART** (Rightward Transcripts of the BamHI A region) sont aussi retrouvés dans tous les types de latence virale. Cette protéine est abondamment sécrétée (Ooka *et al.*, 2004).

Tableau V. Protéines de latence de l'EBV et leurs principales fonctions.

Protéines virales	Latence	Localisation	Fonction principales
EBNA1	I, II, III	Nucléaire	Maintien du génome viral sous forme épisomale
EBNA2	III	Nucléaire	Immortalisation des LB, activateur de transcription cellulaire et virale
EBNA3A (ou EBNA3)	III	Nucléaire	Répresseur de l'action d'EBNA2, se lie à RBP-Jkappa, participe à l'immortalisation des LB
EBNA3B (ou EBNA4)	III	Nucléaire	Inconnue, se lie à RBP-Jkappa
EBNA3C (ou EBNA6)	III	Nucléaire	Répresseur de l'action d'EBNA2, action sur le cycle cellulaire, se lie à RBP-Jkappa, participe à l'immortalisation
EBNALP (ou EBNA5)	III	Nucléaire	Cofacteur de EBNA2, interagit avec p53 et Rb
LMP1	II, III	Membranaire	Oncogène majeur Transducteur de signaux via TRAF vers NF-KB et JNK, induit bcl2
LMP2A	II, III	Membranaire	Prévient la réactivation virale
LMP2B	II, III	Membranaire	Inconnue

4.2 Le cycle lytique

La fréquence avec laquelle les lymphocytes B infectés de façon latente deviennent permissifs à la réplication virale peut être influencée par des conditions de culture spécifiques. Spontanément, seules 2 à 10 % des cellules présentes dans les LCL entrent en cycle lytique. Le cycle réplicatif est une cascade d'activation aboutissant à la production de virions. Il comprend trois phases :

- très précoce : correspond à la production des protéines : BZLF1 ou ZEBRA (*BamHI Z Epstein-Barr Replication Activator*), BRLF1,
- précoce : correspond à la production des protéines précoces : BMLF1, BHRF1, BHLF1, BALF2, BALF5,
- et tardive : correspond à la production des protéines tardives ou de structure : VCA (*Viral Capsid Antigens*) et MA (*Membrane Antigens* : gp350, gp140, gp110 et gp85). L'expression des gènes tardifs est induite par la protéine BZLF1 qui joue également un rôle crucial dans la réplication de l'ADN (Rickinson et Kieff, 2001). La régulation de l'expression de cette protéine semble être la clé du passage de la latence à la production virale.

5. Epidémiologie (Young et Rickinson, 2004)

L'EBV touche plus de 95 % de la population adulte. Le virus est véhiculé durant toute la vie, par l'intermédiaire d'une infection latente des lymphocytes B et d'une production virale dans la salive. La majorité des primo-infections touchent les enfants et sont généralement asymptomatiques. Cependant, lorsque la primo-infection a lieu plus tard, chez l'adolescent ou l'adulte jeune, comme

c'est le cas dans les pays développés, elle induit une affection généralement bénigne, la *mononucléose infectieuse*. La transmission du virus se fait généralement par contact avec les sécrétions oropharyngées qui contiennent les particules virales infectieuses. La transmission est également possible après transplantation d'organe ou greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) par les lymphocytes B infectés par l'EBV présents chez les donneurs. Cette infection constitue un facteur de risque de syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (PTLD).

6. Réponse Immunitaire (Hislop *et al.*, 2007)

6.1 La réponse immune humorale

Lors de la primo-infection, l'infection des cellules épithéliales et des lymphocytes B entraîne une réponse immunitaire humorale, dirigée d'abord contre le cycle lytique. Dans un second temps, le virus entre dans une phase de latence associée à l'expression des protéines EBNA et LMP; cela entraîne une réponse immunitaire humorale dirigée contre les protéines de latence. Apparaissent donc successivement des anticorps contre les protéines d'enveloppe (anti-MA, -gp85, -gp350/220), contre les protéines de capsid (anti-VCA), contre les protéines précoces ou très précoces (anti-ZEBRA, -EA), puis contre les protéines de latence (anti-EBNA). Les anticorps anti-VCA et anti-EBNA persistent dans le temps. Cependant, cette réponse humorale semble ne jouer qu'un rôle secondaire dans le contrôle de l'infection latente et de la prolifération cellulaire.

6.2 La réponse immune cellulaire

Le rôle de l'immunité cellulaire dans le contrôle de l'infection par l'EBV est primordial, faisant intervenir deux types de cellules : les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques (CTL).

L'importance de l'immunité cellulaire dans le contrôle des cellules infectées a justifié une approche cellulaire de traitement des PTLD induits par l'EBV, en particulier après transplantation de moelle osseuse en injectant des CTLs du donneur (Rooney *et al.*, 1998).

6.2.1 Réponse immune cellulaire innée (Chijioke *et al.*, 2013)

Les cellules Natural Killer (NK) sont majoritaires dans la réponse immune précoce à de nombreux agents infectieux. Les phénomènes observés en clinique comme une expansion des cellules NK activées dans le sang des patients en phase aiguë de MI, et le nombre de cellules NK serait inversement proportionnel à la charge virale ont montré le rôle de NK en réponse de l'infection EBV (Williams *et al.*, 2005). De plus, les études *in vitro* démontrent que les cellules NK peuvent inhiber la transformation EBV-induite des cellules B au repos si on les ajoute dans les premiers jours de l'infection grâce à la libération d'IFN- γ (Lotz *et al.*, 1985). Néanmoins, les preuves cliniques sont plutôt en défaveur du rôle des NK dans le contrôle de la transformation *in vivo*, puisque chez les receveurs de cellules souches déplétées en cellules T, les lymphoproliférations liées à l'EBV

apparaissent plus communément dans les 3 à 6 mois suivant la transplantation, temps durant lequel le pool de cellules NK est recouvré alors que le patient est encore profondément déficient en cellules T (O'Reilly *et al.*, 1997). Toutefois, le contrôle de l'infection persistente de l'EBV nécessite les lymphocytes T cytotoxiques.

6.2.2 Réponse immune cellulaire adaptative

6.2.2.1 Réponse cellulaire T-CD8+

La réponse lymphocytaire T cytotoxique est dirigée à la fois contre les antigènes de latence (les différents EBNA, LMP1, LMP2), les antigènes lytiques (BRLF1, BALF2, BMRF1, BMLF1, BZLF1) et les antigènes structuraux (gp 350, gp 85 et gp 110) du virus. Il y a une hiérarchie caractéristique de leur immunodominance pour ces antigènes d'EBV reconnus par les cellules T CD8+. Ainsi, parmi les protéines de latence, les plus fortes réponses sont presque toujours dirigées contre des épitopes dérivés de la famille d'EBNA-3A, -3B, -3C, accompagnées par des réponses contre les épitopes sous-dominants, souvent dérivés de LMP2, quelques fois d'EBNA-1, mais que très rarement de EBNA2, EBNA-LP ou LMP1. La même hiérarchie est manifeste durant la réponse primaire chez les patients avec une MI (Steven *et al.*, 1996; Callan *et al.*, 1998), chez les jeunes enfants après l'infection primaire asymptomatique (Tamaki *et al.*, 1995), et dans la réponse mémoire chez les porteurs de virus au long terme (Khanna *et al.*, 1992; Murray *et al.*, 1992).

Par ailleurs, parmi les protéines du cycle lytique, les plus fortes réponses sont presque toujours dirigées contre les épitopes dérivés des antigènes précoces-immédiats (BZLF1, BRLF1) et contre une sous-partie d'antigènes précoces (BMLF1, BMRF1, BALF2, BALF5), alors que les protéines structurales tardives du virus n'induisent qu'une très faible réponse quand elle a lieu (Steven *et al.*, 1997; Khanna *et al.*, 1999; Pudney *et al.*, 2005)(Figure 5).

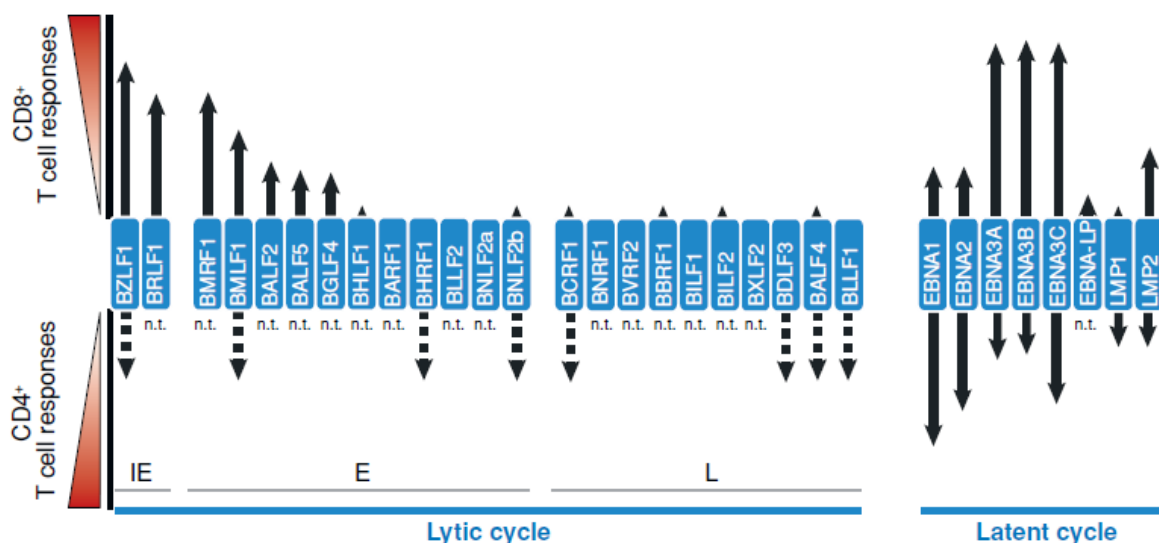


Figure 5. Réponse immunitaire cellulaire vis-à-vis des différentes protéines lytiques (IE : très précoce, E : précoce, L : tardive) et latentes du virus Epstein-Barr (d'après Hislop *et al.*, 2007).

Les flèches noires continues indiquent le degré de la réponse immunitaire cellulaire CD4⁺ et/ou CD8⁺ chez les personnes EBV positives en état de latence. Les flèches discontinues indiquent que les réponses des cellules T CD4⁺ ont été observées mais leur immunodominance reste à déterminer. n.t.: indique les protéines non testées.

6.2.2.2 Réponse cellulaire T-CD4⁺ (Mautner et Bornkamm, 2011)

La réponse cellulaire T CD4⁺ a été bien moins étudiée parce que, contrairement à la très forte expansion des cellules TCD8⁺ induite par l'infection primaire à l'EBV, le nombre de cellules T CD4⁺ dans le sang de patients MI reste relativement constant (Williams *et al.*, 2005). De plus, il y a une hiérarchie importante dans l'immunodominance des antigènes de latence qui est cependant différente de la hiérarchie rencontrée pour les cellules T CD8⁺. La plupart des porteurs du virus ont des réponses mémoires vis-à-vis des épitopes d'une ou deux protéines EBNA-1, EBNA-2 ou EBNA-3C, et bien moins fréquemment, vis-à-vis d'épitopes d'EBNA-3A ou aux LMPs (Figure 5). Ces cellules T CD4⁺ mémoires sont présentes à un taux dix fois moins élevé que les cellules T CD8⁺ mémoires dans le sang de porteurs de virus, mais peuvent néanmoins être réactivées efficacement *in vitro* pour produire des clones de cellules T CD4⁺. Les lymphocytes T CD4⁺ jouent également un rôle important dans le contrôle de l'infection durant la phase de latence.

Concernant les réponses spécifiques aux antigènes lytiques, il n'existe pas de hiérarchie dans l'immunodominance antigénique pour les clones de cellules TCD4⁺. Les lymphocytes T CD4⁺ sont principalement dirigés contre la protéine très précoce BZLF1, les protéines précoces BMLF, BHRF1 et BNLF2b, les protéines tardives (Mautner *et al.*, 2011; Long *et al.*, 2011) et les deux glycoprotéines tardives, gp 350 et gp110 (Adhikary *et al.*, 2006) de manière pareille.

7. Physiopathologie d'une infection persistente liée à l'EBV (Thorley-Lawson *et al.*, 2013)

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la persistance de l'infection EBV. Le plus connu est celui-ci du GCM (*Germinal Center Model*). Le virus pénètre dans l'organisme et infecte directement les cellules B naïves. Elles s'activent alors et deviennent des blastes infectés de façon latente. Ces cellules prolifèrent et expriment les 9 protéines latentes connues, puis elles migrent dans le centre germinatif. A cet endroit, elles expriment un panel plus restreint de protéines de latence (Figure 6). Ces lymphocytes B transformés peuvent persister sous forme de cellules mémoires infectées de manière latente par l'EBV. Le compartiment mémoire constitue donc le site de persistance au long cours du virus. D'autres modèles ont été proposés plus récemment comme

l'infection directe des lymphocytes B naïfs (sans passer par le centre germinatif) ou mémoires et l'infection directe des lymphocytes B mémoires de la zone marginale.

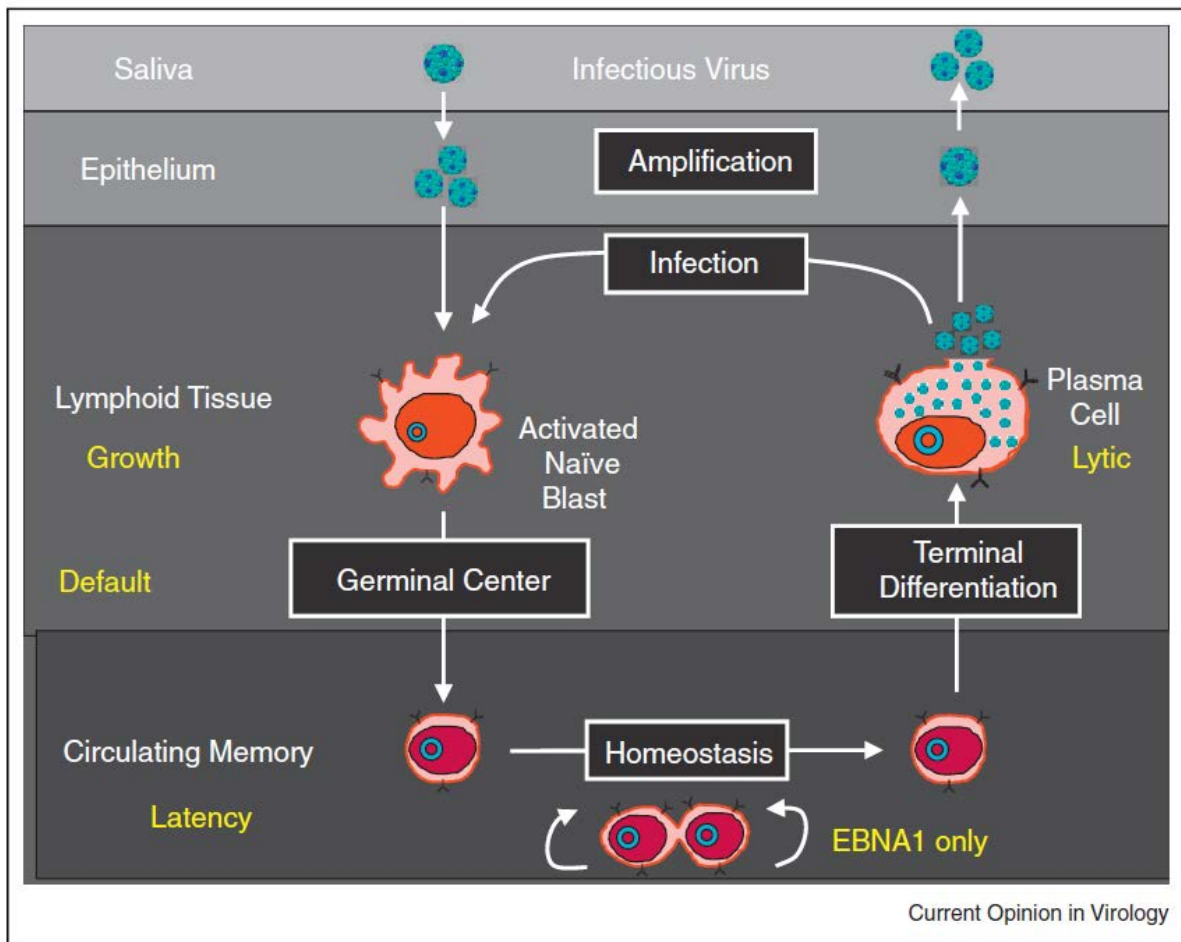


Figure 6. Mécanisme de persistance de l'EBV *in vivo* (Thorley-Lawson *et al.*, 2013).

8. Malignités liées à EBV (Rickinson 2014)

L'EBV est associé à un très large spectre de pathologies bénignes et malignes. L'expression des protéines virales dans les tissus infectés conduit à des altérations cellulaires qui contribuent à ces pathologies. Ici nous n'évoquerons que les infections persistentes et les pathologies tumorales. Nous nous concentrerons plus particulièrement sur le syndrome lymphoprolifératif après allogreffe de CSH. L'infection EBV peut induire des lymphomes à partir des lymphocytes B, des lymphocytes T ou NK et même des cancers. Le Lymphome de Burkitt, le Lymphome de Hodgkin, Le lymphome B à grande cellules et le Carcinome du Nasopharynx non différenciés sont parmi les plus importantes pathologies malignes associées à l'EBV chez l'hôte immunocompétent (Tableau VI). Elles s'établissent généralement tardivement après l'infection primaire, l'infection à l'EBV comptant pour un des facteurs du long et complexe processus de transformation maligne. On recense également les pathologies touchant des cibles cellulaires non conventionnelles de l'EBV comme des carcinomes de type lympho-épithéliome, des sous-types de carcinomes gastriques, des désordres

lymphoprolifératifs des cellules T, des tumeurs associées aux cellules dendritiques folliculaires, et quelques carcinomes hépatiques et mammaires.

Tableau VI. Tumeurs liées à l'EBV (Rickinson 2014).

Tumour	Tumour	subtypeCofactor	% EBV+veEBV	Latency ^a
LPD	"Early onset" post-transplant	Acute T cell suppression	100%	Latency III
AIDS-LPD	Immunoblastic/CNS	HIV, late-stage inf.	100%	Latency III
HL	Mixed cell./lymph-depl.	?	80–90%	Latency II
HL	Nodular sclerosing	?	15–20%	Latency II
AIDS-HL	Mixed cell./lymph-depl.	HIV, mid-stage inf.	>90%	Latency II
BL	Endemic	Malaria	100%	Latency I ^b
BL	Sporadic	?	10–85%	Latency I
AIDS-BL		HIV, early-stage inf.	30–40%	Latency I
DLBCL	Pyothorax	Chronic inflammation	100%	Latency I/II ^c
DLBCL	Elderly	T cell senescence?	>50%	Latency I/II ^c
DLBCL	"Late post-transplant"	Chronic T cell suppression	>50%	Latency I/II ^c
AIDS-DLBCL	"Centroblastic"	HIV, mid-stage inf.	30%	Latency I/II
AIDS-Lymph.	"Plasmablastic"	HIV, mid-stage inf.	80%	Latency I/II
AIDS-Lymph.	"Pleural effusion"	KSHV; HIV, late-stage inf.	80%	Latency I
AIDS-Sarc.	Leiomyosarcoma	HIV, end-stage inf.	100%	?
T/NK Lymph.	Nasal	Chronic Inflammation?	100%	Latency I/II ^d
NPC	LEL-type	Chronic Inflammation?	100%	Latency I/II
Gastric Ca	LEL-type	Chronic Inflammation?	90%	Latency I/II
Gastric Ca	Adenocarcinoma	<i>H. Pylori</i> /inflammation?	5–15%	Latency I/II

^a Latency I cells express EBER RNAs, BamHIA miRNAs, EBNA1. Latency I/II cells express EBER RNAs, BamHIA miRNAs, EBNA1, LMP2A,B with variable or no detectable LMP1. Latency II cells express EBER RNAs, BamHIA miRNAs, EBNA1, LMP1, LMP2A,B. Latency III cells express EBER RNAs, BamHIA miRNAs, BHRF1 miRNAs, EBNA1, 2, 3ABC, LP, MP1, LMP 2A,B.

^b Some 10–15% endemic BLs (and possibly some EBV-positive sporadic or AIDS-BLs) show a "Wp-restricted latency" rather than Latency I. Such BLs carry an EBNA2-deleted BV genome and express EBER RNAs, BamHIA miRNAs, BHRF1 miRNAs, BHRF1, EBNA1, 3ABC, LP in the absence of EBNA2 and the LMPs.

^c Most DLBCLs of pyothorax-associated, elderly or late-onset post-transplant types show a Latency I/II form of infection, but a minority can present as Latency III tumours.

^d T/NK cell lymphomas show a Latency I/II pattern of infection but express LMP2B in the absence of LMP2A.

-Désordres Lymphoprolifératifs Post-Transplantation (PTLD)

Les PTLD comprennent une large variété de proliférations lymphocytaires B (presque exclusivement) qui s'étalent de la pathologie à régression spontanée, à la prolifération clonale B létale indifférenciable d'un lymphome non-Hodgkinien (LNH), en passant par les expansions lymphoplasmacytoïdes typiques de type inflammatoire; et dont la majeure partie est associée à l'EBV. L'organisation mondiale de santé (OMS) a classifié ces pathologies en quatre grands groupes: (i) réactif, hyperplasie plasmacytique, hyperplasie lymphocytaire de type MI, (ii) PTLD polymorphiques, (iii) PTLD monomorphiques correspondant à un LNH à cellules B et T (plus rare), et (iv) Lymphome de Hodgkin (LH) et PTLD de type LH (également rare). Sur un plan histologique, il s'agit en général de lymphomes malins non hodgkiniens de haut grade de phénotype B, à grandes cellules de type immunoblastique ou indifférencié (Orazi *et al.*, 1997). Ces affections n'apparaissent pas dans les tissus ganglionnaires, et se présentent généralement comme des lésions multifocales dans des sites extra-ganglionnaires, impliquant fréquemment l'organe transplanté et le tractus gastro-intestinal. Les PTLD peuvent survenir suite à une transplantation d'organe solide ou de cellules souches dont l'incidence est en lien direct avec l'immunosuppression.

- PTLD après transplantation des organes

L'incidence rapportée des lymphoproliférations survenant après transplantation d'organes varie entre 1% et 20% selon le type de greffe d'organe et la sérologie EBV du couple donneur/receveur. Le risque est augmenté d'un facteur 15 chez les patients séronégatifs pour l'EBV (Aris *et al.*,

1996) et est proportionnel à l'intensité du traitement immunosuppresseur (la variation d'incidence selon le type d'organe transplanté reflète l'intensité du traitement immunosuppresseur nécessaire) (Savoldo *et al.*, 2001). Ces lymphomes surviennent entre 3 mois et 5 ans (voire davantage) après la greffe, la majorité étant toutefois observée dans les 12 premiers mois. Les lymphomes survenant précocement sont presque toujours associés à l'EBV alors que ceux de survenue tardive peuvent être EBV-positifs ou négatifs (Paya *et al.*, 1999). Enfin, les cellules tumorales dérivent en général des cellules B du receveur.

- *PTLD après allogreffe de CSH*

L'incidence des PTLD après allogreffe de CSH varie entre 0,2% - 8,1% selon le nombre de facteurs de risques en présence :

- L'immunodépression du receveur : déplétion T ou T+NK du greffon, GvHD aiguë sévère, sérum anti-lymphocytaire) (Curtis *et al.*, 1999);
- L'incompatibilité HLA entre donneur et receveur du fait d'une reconstitution T tardive;
- L'âge supérieur à 50 ans au moment de la greffe ;
- Une deuxième transplantation (Landgren *et al.*, 2009) et une dose élevée de CD34 ($>1,35 \times 10^6/\text{kg}$) (Van esser *et al.*, 2001).

Différents travaux ont montré que, durant les premiers mois suivant la greffe, la fréquence des lymphocytes T EBV-spécifiques était très faible voire nulle, et qu'il fallait au moins 6 mois pour revenir à des valeurs normales (Lucas *et al.*, 1996). A la différence des lymphoproliférations survenant après greffe d'organe, les cellules tumorales proviennent presque toujours des lymphocytes du donneur (Orazi *et al.*, 1997).

L'apparition d'un syndrome lymphoprolifératif EBV+ semble précédée par une nette augmentation de la charge virale associée à la prolifération des lymphocytes B infectés par l'EBV.

Plusieurs études ont ainsi montré qu'un monitoring de la charge virale EBV représentait un moyen de dépistage précoce des lymphoproliférations EBV+ à la fois après transplantation d'organe et greffe de CSH (Rowe *et al.*, 1997; Baldanti *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2001). Une augmentation de 2 ou 3 Log de la charge virale semble prédire le développement d'une lymphoprolifération EBV+ après greffe de CSH (Rooney *et al.*, 1995). Il convient néanmoins de souligner que tous les patients présentant une charge virale élevée (en particulier après transplantation d'organe) ne développeront pas une lymphoprolifération (Gottschalk *et al.*, 2002).

L'étude de la latence des cellules B impliquées dans ces pathologies démontre en effet qu'elles présentent une latence de type III (programme par défaut), incluant de fait l'expression de LMP1 et EBNA2, protéines critiques de la transformation cellulaire EBV induites. Sans contrôle immunitaire, une croissance non-inhibée des cellules B infectées par l'EBV va se développer. Cette lésion précoce

est généralement de nature polyclonale. Une baisse dans le régime immunosupresseur ou encore l'injection de cellules T cytotoxiques EBV-spécifiques peut mener à la régression de la lésion ; preuve empirique supplémentaire de l'importance du rôle de l'immunité cellulaire T dans le contrôle de la pathologie. Cependant, certains défauts génétiques peuvent survenir dans les cellules B infectées par l'EBV, incluant les gènes codant pour *p53*, *c-myc* ou encore *bcl-6* (Polack *et al.*, 1996; Cesarman *et al.*, 1998). Ces lésions alors souvent plus agressives, présentent un profil d'expression des gènes de latence différent et ne répondent pas à la baisse du régime immunosupresseur.

9. Reconstitution immunitaire spécifique anti-EBV

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

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

Selon l'intensité du conditionnement (MA ou NMA), le risque de développer un lymphome EBV induit varie (Chakrabarti *et al.*, 2003). Le taux de lymphocytes T circulants fonctionnels contre différents épitopes de l'EBV présentés par les molécules HLA de classe I a été mesuré chez des patients ayant subi une greffe de CSH après conditionnement MA ou NMA. Chez tous les patients, l'immunité est rétablie un an après la greffe. En revanche le délai après lequel débute la reconstitution immunitaire chez les patients ayant subi un conditionnement NMA est plus long que celui de ceux ayant reçu un conditionnement MA. L'immunité anti-EBV est correcte chez 3 patients sur 6 ayant un conditionnement MA trois mois après la greffe et 6/9 après six mois. Au contraire

pour les patients ayant reçu un conditionnement NMA seulement 1/9 a une immunité détectable 6 mois après la greffe de CSH.

A travers les deux études précédentes, on s'aperçoit que le développement d'un lymphome EBV est fonction de la charge virale EBV mais aussi du degré de reconstitution immunitaire anti-EBV. Ces deux paramètres doivent être suivis en parallèle. Dans le travail de *Meij et al.*, la technique des tétramères a été utilisée pour quantifier les lymphocytes T CD8+ anti-EBV, et la PCR quantitative pour suivre la charge virale régulièrement, après allogreffe géno- ou phénoïdétique déplétée partiellement en cellules T (*Meij et al.*, 2003). Dans les 3 premiers mois suivant la greffe, le taux de lymphocytes T CD8+ spécifiques de l'EBV reste indétectable et sous le seuil normal. Au bout de 6 mois, le nombre est détectable mais toujours insuffisant. Et après 12 mois, l'immunité anti-EBV est rétablie. Néanmoins, la plupart des réactivations EBV surviennent pendant la période d'immuno-insuffisance du patient, et surtout durant les 6 premiers mois consécutifs à la greffe. Il est démontré que les patients ayant retrouvé leur immunité anti-EBV au cours des 3 premiers mois ont moins de risque de subir une réactivation du virus que ceux pour lesquels elle n'est pas encore détectable. La valeur prédictive négative de déclenchement d'un lymphome EBV induit est de 100% si l'immunité anti-EBV est présente et suffisante. *Clave et al.*, ont mesuré à l'aide de la technique des tétramères la reconstitution cellulaire T spécifique anti-EBV et ont déterminé la charge virale de l'EBV par PCR en temps réel chez 56 receveurs d'allogreffe de CSH, MO non T déplétée, en situation génoidentique ou non apparentée, ou sang placentaire (*Clave et al.*, 2004). Dans cette étude, 8 tétramères de classe I présentant des épitopes de protéines latentes et lytiques de l'EBV ont été utilisés afin d'évaluer la réponse immunitaire durant les premiers mois post-allogreffe de CSH. Les auteurs montrent que chez tous les patients qui ont contrôlé la réactivation EBV sans rituximab, en présence d'une charge virale EBV positive pouvant atteindre 2110 gEq/150000 PBMC (seuil de positivité 1000 gEq/150000 PBMC), présentaient un taux de lymphocytes CD8+ EBV spécifiques représentant plus de 1.4% de la population CD8+. En prenant en considération à la fois la charge virale EBV et la reconstitution immunitaire spécifique EBV, les auteurs montrent qu'il est possible de différencier les patients qui nécessitent absolument la mise en place d'un traitement préemptif par Rituximab de ceux qui peuvent spontanément négativer la charge virale EBV. Cette conclusion est également apportée par *Annels et al.*, à travers une étude rétrospective suivie d'une étude prospective (*Annels et al.*, 2006). Cette dernière a porté sur une cohorte de 52 patients allogreffés dont 14, à haut risque de développer un lymphome EBV ont bénéficié d'une étude de la reconstitution immunitaire spécifique par tétramères. Une réactivation EBV a été documentée chez 3 patients. Chez deux d'entre eux, l'administration de Rituximab a pu être évitée, du fait d'une reconstitution immunitaire spécifique T anti-EBV rapide et significative. Les auteurs recommandent une analyse fréquente de la

reconstitution immunitaire spécifique EBV chez les patients présentant une charge virale élevée et qui sont à haut risque de développer un lymphome induit par l'EBV. De récentes méthodes permettent de suivre la réponse cellulaire T spécifique anti-EBV: les tétramères HLA de classe I spécifiques de peptides qui ne donnent pas d'information sur la fonctionnalité des cellules contrairement aux autres techniques: le dosage des cytokines intracellulaires ou encore l'Elispot IFN- γ , technique la plus sensible. La disponibilité de ces techniques rapides doit permettre de mieux définir les patients devant recevoir un traitement préemptif par Rituximab.

Dans une étude, menée par notre équipe, de la reconstitution immunitaire évaluée par la technique Elispot IFN- γ chez 35 patients évaluables après allogreffe de HSCT, nous avons observé que 14 patients ont présenté une charge virale positive pour l'EBV. A chaque fois que la charge virale s'est négativée spontanément, les résultats de l'Elispot étaient positifs traduisant une reconstitution immunitaire efficace. Le suivi combiné de la charge virale et de la reconstitution immunitaire permet de mieux identifier les patients nécessitant la mise en place d'un traitement préemptif (D'Aveni *et al.*, 2011).

10. Traitements des infections à EBV

Dans les allogreffes de CSH déplétées en lymphocytes T, il a été montré qu'un traitement prophylactique très efficace consistait à associer une déplétion des lymphocytes B à l'aide d'anticorps anti-CD19 à la déplétion T (Bensoussan *et al.*, 1998).

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

Plus récemment, un anticorps chimérique anti-CD20 dirigé contre les cellules B, le Rituximab (Mabthera®), utilisé initialement dans le traitement des lymphomes folliculaires en rechute, a montré son efficacité dans le traitement des infections EBV et des PTLN EBV induits après allogreffe de CSH (van Esser *et al.*, 2001). Cependant, ce traitement coûteux entraîne une déplétion lymphocytaire B majeure et longue retardant la récupération de l'immunité anti-EBV en l'absence de lymphocytes B infectés par l'EBV (Masjosthusmann *et al.*, 2009).

Le traitement alternatif est l'immunothérapie cellulaire par injection de lymphocytes T spécifiques anti-EBV.

Partie 3 IMMUNOTHERAPIE CELLULAIRE ADOPTIVE

Ce chapitre a été écrit d'après deux revues publiées en 2012 par notre équipe :

- *Immunothérapie adoptive antivirale après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques*. Wang YY, Aissi-Rothé L, Decot V, Stoltz JF, Bensoussan D. **Virologie**. 2012;16(6): 345-55.

- *Apport des méthodes d'isolement immunomagnétique de lymphocytes T cytotoxiques dans la restauration rapide d'une immunité antivirale après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques*. Aissi-Rothé L, Decot V, Wang YY, Stoltz JF, Bensoussan D. **Revue Francophone des Laboratoires**. 2012;439:55-60.

La revue bibliographique présentée ci-après a été mise à jour.

Nous venons de voir dans les chapitres précédents que les traitements médicamenteux anti-viraux préconisés peuvent s'avérer inefficaces tout particulièrement en l'absence de reconstitution immunitaire concomitante (Feuchtinger *et al.*, 2005). Malgré l'émergence de nouvelles molécules anti-virales, la nécessité de restaurer cette immunité anti-infectieuse est plus que jamais d'actualité, les CTL représentant l'élément principal de défense contre les virus mais également contre les tumeurs. La première stratégie d'immunothérapie adoptive anti-infectieuse développée dans les années 1990 a été la réinjection de lymphocytes du donneur (*Donor Lymphocyte Infusion ; DLI*). Bien que quelques succès aient été rapportés dans la littérature, cette technique est aujourd'hui abandonnée dans cette indication du fait du faible nombre de lymphocytes T spécifiques injectés et du risque associé de survenue d'une GvHD, mais reste d'actualité pour favoriser l'effet GvL (Papadopoulos *et al.*, 1994; Bordigoni *et al.*, 2001). Cependant, ces observations ont révélé la nécessité d'évoluer vers des stratégies d'immunothérapie adoptive spécifique. Deux options différentes ont été explorées en parallèle: d'une part l'élimination des lymphocytes T alloréactifs afin de conserver intacts les lymphocytes T garants de l'activité anti-infectieuse tout en limitant le risque de survenue d'une GvHD (*déplétion alloréactive*), d'autre part la sélection des lymphocytes T spécifiques antiviraux (VSTs) (Figure 7).

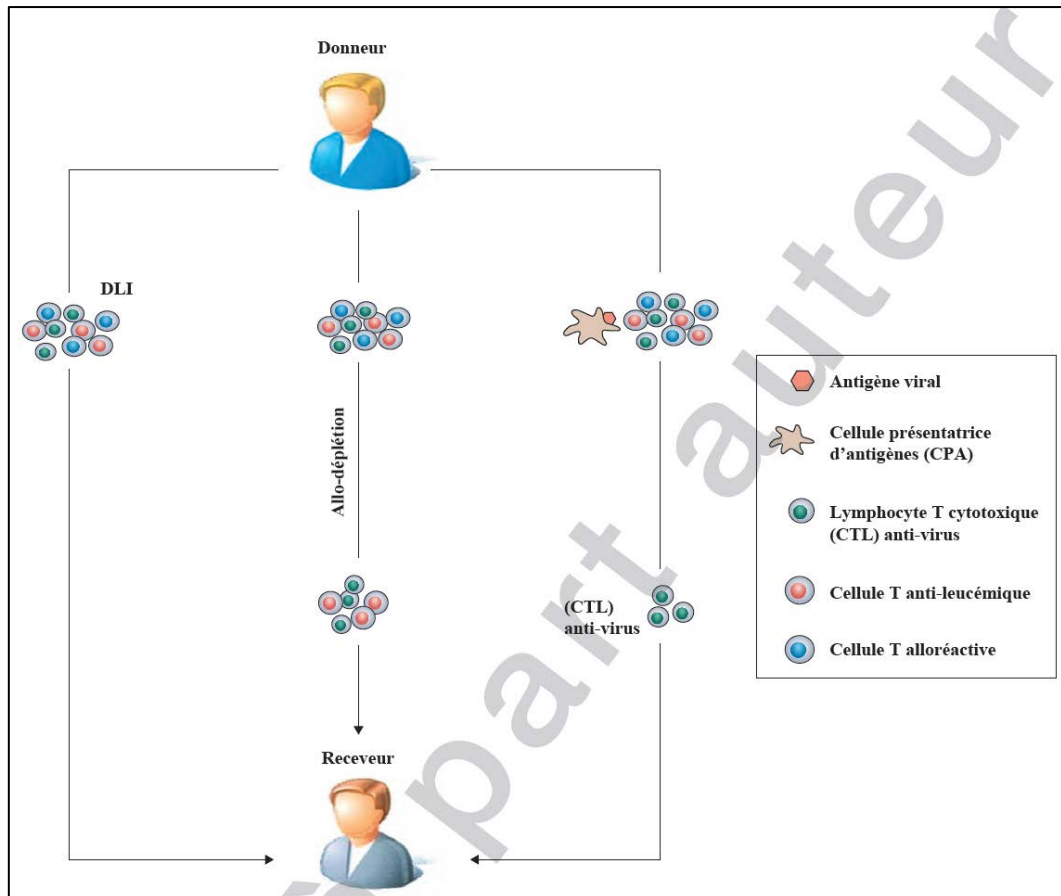


Figure 7. Stratégie d'immunothérapie adoptive.

La première option a donné des résultats très prometteurs dans les déficits immunitaires en utilisant une immunotoxine pour éliminer les lymphocytes T alloréactifs (André-Schmutz *et al.*, 2002). Cependant, les résultats ont été plus décevants dans les hémopathies malignes, l'élimination des lymphocytes T alloréactifs entraînant la disparition des lymphocytes T responsables de l'effet GvL, conduisant à un taux de rechute très élevé (Amrolia *et al.*, 2006). La deuxième option consiste à transférer une immunité spécifique issue du donneur en administrant des CTL dirigés contre un ou plusieurs virus, isolés au préalable *in vitro* et éventuellement amplifiés. Cette approche initialement développée par culture cellulaire de longue durée, a bénéficié des évolutions des techniques de production de grade clinique permettant aujourd'hui d'avoir une meilleure réactivité et une disponibilité rapide des CTL au moment où le patient en a besoin. Nous nous proposons de faire la synthèse des différentes techniques d'immunothérapie cellulaire spécifique antivirale qui sont, pour la plupart, évaluées actuellement dans le cadre de protocoles cliniques. Nous envisagerons l'immunothérapie adoptive vis à vis d'un seul virus ou de plusieurs simultanément et évoquerons les banques de CTL antiviraux.

1. Immunothérapie non spécifique : Donor Lymphocyte Infusion (DLI)

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

Pour l'EBV, Papadopoulos *et al.*, ont été les premiers à rapporter le succès des DLI dans le traitement des PTLN associés à l'EBV après allogreffe de CSH (Papadopoulos *et al.*, 1994). Cinq patients, présentant un lymphome induit par l'EBV ont été traités par une dose de DLI de 1×10^6 CD3/kg capable d'engendrer une rémission complète du PTLN, soutenue dans le temps pour les trois patients suivis au long cours, sans induire de GvHD de grade supérieur à II chez le receveur. Cette équipe a ensuite traité 17 autres patients avec des DLI (de $2,1 - 5,0 \times 10^5$ CD3/kg) et a rapporté des résultats tout aussi encourageants (O'Reilly *et al.*, 1998). Dans un article de 2012, la même équipe a complété ces résultats et présente les résultats d'une DLI chez 30 patients avec PTLN. Parmi eux, 17 patients ont eu une rémission complète et un patient a eu une rémission partielle, le pourcentage de rémission est de 73% (Dobrovina *et al.*, 2012). Une GvHDa réversible est survenue chez 17% des patients : 3 patients ont développé une GvHDa *de novo* de grade II-III, un patient, une GvHD aiguë cutanée de grade II-III. Trois patients ont développé une GvHDc *de novo*. Des résultats moins encourageants en terme de survenue de GvHD ont été rapportés par Heslop *et al.*, (Heslop *et al.*, 1994).

Pour l'ADV, Hromas *et al.*, ont rapporté le cas d'un patient présentant une cystite hémorragique associée à l'ADV traitée avec succès par une injection de 1×10^6 CD3/kg (Hromas *et al.*, 1994). Le patient n'a pas développé de GvHD. Chakrabarti *et al.*, ont rapporté l'expérience de deux patients ayant nécessité une injection de DLI (3×10^7 CD3/kg et 1×10^7 CD3/kg, en situation génoidentique) pour une rechute de leur hémopathie maligne. Ces deux patients présentaient des infections à ADV complètement résolutives après l'administration des DLI (Chakrabarti *et al.*, 2000). Bordigoni *et al.*, ont rapporté des résultats obtenus après traitement par DLI de donneurs HLA non apparentés ($1-5 \times 10^5$ CD3/kg) associées ou non à un traitement antiviral anti-ADV (vidarabine, cidofovir ou ribavirine) chez 3 receveurs d'allogreffe de CSH (Bordigoni *et al.*, 2001). Chez deux patients sur 3, l'ADV a été rapidement éliminé, alors que le 3ème patient est décédé de l'infection adénovirale. Une autre équipe a rapporté des résultats bien moins encourageants. Chez 4 patients atteints de cystites associées à l'ADV, aucune amélioration clinique n'a été observée après administration de DLI tout en conservant l'immunosuppression par ciclosporine A (Childs *et al.*, 1998). Cette dernière observation

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

Pour le CMV, Witt *et al.* ont traité un enfant ayant une infection à CMV post-greffe de moelle osseuse pour un neuroblastome avec 7 injections de DLI du donneur de CSH du J₁₆ au J₂₁. En moyenne, les auteurs rapportent que le patient a reçu plus de $400 \times 10^6 \text{CD3/kg}$ à chaque injection. La charge virale CMV s'est négativée après la dernière injection à J₂₂, et le patient, en bon état général, n'a présenté aucune infection CMV dans l'année qui a suivi (Witt *et al.*, 1998). Puis Kawakami *et al.* ont rapporté le cas d'une femme de 47 ans présentant une rétinite à CMV après une allogreffe haplo-identique pour LAM. Le traitement médicamenteux préconisé (ganciclovir et foscarnet) a été complété par une DLI à la dose de $1 \times 10^5 \text{CD3/kg}$. Dix-huit jours après la DLI, la rétinite s'est améliorée et une inflammation locale a été observée. Parallèlement une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4+ en périphérie a été observée. La patiente n'a pas développé de GvHD (Kawakami *et al.*, 2005).

2. La Déplétion alloréactive

La déplétion alloréactive consiste à s'affranchir des lymphocytes T alloréactifs responsables de la réaction de GvHD soit par élimination physique des lymphocytes T alloréactifs du greffon soit par neutralisation de leur effet alloréactif par induction d'anergie – tout en préservant le capital des lymphocytes T anti-infectieux. L'équipe de Necker a mené un essai clinique chez des patients atteints de déficits immunitaires primitifs, pour la majorité d'entre eux, afin de tester l'impact de l'injection de doses de lymphocytes T allodéplétés sur la reconstitution immunitaire. Le premier essai a inclus 15 patients qui ont reçu une allogreffe (deux allogreffes pour l'un d'entre eux) en situation haploidentique dans 13 cas et avec un donneur non apparenté dans 3 cas (André-Schmutz *et al.*, 2002). Les patients ont tous reçu un greffon déplété en lymphocytes T par la méthode de sélection positive CD34+ contenant en médiane $13,1 \times 10^6 \text{CD34}^+/\text{kg}$ (de 4,1 à 51,8) et une médiane de $1 \times 10^4 \text{CD3}^+/\text{kg}$ (de 0,21 à $1,88 \times 10^4$), après un conditionnement associant Busulfan, Endoxan et SAL. Aucune prophylaxie de la GvHD n'a été administrée. Les cellules allodéplétées ont été préparées en mettant en contact en culture mixte lymphocytaire les cellules du donneur et les cellules du receveur irradiées. Après 3 jours de culture, l'anticorps anti-chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25) couplé à une immunotoxine a été ajouté pendant toute une nuit. L'efficacité de la déplétion a

été contrôlée par cytométrie en flux mais également par un ensemble de tests fonctionnels *in vitro* montrant la perte du potentiel alloréactif vis-à-vis du receveur mais pas vis-à-vis d'un tiers et la conservation du potentiel anti-infectieux. L'injection de cellules allodéplétées a été réalisée une fois la prise du greffon confirmée et lorsque le taux de SAL chez le patient était $< 0,4 \mu\text{g/ml}$, c'est-à-dire en médiane à 24 jours post-greffe (de 15 à 47 jours). Quatre doses de lymphocytes T allodéplétés ont été administrées : 1, 4, 6 et 8×10^5 CD3/kg. L'efficacité clinique de la déplétion a été montrée par l'absence de GvHD de grade $> \text{II}$. Au total, deux patients ont développé une GvHD aiguë de grade II et deux autres de grade I. Cependant, les auteurs signalent que ces 4 patients avaient reçu des lymphocytes T allodéplétés présentant une alloréactivité résiduelle élevée, supérieure à celle observée pour les autres patients ($> 1\%$). La reconstitution immunitaire des patients a été très rapide. Les données de cet essai suggèrent que les lymphocytes T allodéplétés permettent de prévenir la survenue d'infections. Chez deux patients qui présentaient une infection CMV active et/ou une infection EBV au moment de l'injection des lymphocytes T, une résolution de ces deux infections a pu être observée de même qu'une augmentation des CTL après injection.

Une étude similaire a été menée par l'équipe de Malcom Brenner chez des patients atteints dans la majorité des cas d'hémopathies malignes et allogreffés en situation haploidentique (Amrolia *et al.*, 2006). La technique d'allodéplétion était la même. Seize patients âgés en médiane de 9 ans (de 2 à 58 ans) ont reçu un greffon déplété en lymphocytes T contenant en médiane : $11,5 \times 10^6$ CD34/kg (de $5,9$ à 20×10^6 CD34/kg) et $2,6 \times 10^4$ CD3/kg (de $0,73$ à 18×10^4 CD3/kg). Les patients ont reçu des injections de lymphocytes T allodéplétés à J₃₀, J₆₀ et J₉₀ à la dose de 10^4 cellules/kg/dose pour 8 d'entre eux et de 10^5 cellules/kg/ dose pour les 8 autres. La reconstitution immunitaire T et l'immunité anti-virale ont été considérablement améliorées (2 décès sont liés à une cause infectieuse) principalement lorsqu'une dose de 10^5 cellules/kg était administrée. Un patient a présenté une GvHD de grade IV évoluant vers une GvHD chronique hépatique létale et un autre patient a présenté une GvHD de grade II, évoluant également en GvHD chronique résolutive sous immunosuppression. Le taux de rechute de l'hémopathie maligne est élevé dans cette étude (7/16 patients). L'équipe de John Barrett a réalisé un essai clinique de déplétion alloréactive avec la même technique (anticorps anti-CD25 couplé à une immunotoxine) chez 16 patients d'âge médian 65 ans (51 à 73 ans) atteints d'hémopathie maligne à un stade avancé et recevant une allogreffe de CSP à partir d'un donneur génoidentique après un conditionnement non myéloablatif (Solomon *et al.*, 2005). Ces patients ont reçu un greffon déplété en lymphocytes T renfermant en médiane $4,5 \times 10^6$ CD34/kg (de $3,4$ à $7,3 \times 10^6$ CD34/kg), complété avec des lymphocytes T allodéplétés en médiane 1×10^8 /kg (de $0,2$ à $1,5 \times 10^8$ /kg). Quinze patients ont eu une prise du greffon. Le taux de GvHD de grade II à IV observé a été de $46 \pm 13\%$ et de GvHD de grade III à IV de $12 \pm 8\%$. Les auteurs soulignent que dans cette

population de patients, l'incidence de la GvHD de grade II à IV est classiquement de 58% et l'incidence de la GvHD de grade III à IV est classiquement 34%, avec une prophylaxie standard de la GvHD. Les auteurs concluent à un bénéfice de la déplétion alloréactive dans la prévention de la GvHD pour cette population de patients et montrent que la prise de greffe, l'effet GvL et la reconstitution immunitaire des patients n'ont pas été affectés, contrairement à l'étude précédente.

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

Récemment, l'équipe de Amrolia a mis au point une technique immunomagnétique de réalisation la déplétion alloréactive des lymphocytes T grâce à un double marquage avec les anticorps anti-CD71-biotine et anti-CD25 (Albon *et al.*, 2013). Cinq manipulations ont été réalisées. Les auteurs rapportent une viabilité excellente et une pureté très satisfaisante des lymphocytes CD25⁻CD71⁻ (un pourcentage inférieur à 0,2% des lymphocytes T CD3/CD25 et CD3/CD71). De plus, la spécificité anti-virale (EBV et CMV) a été conservée.

La déplétion sélective des lymphocytes alloréactifs a été bien étudiée à l'échelle recherche ou pré-clinique par plusieurs équipes en utilisant différentes cibles : CD25, CD71, CD69, CD95, CD137 ou CD134 (Hartwig *et al.*, 2006; Hartwig *et al.*, 2008; wehler *et al.*, 2007; Ge *et al.*, 2008). Ces stratégies n'ont pas toutes donné lieu à des applications cliniques. De plus, la déplétion alloréactive a également été envisagée par photodéplétion (Mielke *et al.*, 2008), mais aussi en mettant les cellules en anergie (Davies *et al.*, 2008).

3. Immunothérapie spécifique anti-infectieuse

3.1 Production des CTL anti-virus par culture cellulaire

3.1.1 Les CTL anti-EBV

Nous n'évoquerons dans ce chapitre que les études ayant porté sur les syndromes lymphoprolifératifs induits par l'EBV après allogreffe de CSH (Tableau VII).

Cependant, des CTL anti-EBV ont été également générés dans d'autres contextes cliniques (Syndromes lymphoprolifératifs induits par l'EBV: *EBV-PTLD* survenant après allogreffes d'organe, lymphome de hodgkin, carcinome naso-pharyngé). En effet, ces pathologies tumorales, du fait de

l'expression des nombreux antigènes immunogènes de l'EBV, constituent une cible privilégiée pour un effet anti-viral et également anti-tumoral des CTL.

A partir des années 1993, l'équipe de Malcom Brenner a été la première à développer une immunothérapie adoptive à visée préventive et curative des EBV-PTLD après allogreffe de CSH (Heslop *et al.*, 1996 ; Rooney *et al.*, 1998). D'autres équipes ont également travaillé sur le sujet (Gustafsson *et al.*, 2000; Comoli *et al.*, 2005). En effet, avant l'avènement du Rituximab au début des années 2000 (Kuehnle *et al.*, 2000) et son utilisation dans le traitement de l'EBV-PTLD, la morbidité et la mortalité liée à l'EBV après une allogreffe T-déplétée était très élevée (entre 1 à 25%).

Tableau VII. Essais cliniques utilisant des CTL anti-EBV produit par culture cellulaire après allogreffe de CSH.

Protocole d'expansion	Cellules injectées	Patients traités	Résultats cliniques	Références
<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	10 (3 comme traitement et 7 comme prophylaxie)	3/3 ont contrôlé l'infection	Rooney <i>et al.</i> , 1995
<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	39 avec traitement prophylactique	Aucun patient n'a développé de PTLD en comparaison avec 11,5% du groupe contrôle	Rooney <i>et al.</i> , 1998
<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	6 patients traités	5 patients en rémission complète ; 1 décédé	Rooney <i>et al.</i> , 1998 ; Gottschalk <i>et al.</i> , 2001
<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	114 patients (101 ont reçu un traitement prophylactique ; 13 ont reçu un traitement curatif)	101/101 : aucun développement d'un EBV-PTLD 11/13 : rémission complète	Heslop <i>et al.</i> , 2010
<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	6 patients avec une forte charge virale	5/6 : réduction de la charge virale post-CTL. 1/6 : décédé suite à un PTLD	Gustafsson <i>et al.</i> , 2000
<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	1 patient traité pour une lymphoprolifération induite par l'EBV	Pas de réponse à la thérapie	Imashuku <i>et al.</i> , 1997
<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	6 patients (dont 5 ayant développé un PTLD) ont été traités par CTL anti-EBV après échec du traitement par Rituximab	Une négativation de la charge virale EBV, une résolution clinique des PTLD chez tous les patients. Aucun évènement indésirable, ni aucune réaction de GvHD.	Comoli <i>et al.</i> , 2002 ; 2007 ; 2008
<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux provenant d'une banque	8 patients avec un PTLD progressif ne répondant pas aux traitements conventionnels.	3 patients ont une réponse complète ; 2 patients sans réponse ; 3 patients n'ont pas fini le traitement	Haque <i>et al.</i> , 2002
<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux provenant d'une banque	33 patients avec un PTLD ne répondant pas aux traitements conventionnels.	14 patients ont une réponse complète ; 3 avec réponse partielle ; 16 sans réponse	Haque <i>et al.</i> , 2007
<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux provenant d'une banque	11 patients avec un PTLD ne répondant pas aux traitements conventionnels	Aucune toxicité immédiate, ni aucune réaction de GvHD. 3 patients en rémission complète et 1 en rémission partielle	Gallot <i>et al.</i> , 2014
<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	49 patients (30 traités par DLI, 19 traités par CTL)	13 patients en rémission complète (68%)	Dobrovina <i>et al.</i> , 2012

EBV, Epstein Barr Virus; CTL, Cytotoxic T Lymphocytes; IFN γ , Interferon gamma; GvHD, Graft versus Host Disease; PTLD, Post-Transplant Lymphoproliferative Disease

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

L'équipe de Brenner a montré une efficacité des CTL anti-EBV dans la prévention de la survenue des EBV-PTLD ainsi que dans l'apparition d'une immunité anti-EBV chez le receveur (Heslop *et al.*, 1996; Rooney *et al.*, 1998). Une équipe japonaise a quant à elle rapporté en 1997 une expérience malheureuse chez un patient présentant un EBV-PTLD (Imashuku *et al.*, 1997). Les auteurs ont suggéré que l'injection de CTL anti-EBV était intervenue trop tard par rapport au diagnostic (20 et 30 jours après) et à des doses faibles. Récemment, ont été rapportés par l'équipe de Brenner les résultats de l'injection des CTL anti-EBV chez 114 patients, l'ensemble des patients ayant été pris en charge par ce traitement. Cent un patients ont reçu ce traitement en prophylaxie et aucun d'entre eux n'a développé de syndrome lymphoprolifératif induit par l'EBV (Heslop *et al.*, 2010). De plus, aucune GvHD *de novo* n'a été observée et 8 patients qui avaient déjà présenté une GvHD ont eu une réactivation rapidement maîtrisée. Les 26 premiers patients ont reçu des CTL anti-EBV marqués génétiquement avec un vecteur rétroviral contenant le gène de résistance à la néomycine (*neo*). Ce marquage a permis de montrer que les CTL pouvaient survivre jusqu'à 9 ans après l'injection (Heslop *et al.*, 2010). Sur 13 patients traités en curatif par des CTL anti-EBV, 11 ont été mis en rémission complète. Les deux premiers patients avaient été décrits antérieurement (Rooney *et al.*, 1998). L'un des deux patients n'avait pas répondu au traitement, la tumeur ne présentant plus les 2 épitopes principaux (notamment EBNA-3B) contre lesquels réagissaient les CTL anti-EBV, entraînant une résistance au traitement (Gottschalk *et al.*, 2001). C'est pourquoi, il est préférable que le produit cellulaire soit polyclonal avec des spécificités antigéniques larges afin de diminuer les risques d'échappement de la tumeur au système immunitaire et composé de cellules T anti-EBV CD4+ et CD8+ (Leen *et al.*, 2010). Cette équipe a conclu qu'une dose de 2×10^7 CTL anti-EBV/m² était sans danger et efficace pour une utilisation prophylactique ou curative.

L'équipe de Richard O'Reilly a rapporté son expérience en 2012. Dix-neuf patients présentant un EBV-PTLD ont été traités avec des CTL anti-EBV produits en stimulant par la LCL autologue des PBMC déplétés en monocytes par adhérence et en cellules NK par technique immunomagnétique. Une rémission complète a été obtenue pour 13 patients (68%). Aucun patient n'a développé la GvHD aiguë ou chronique *de novo* ou n'a présenté une aggravation d'une GvHD pré-existante (Doubrovina *et al.*, 2012).

Parmi les autres équipes qui ont travaillé en clinique dans ce domaine, Gustafsson a rapporté en 2000 une expérience de traitement de 6 patients par CTL anti-EBV produits selon un protocole proche de celui de l'équipe d'Heslop (Gustafsson *et al.*, 2000). Cinq patients ont reçu les CTL anti-EBV dès que leur charge virale EBV a dépassé un seuil fixé arbitrairement par les auteurs alors que le 6ème patient a été traité en prophylactique. Ce dernier n'a d'ailleurs pas réactivé l'EBV. Parmi les 5 patients traités en pré-emptif, 4 n'ont pas évolué vers un syndrome lymphoprolifératif induit et ont

vu leur charge virale diminuer de 2 à 4 Log dans les 3 à 4 semaines qui ont suivi la première injection, même si des réactivations de charge virale EBV sont intervenues secondairement. Le cinquième patient est décédé rapidement d'un EBV-PTLD, les CTL injectés n'étant pas spécifiques de la lignée EBV autologue (cytotoxicité équivalente *in vitro* vis-à-vis de la lignée EBV autologue et de la lignée EBV allogénique).

L'équipe italienne de F Locatelli a publié une mise à jour de ses résultats dans le traitement des PTLD par injection de CTL anti-EBV produits selon une méthode similaire à celle de l'équipe de M Brenner (Comoli *et al.*, 2008; Comoli *et al.*, 2002). Sur 46 patients ayant reçu une allogreffe déplétée en lymphocytes T en situation haplo-identique, 12 ont développé une charge virale EBV positive nécessitant l'instauration d'un traitement par Rituximab. Deux patients n'ont pas répondu au traitement et 4 patients ayant initialement répondu au rituximab ont vu leur charge virale EBV réaugmenter à l'arrêt du traitement. Ces 6 patients (dont 5 ayant développé un PTLD) ont été traités par CTL anti-EBV qui ont engendré une négativation de la charge virale EBV, une résolution clinique des PTLD chez tous les patients en médiane après 20 jours. Aucun événement indésirable, ni aucune réaction de GvHD n'ont été observés.

3.1.2 Les CTL anti-ADV

Quelques études pré-cliniques se sont intéressées à la production de CTL anti-ADV par culture (Smith *et al.*, 1996; Comoli *et al.*, 2008). L'équipe de Comoli a produit des lignées lymphocytaires spécifiques de l'ADV par stimulation, pendant 12 jours, de PBMC issus de 21 donneurs, avec un pool de 5 peptides de 30 acides aminés de la protéine Hexon puis par expansion en présence d'IL-2. Les auteurs rapportent une présence majoritaire des lymphocytes T CD4⁺ dans la plupart des lignées, une capacité à proliférer pour 19 d'entre elles avec une cytotoxicité spécifique pour 9 d'entre elles et une diminution importante de l'alloréactivité. Malgré ces résultats encourageants, ces expériences n'ont pas débouché sur des essais cliniques.

Plus récemment, l'équipe de Matthes-Martin a rapporté la première utilisation clinique de CTL anti-ADV obtenues par culture (Geyeregger *et al.*, 2014). Les CTL anti-ADV ont été produites en stimulant les PBMC des donneurs avec des pools de peptides se chevauchant. Une étape d'expansion en présence d'IL-15 pendant 12 jours a été réalisée. Deux patients présentant une infection à ADV résistante au traitement par Cidofovir ont reçu des CTL anti-ADV. Une négativation de la charge virale ou une diminution de plus d'1,5 Log a été obtenue chez les deux patients en respectivement 15 et 18 jours. Parallèlement, l'expansion des lymphocytes T spécifiques de l'ADV a été observée par Elispot IFN- γ en respectivement 30 et 22 jours.

3.1.3 Les CTL anti-CMV

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

L'équipe de Riddell a été la première à s'intéresser à l'immunothérapie adoptive anti-CMV en développant des clones de cellules T CD8⁺ anti-CMV, isolés à partir du sang du donneur de CSH et amplifiés *in vitro* puis administrés à des doses croissantes de $3 \times 10^6/\text{kg}$ à $1 \times 10^9/\text{kg}$, à 14 patients après allogreffe de CSH (Walter *et al.*, 1995). Les auteurs ont montré que ces injections de clones T CD8⁺ anti-CMV étaient bien tolérées et qu'elles permettaient le transfert d'une immunité anti-CMV chez le receveur. Les clones ont persisté pendant au moins 8 semaines avant de disparaître progressivement chez les patients qui n'avaient pas reconstitué une immunité CD4 anti-CMV endogène. Cette étude a mis en évidence l'importance d'associer aux CTL CD8⁺ spécifiques une population de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques afin que le transfert d'immunité adoptive soit maintenu dans le temps. Puis Einsele *et al.*, ont généré des lignées polyclonales de CTL anti-CMV en utilisant un lysat CMV permettant d'activer et d'amplifier les cellules T CD4⁺ et les CD8⁺ (Einsele *et al.*, 2002, blood; Einsele *et al.*, 2002, cytotherapy). Les CTL anti-CMV injectés à la dose de $1 \times 10^7/\text{m}^2$ ont permis la réduction de la charge virale chez 7 patients traités sur 8, cet effet étant soutenu dans le temps pour 5 patients, les 2 autres ayant réactivé le CMV. Cependant, une deuxième injection de CTL anti-CMV a entraîné la négativation de la charge virale pour l'un d'entre eux (Einsele *et al.*, 2002, Cytotherapy).

Tableau VIII. Essais cliniques utilisant des CTL anti-CMV après allogreffe de CSH.

Protocole d'expansion	Cellules injectées	Patients traités	Résultats cliniques	Références
<i>Culture in vitro</i>	Clones cellules T CD8+	Injection prophylactique à 14 patients	Pas d'infection à CMV	Walter <i>et al.</i> , 1995
<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	8 patients avec infection	5 patients ont eu une négativation de la charge virale CMV après 1 dose de CTL ; 1 patient, après la 2 ^{ème} dose ; 1 n'a pas négativé la charge virale CMV	Einsele <i>et al.</i> , 2002b
<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	16 patients avec virémie	8 patients ont négativé la charge virale CMV sans antiviraux ; 2 patients/14 évaluables ont réactivé le CMV nécessitant un traitement anti-viral.	Peggs <i>et al.</i> , 2003
<i>Culture in vitro / Sélection Immunomagnétique</i>	CTL polyclonaux	23 patients avec virémie (16 ont reçu des CTL cultivés <i>in vitro</i> ; 7 ont reçu des CTL-IFN γ (5 après réactivation de la charge virale et 2 en prophylactique))	8/16 : négativation de la charge virale CMV sans antiviraux 8/16 : réactivation du CMV puis négativation concomitante à l'injection de CTL. 7/7 : expansion des CTL anti-CMV, qu'il y ait ou non une charge virale CMV détectable (5/7 ont reçu une thérapie médicamenteuse anti-virale concomitante, mais de plus courte de durée pour 4 d'entre eux)	Mackinnon <i>et al.</i> , 2008
<i>Culture in vitro</i>	Cellules T CD8+ spécifiques d'un peptide de pp65	Injection prophylactique à 9 patients	6/9 : expansion <i>in vivo</i> des cellules T spécifiques anti-CMV post-injection ; 2/9 réactivation CMV résolutive sans antiviraux	Micklethwaite <i>et al.</i> , 2007
<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	Injection prophylactique à 12 patients	12/12 : reconstitution immunitaire spécifique anti-CMV post-injection, durable dans le temps pour 8 patients ; 4/12 : réactivation CMV résolutive sans antiviraux pour 2 patients	Micklethwaite <i>et al.</i> , 2008
<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	7 patients avec antigénémie ou virémie positive après plus de 2 semaines de traitement anti-viral	5/7 : cytotoxicité anti-CMV dans les 4 à 6 semaines suivant les CTL 2/7 : pas de reconstitution (viabilité des CTL insuffisante ou poursuite du traitement immunosuppresseur).	Bao <i>et al.</i> , 2012
<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	1 patient recevant des CTL anti-CMV d'un donneur de CSH séronégatif pour le CMV	Diminution de la charge virale CMV	Horn <i>et al.</i> , 2009

CMV, Cytomégalo virus; CTL, *Cytotoxic T Lymphocytes*; IFN- γ , *Interféron gamma*; GvHD, *Graft versus Host Disease*; pp65, une protéine immunodominante du CMV

Peggs *et al.*, ont utilisé une approche de production légèrement différente en stimulant les PBMC du donneur avec des cellules dendritiques (DC) du donneur, cellules présentatrices d'antigène chargées avec des antigènes CMV dérivés d'une souche CMV inactivée (Towne strain) (Peggs *et al.*, 2001). Seize patients ayant présenté une réactivation CMV ont reçu 1 x 10⁵ CTL anti-CMV/kg après 36 jours (en médiane) post-greffe (Peggs *et al.*, 2003). Aucune réaction de GvHD n'a été observée et une expansion massive *in vivo* des CTL anti-CMV (de 3 à 5 Log) a été observée chez 4 patients explorés. Les thérapeutiques médicamenteuses anti-CMV ont été arrêtées pour 8 patients. Seuls 2

patients sur les 14 évaluables ont eu une réactivation du CMV nécessitant la mise en place d'un traitement antiviral.

Les études plus récentes ont eu pour objectif de s'affranchir, pour la stimulation cellulaire T, de l'utilisation de lysat ou d'antigènes dérivés d'une souche CMV qui peuvent représenter une source de transmission virale au receveur, et qui ne sont pas acceptés par les autorités réglementaires pour la production de cellules administrées à l'Homme. L'équipe de Micklethwaite a produit des CTL anti-CMV en stimulant les PBMC du donneur avec des DC du donneur chargées avec un peptide synthétique immunodominant NLVPMVATV dérivé de la protéine pp65 et présenté par la molécule HLA-A2 aux lymphocytes T CD8⁺ (Micklethwaite *et al.*, 2007). Ces CTL anti-CMV ont été transférés en prophylaxie à des receveurs adultes ou pédiatriques d'allogreffes de CSH après conditionnement non myéloablatif sans aucune déplétion T *in vivo* ou *in vitro*. Chez 6 patients sur 9 une augmentation modérée post-injection de la fréquence des cellules T CD8⁺ spécifiques a été observée, mais celles-ci ont disparu après quelques jours voire quelques semaines, probablement du fait de l'absence de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques. Les autres patients ont réactivé le CMV. Une GvHda a été observée chez 3 patients dans les 14 jours qui ont suivi l'injection des CTL anti-CMV, conduisant au décès d'un des patients. Dans cette étude, tous les patients avaient développé une GvHD avant l'injection des CTL anti-CMV et l'incidence de la GvHD a coïncidé avec une diminution des doses de corticoïdes, mais la possibilité que les cellules T puissent avoir causé ou renforcé la GvHD ne peut être éliminée.

Malgré l'avantage de proposer une production de CTL anti-CMV de grade clinique, ce protocole présente plusieurs limites : le fait que la stimulation ne soit faite que par un seul peptide présenté par une molécule HLA donnée (HLA-A2) restreint cette thérapeutique aux patients présentant ce typage HLA et limite le nombre de clones de lymphocytes T présents dans les CTL à une seule spécificité, contrairement à ce que l'on peut observer lorsque l'antigène de stimulation est un ensemble de peptides issus d'une protéine immunodominante. Enfin, l'absence de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques, indispensables au maintien de la réponse immunitaire dans le temps chez les patients est une limite importante.

C'est pourquoi la même équipe a ensuite produit des CTL polyclonaux anti-CMV en utilisant comme cellules présentatrices d'antigène des cellules dendritiques transduites avec un vecteur adénoviral codant pour la protéine pp65 du CMV (Micklethwaite *et al.*, 2008). Les résultats préliminaires ont été publiés : une seule dose de $2 \times 10^7/\text{m}^2$ CTL anti-CMV a été administrée en prophylaxie, 28 jours après allogreffe de CSH chez 12 patients adultes. Seuls 4 patients ont présenté une réactivation CMV mais avec des charges virales CMV faibles, ne nécessitant pas la mise en place d'un traitement antiviral pour 2 d'entre eux. De plus, le taux de survenue d'une GvHD suite à l'injection des CTL n'était

pas augmenté par rapport à celui attendu classiquement dans ce type d'allogreffe. La présence d'une immunité anti-CMV suite à une expansion *in vivo* des CTL injectés a été objectivée chez les 12 patients et a été durable dans le temps pour 8 d'entre eux.

Récemment, cette équipe a publié les résultats complets d'une étude de phase II non randomisée ayant pour but d'évaluer l'efficacité de l'injection en prophylaxie d'une dose de $2 \times 10^7/\text{m}^2$ CTL anti-CMV produits selon les deux méthodes précédentes chez 50 patients après J28 post allogreffe de CSH (Blyth *et al.*, 2013). Vingt-six patients ont présenté une réactivation du CMV dont 5 après l'injection des CTL anti-CMV et 9 ont nécessité la mise en place d'un traitement par Ganciclovir ou Foscarnet. Comparé au groupe contrôle, les auteurs rapportent une diminution significative du recours aux traitements anti-viraux (17% vs 36%, $P=0,01$) et du temps de traitement anti-viral (3,4 jours vs 8,9 jours, $p=0,03$). Aucune augmentation de l'incidence de la GvHDa ou GvHDc n'a été observée par rapport au groupe contrôle. Les auteurs concluent que les CTL anti-CMV injectées s'expandent *in vivo* en présence du virus, limitent la réplication virale et préviennent les réactivations tardives.

Enfin, tout récemment, l'équipe de Lucas a rapporté un essai clinique portant sur 7 patients présentant une infection à CMV résistante au traitement antiviral après plus de deux semaines. Des CTL anti-CMV ont été produits par culture en utilisant un mode de stimulation avec des pools de peptides synthétiques de 15 acides aminés se chevauchant tous les 11 acides aminés et recouvrant la totalité de la protéine pp65 et de la protéine IE-1, deux protéines immunodominantes du CMV. Les CTL ainsi obtenus ont été administrés à une dose comprise entre 2,5 et $5 \times 10^5/\text{kg}$. Parmi les 7 patients, 5 ont présenté une activité cytotoxique anti-CMV dans les 4 à 6 semaines suivant l'injection. Chez les deux autres patients pour lesquels aucune immunité spécifique n'a été observée, les auteurs rapportent que pour l'un la viabilité des CTL injectés était très faible et que l'autre était encore sous traitement immunosuppresseur (ciclosporine A et corticoïdes) lors de l'injection (Bao *et al.*, 2012). Dans cette étude, le fait de disposer de CTL anti-IE1 permet d'élargir la spécificité antigénique des CTL anti-CMV compte tenu que seuls 70 à 90% des CTL reconnaissent les épitopes de la protéine pp65 et que les cellules T anti-IE-1 sont importantes pour conférer une immunité protectrice contre le CMV. Il semble de plus que les réponses immunitaires anti-IE1 sont plus fortes et soutenues dans le temps.

3.1.4 Les CTL dirigés contre plusieurs virus

Plusieurs équipes se sont tournées vers la production de CTL qui pouvaient être bi- ou multifonctionnelles c'est-à-dire dirigées contre 2 ou plusieurs virus couramment rencontrés après allogreffe de CSH. Les différentes combinaisons envisagées ont été ADV/EBV puis CMV/EBV puis ADV/CMV/EBV.

3.1.4.1 Les CTL anti-ADV/EBV

A partir du 2001, des études sur la production de CTL bispécifiques anti-ADV et EBV ont été initiées. Regn S *et al* a infecté des LCL avec un vecteur adénoviral afin d'obtenir un antigène de stimulation, dans le cadre d'une étude pré-clinique (Regn *et al.*, 2001). Après plusieurs restimulations de PBMC de donneurs, les auteurs ont obtenu des CTL douées de cytotoxicité à la fois contre des cibles infectées par l'EBV ($48 \pm 7,4\%$ au rapport 40/1) et des cibles infectées par l'ADV ($39 \pm 5,2\%$ au rapport 40/1). Puis, en 2009, Leen *et al* ont produit des CTL bispécifiques anti-ADV et EBV dans le cadre d'une étude clinique (Leen *et al.*, 2009). Les PBMC du donneur ont été stimulées par des LCL transfectées par un vecteur Ad5f35^{null} de l'ADV toutes les semaines pendant environ 4 semaines. A partir de J₁₄, de l'IL-2 a été ajoutée 2 fois par semaine pour permettre l'expansion des CTL. Treize enfants ayant reçu une allogreffe de CSH haploidentique ont bénéficié en prophylactique d'une injection de CTL bi-spécifiques (5×10^6 à $1,35 \times 10^8/m^2$). Pour 12 d'entre eux, les auteurs rapportent une expansion des CTL *in vivo* et une augmentation de l'activité anti-virale. Une augmentation du nombre de CTL anti-EBV *in vivo* a été détectée chez 10 patients dans les deux semaines suivant l'injection de CTLs. En revanche, ce phénomène n'a été rapporté avec les CTL anti-ADV que chez 2 patients présentant une infection ou une maladie à ADV. Aucun patient traité avec les CTL bi-spécifiques n'a cependant développé d'infection à ADV *de novo*.

3.1.4.2 Les CTL anti-EBV/CMV

L'équipe de Lukas est la première à avoir développé des CTL bispécifiques anti-EBV et -CMV (Sun *et al.*, 1999). Les CMN provenant de 4 donneurs de sérologie CMV+ et de 2 donneurs de sérologie CMV- ont été stimulées avec les LCL transduites par un rétrovirus recombinant codant pour pp65, protéine immunodominante du CMV. Les CTL ont été restimulées toutes les semaines avec l'antigène de stimulation puis de l'IL-2 a été ajoutée. Une lyse spécifique vis-à-vis des LCL a été observée avec les 6 CTL alors que seules les 4 CTL produits à partir de donneurs CMV+ ont présenté une lyse spécifique vis-à-vis des cibles CMV+. Cette équipe a mis en place un protocole clinique de Phase I/II pour le traitement prophylactique des infections à EBV et CMV (Lukas *et al.*, 2000). Malheureusement, les résultats de ce protocole clinique n'ont pas été publiés. De même, Moosman *et al.*, sont parvenus à produire des CTL bispécifiques lorsque les donneurs étaient de sérologie CMV+ et EBV+ (Moosmann *et al.*, 2002).

3.1.4.3 Les CTL dirigés contre trois virus ou plus : CTL multipathogènes

Leen *et al.*, ont produit des lignées de CTL tri-virus contenant des CTL spécifiques polyclonaux contre l'EBV, le CMV et l'ADV (Leen *et al.*, 2006). Sur le même modèle que les CTL bispécifiques présentés précédemment, les lignées de CTL ont été produites en modifiant génétiquement les monocytes et les LCL transformées par l'EBV (LCL-EBV) avec un vecteur adénoviral chimérique

Ad5f35 exprimant le transgène CMV-pp65 :Ad5f35pp65. En utilisant ce protocole, l'équipe de Leen a activé et amplifié les lignées de CTL avec des spécificités appropriées. Avec cette méthode, les auteurs ont injecté les CTL anti-EBV, -CMV, -ADV chez 11 patients (Leen *et al.*, 2006). Chaque patient a reçu en médiane 5×10^7 cellules/m² à J₆₂ post-greffe. Aucun patient n'a développé de GvHD et aucune toxicité n'a été déplorée. La réponse immunitaire spécifique du CMV a pu être évaluée pour 10 patients; une augmentation de la réponse T IFN- γ anti-CMV a été observée chez 7 d'entre eux dans les 2 semaines qui ont suivi l'infection, ce qui a été confirmé pour 4 patients avec la technique des Tétramères. *In vivo*, 3 patients ont eu une augmentation de la charge virale CMV dans les 2 à 7 semaines suivant l'injection des CTL. Aucun traitement médicamenteux n'a été nécessaire, la charge virale étant ensuite devenue négative en une semaine. La réponse immunitaire spécifique de l'EBV a pu être évaluée chez 11 patients. Une augmentation médiane d'un facteur 6 de la réponse IFN- γ a été observée en Elispot vis-à-vis de l'EBV dans les 2 semaines suivant l'injection pour 10 patients. *In vivo*, 3 patients ayant présenté une réactivation EBV, dont 1 avec manifestations cliniques d'un PTLD, 4 à 9 semaines après l'injection des CTL, ont spontanément résolu l'infection et les signes cliniques ont disparu, en même temps que se développaient chez les patients des cellules T spécifiques de l'EBV. Enfin, parmi les 11 patients, 5 présentaient des cultures à ADV positives dans le sang, les selles et le nasopharynx. Les 6 autres n'étaient pas infectés par le virus. Pour les 5 patients infectés, les auteurs ont mis en évidence une expansion des CTL anti-ADV associée à une diminution de la charge virale. Ils rapportent également une amélioration clinique d'un patient qui présentait une pneumopathie. Quant aux 6 autres patients non infectés, les auteurs n'ont pas mis en évidence d'expansion des CTL anti-ADV et ne rapportent aucune infection à ADV pendant la durée du suivi. Les auteurs concluent que ces CTL multivirus sont dépourvus d'effet délétère et sont parfaitement fonctionnels *in vivo*. L'expansion observée *in vivo* des lymphocytes T spécifiques de l'EBV, du CMV ou de l'ADV, en l'absence d'un changement significatif du nombre de lymphocytes T global est en faveur d'une contribution réelle des CTL injectés dans le développement de la réponse immunitaire (Tableau IX). La même équipe, ayant constaté la réactivation CMV chez 3 patients, a souhaité accroître le contrôle des infections CMV en développant, selon un protocole similaire, des CTL tri-virus en insérant également dans le vecteur adénoviral le gène codant pour la protéine IE-1 du CMV (Hanley *et al.*, 2011). Une étude clinique a été initiée.

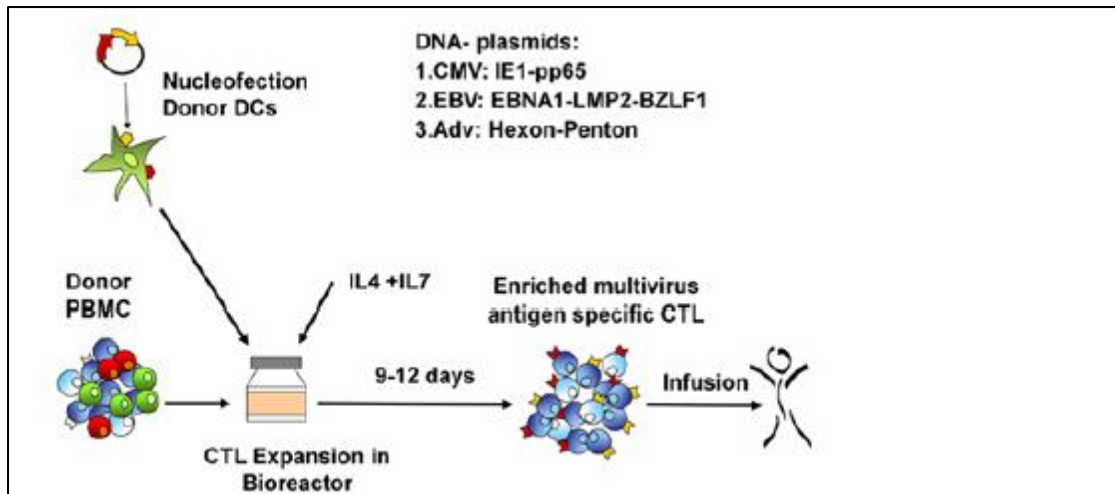


Figure 8. Procédure de génération de CTLs multivirus (Gerdemann *et al.*, 2011).

La même équipe a rapporté la possibilité de produire des CTL dirigés contre 4 virus (EBV, CMV, ADV, BK) en introduisant dans des cellules dendritiques par nucléofection un plasmide codant pour des antigènes immunodominants de chacun de ces virus (Gerdemann *et al.*, 2009). Après 10 jours, les auteurs montrent qu'ils obtiennent des CTL multivirus dénués d'alloréactivité. En combinant cette stratégie de présentation antigénique et le système de sélection magnétique basé sur la sécrétion d'IFN- γ , les auteurs rapportent qu'il est possible d'obtenir des CTL en un délai court pour les urgences thérapeutiques. Cette technique de production a été améliorée en 2011 avec une culture cellulaire dans une bioréacteur en présence de cytokine IL-4 et IL-7 (Figure 8) (Gerdemann *et al.*, 2011). Les CTL multivirus produits par cette technique ont été administrés à des patients dans le cadre d'un essai clinique pour une réactivation CMV.

Tableau IX. Essais cliniques utilisant des CTL Bi-virus ou Multivirus, après allogreffe de CSH.

CTL	Protocole d'expansion	Cellules injectées	Patients traités	Résultats cliniques	Références
Bi-virus (ADV, EBV)	<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	12 patients avec un traitement prophylactique pour une infection à ADV et 1 patient a reçu une dose de CTL en compassionnel	10/12 n'ont pas réactivé l'EBV 3/12 : diminution de la charge virale EBV concomitante à l'apparition de CTL anti-EBV 2/12 : réactivation de l'ADV et diminution de la charge virale concomitante à l'injection de CTL anti-ADV	Leen <i>et al.</i> , 2009
Multivirus (CMV, EBV, ADV)	<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	11 patients (Injection prophylactique pour 10 ; 1 traité pour une infection à ADV)	3/3 ont contrôlé la réactivation du CMV sans antiviraux ; 3/3 : disparition de l'infection à EBV sans antiviraux ; 5 patients avec infection et 1 avec maladie : disparition de la charge virale ADV post-CTL	Leen <i>et al.</i> , 2006
Multivirus (CMV, EBV, ADV)	<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	10 patients : 6 patients ayant une mono-infection (3 patients avec CMV ; 1 patient avec ADV et 2 patients avec EBV) ; 4 patients ayant une double infection (2 patients avec ADV/EBV ; 2 patients avec CMV/ADV)	4/10 patients sans traitements antiviraux ; 7/10 patient en rémission complète ; 1 patient avec infection ADV présentait une évolution de l'infection ; 1 patient avec infection CMV présentait une persistance de virémie sans symptôme ; 1 patient avec infection EBV présentait une charge virale fluctuante.	Gerdemann <i>et al.</i> , 2013
Multivirus (EBV, CMV, Adv, BK, HHV6)	<i>Culture in vitro</i>	CTL polyclonaux	11 patients: 3 patients en prophylaxie, 7 patients ayant mono-infection ou double infections, 1 patient avec trois infections	Les 3 patients en prophylaxie n'ont pas eu d'infection ou de réactivation virale; pour les 8 patients ayant reçu des injections curatives, une réponse complète a été observée à l'exception d'un patient..	Papadopoulou <i>et al.</i> , 2014

ADV, Adénovirus ; EBV, Epstein Barr virus ; CMV, Cytomégalo virus; CTL, Cytotoxique T Lymphocytes; IFN γ , Interferon gamma; GvHD, Graft versus Host Disease;

(n=3), une réactivation EBV (n=2), une réactivation ADV (n=1) ou une double réactivation EBV-ADV (n= 2) ou CMV-ADV (n= 2) (Gerdemann *et al.*, 2013). Dans 80% des cas, les patients ont présenté une expansion des CTL *in vivo* et une diminution voire négativation de la ou des charges virales correspondantes. Deux patients n'ont pas répondu aux CTL, l'un pour une charge virale EBV très élevée au moment de l'injection et l'autre pour une colite à CMV persistante en dépit de CTL anti-CMV (-pp65 et -IE1) circulantes. Seul un patient sur les 10 a présenté une GVHD cutanée de grade II après l'injection des CTL. Les mêmes auteurs ont montré en 2012 qu'il était possible d'obtenir en 10 jours des CTL dirigés contre 7 virus différents (EBV, CMV, ADV, BK, HHV6, RSV, Influenza) en utilisant un mélange de peptides issus des protéines immunodominantes de ces virus et en cultivant ces CTL en présence d'IL-4 et d'IL-7 (Gerdemann *et al.*, 2012). Tout récemment, les auteurs ont rapporté leur expérience clinique avec ce procédé de production en utilisant des mélanges de peptides issus des protéines immunodominantes des virus EBV, CMV, ADV, BK et HHV6 (Papadopoulou *et al.*, 2014). Onze patients ont reçu ces CTL, en situation génoidentique, non apparentée ou haploidentique. Huit ont reçu des CTL pour traiter une (n=4), 2 (n=3) ou 3 (n=1)

infections actives et 3 en prophylaxie. Les 8 patients qui ont présenté au total 18 infections ou réactivations avec les 5 virus ont été traités avec succès par les CTL multivirus avec un taux de réponse de 94% (15 réponses complètes et 2 réponses partielles vis-à-vis du CMV et du BKV chez des patients présentant d'autres réactivations virales). Un patient avec infection à BKV n'a pas répondu aux CTL injectés initialement pour une réactivation HHV6, traitée avec succès. Comme précédemment, la négativation de la charge virale a été associée à une expansion des CTL correspondant *in vivo*. Aucune GvHD n'a été observée. Les patients ayant reçu les CTL en prophylaxie n'ont développé aucune infection virale.

3.1.5 Les Effets secondaires survenant après l'injection de CTL anti-infectieux

L'équipe de M Brenner a récemment fait le bilan des effets secondaires observés après injection de CTL anti-infectieuses au cours de 10 années d'expérience (Cruz *et al.*, 2010). Les auteurs ont identifié un taux d'événements indésirables de 17,3%, dont aucun grave. Les événements indésirables étaient dans leur grande majorité attribuables au cryoprotecteur (le DMSO) ou à la diphenhydramine administrée en pré-médication, et non aux CTL eux-mêmes. Les auteurs concluent qu'une surveillance du patient d'une heure après l'injection des CTL est suffisante.

De plus, le risque de GvHD reste redouté, bien que survenant rarement après injection de CTL et que la relation avec l'injection des CTL ne soit pas évidente. A cette fin, Melenhorst *et al.*, a étudié 73 patients ayant reçu des CTL en situation partiellement compatible parmi les 153 traités par l'équipe d'Heslop (Melenhorst *et al.*, 2010). Aucune GvHD *de novo* n'a été rapportée chez ces patients et le taux de réactivation de GvHD était très faible (6,5%) que les patients aient reçu des CTL compatibles ou partiellement compatibles. *In vitro*, les auteurs ont mis en évidence une réactivité croisée des CTL avec des cibles HLA non compatibles. Pour les auteurs, ces données montrent malgré la reconnaissance *in vitro* des molécules HLA, l'absence de réaction *in vivo* du fait de l'absence de GvHD *de novo*.

3.1.6 Les Limites de la production de CTL anti-viraux par culture cellulaire

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

Le temps de production entre 4 et 6 semaines (voire plus pour la production de la lignée EBV) nécessite d'anticiper la production pour tous les patients avant ou au moment de la greffe, sans savoir si le patient réactivera les virus concernés. Cela représente une charge de travail considérable, peu compatible avec les structures de thérapie cellulaire actuellement en place, plus particulièrement en France. Les derniers travaux publiés sur l'obtention de CTL par culture cellulaire préconisent des modalités de stimulation antigénique avec des pools de peptides et une expansion avec IL-4 et IL-7

permettant de réduire le temps de production à 10 jours (Gerdesmann *et al.*, 2012). Un autre moyen de contourner l'impact du temps de production sur la mise en œuvre du traitement des patients est le développement de banques de CTL anti-EBV allogéniques mettant à disposition de tout patient des CTL préparés à partir de cellules de donneurs volontaires sains, cryoconservés et sélectionnés pour chaque patient sur la base d'une compatibilité HLA minimale et la validation par une cytotoxicité *in vitro* de l'efficacité des CTL vis-à-vis de la lignée EBV du donneur de CSH (Haque *et al.*, 2002 et 2007). L'équipe de T Haque a mené un essai de phase II multicentrique portant sur 33 patients ayant reçu une transplantation d'organe (n = 31) ou de CSH (n = 2) atteints d'EBV-PTLD résistant aux traitements conventionnels (réduction de l'immunosuppression, administration de Rituximab ou mise en œuvre d'une chimiothérapie). Aucun effet secondaire n'a été noté (aucune GvHD secondaire à l'injection des CTL n'a été décrite) et un taux de réponse (complète et partielle) de 64% à 5 semaines et de 52% à 6 mois post-injection a pu être observé. Les lignées de CTL ont été choisies pour leur compatibilité HLA et sélectionnées pour leur forte cytotoxicité contre les LCL-EBV du donneur et leur faible cytotoxicité contre des cellules du receveur ne présentant pas l'EBV. La charge virale EBV a diminué au-dessous d'un seuil de détection pour tous les patients qui ont répondu au traitement. Cette étude a révélé de manière significative que les meilleures réponses cliniques étaient observées avec des CTL contenant une forte proportion de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques et lorsque l'incompatibilité HLA était la plus faible avec le receveur. Cette équipe anglaise a depuis constitué une banque de CTL anti-EBV complètement de grade clinique conforme à la législation européenne sur les médicaments de thérapie innovante. Ils ont récemment rapporté les premières expériences cliniques avec cette banque (Vickers *et al.*, 2014). Au moment de la publication du papier, 11 patients avaient reçu des CTL de Banque, dont 9 pour PTLD après greffe de CSH ou d'organe. Parmi ces 9 patients, 7 ont été mis en rémission complète par l'injection de CTL anti-EBV de Banque et 2 ont progressé puis sont décédés. Pour ces 2 patients, les CTL ne partageaient aucun antigène HLA de classe II avec les patients. Les deux autres patients présentaient des sarcomes non hématopoïétiques EBV induits et malgré une efficacité transitoire, les CTL n'ont pas permis de mettre les patients en rémission qui sont finalement décédés. A l'exception d'une GvHD cutanée survenue deux jours après l'injection des CTL, aucune réaction de GvHD n'a été observée.

L'équipe française d'H Vié a développé une banque de CTL anti-EBV et a récemment rapporté les résultats d'un essai clinique de phase I où 11 patients avec un PTLD résistant aux traitements conventionnels ont reçu 1 à 3 doses de 5×10^6 CTL anti-EBV avec 1 à 3 incompatibilités HLA de classe I et jusqu'à 4 incompatibilités HLA de classe II. Aucune toxicité immédiate (à l'exception d'une fièvre) ou tardive telle que de la GvHD n'a été observée. En terme d'efficacité, 3 rémissions complètes et une rémission partielle de l'EBV-PTLD ont été observées (Gallot *et al.*, 2014). Enfin,

l'équipe de Leen a initié la première banque de CTL tri-virus : anti-EBV, -CMV et -ADV (Leen *et al.*, 2013). Sur les 32 lignées produites pour la banque, 18 lignées ont été injectées chez 50 patients présentant après allogreffe de CSH une infection à l'un des ces virus, résistante aux traitements conventionnels. Le taux de réponse complète ou partielle cumulatif à 6 semaines après l'injection pour les 50 patients est de 74%. Quatre patients répondeurs initialement ont eu une rechute ou une progression. Aucun effet indésirable n'a été rapporté et une GVHD *de novo* a été déplorée chez 2 patients. Le degré de compatibilité HLA entre les CTL et le patient était de 1/6 à 4/6 antigènes HLA. Les auteurs constatent qu'une même lignée a pu être efficace chez certains patients mais pas chez d'autres, sans explication évidente.

Un autre moyen de contourner le temps de production long serait de disposer de techniques rapides qui pourraient être mises en œuvre dans une stratégie de traitement pré-emptif dès que l'on a connaissance de l'augmentation de la charge virale.

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

La compétition antigénique, lors de la production des CTL tri-virus. On observe que les lymphocytes T produits réagissent majoritairement vis-à-vis du CMV et de façon plus faible vis-à-vis de l'EBV et de l'ADV. Cela est probablement dû à une présentation antigénique des épitopes CMV ou EBV par les molécules HLA des cellules présentatrices d'antigène de plus haute affinité ou plus stable que celle des épitopes ADV ayant pour conséquence un nombre élevé de lymphocytes T circulants spécifiques du CMV comparé au faible nombre de lymphocytes T spécifiques de l'ADV circulants (1 Log de moins en moyenne) (Kedl *et al.*, 2000). Afin de s'affranchir de la compétition antigénique apportée par le CMV, Leen *et al* ont proposé la production de CTL bi-virus (EBV et ADV) (Leen *et al.*, 2009) (cf paragraphe 3-1-4-1). Cependant, l'approche avec les pools de peptides semble permettre de contourner ce problème de compétition antigénique puisque nous avons rapporté précédemment des expériences fructueuses de CTL multivirus obtenus grâce à l'utilisation de pools de peptides.

Enfin, le **coût de production** est assez important mais est à mettre en balance avec le coût élevé des molécules innovantes telles que le Rituximab.

3.2 Production des CTL par techniques immunomagnétiques

La sélection immunomagnétique des CTL est réalisée grâce à des colonnes positionnées dans un champ magnétique (système CliniMACS de Miltenyi Biotec), en utilisant des billes magnétiques couplées à des anticorps dont les cibles peuvent être soit :

- des molécules HLA associées entre elles sous forme de multimères et chargées avec un peptide antigénique. Les lymphocytes T spécifiques de ces couples peptides-HLA sont ainsi sélectionnés.
 - les lymphocytes T spécifiques qui sécrètent de l'IFN- γ après un temps défini de stimulation par l'antigène viral.
 - les lymphocytes T spécifiques qui expriment après stimulation par l'antigène viral une molécule de co-stimulation (par exemple CD137), ou un marqueur d'activation (par exemple CD154) (Figure 9).
- Le très faible nombre de cellules obtenu est réinjecté au receveur immédiatement après isolement. L'expansion de ces cellules *in vivo* est générée par la stimulation liée à la charge virale.

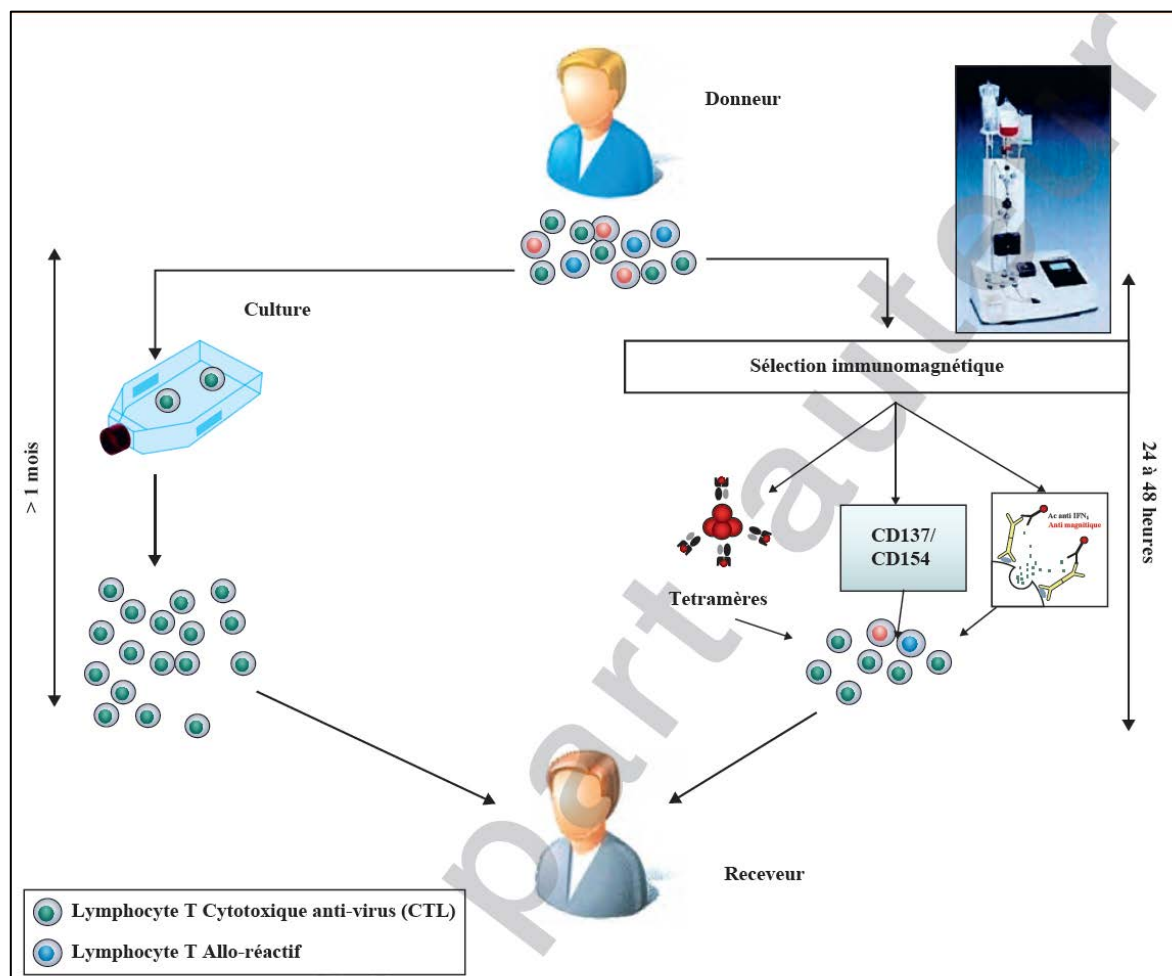


Figure 9. Méthodes d'isolement des lymphocytes T antiviraux.

3.2.1 Production des CTL par le biais des multimères

CTL anti-CMV

L'utilisation de tétramères de molécules HLA a été rapportée en 2005 pour la production de CTL CD8⁺ anti-peptide-CMV (Cobbald *et al.*, 2005). Une faible quantité de cellules sélectionnées ($8,6 \times$

10³/kg en médiane) a été injectée à neuf patients ayant réactivé le CMV, dans les 4 heures suivant la sélection et, les CTL CD8⁺ anti-CMV ont été détectés chez tous les patients 10 jours après l'injection. Une activité antivirale *in vivo* a été identifiée puisque la charge virale CMV s'est négativée chez 8 patients même chez ceux qui avaient présenté une réactivation CMV résistante aux médicaments antiviraux et a diminué chez 1 patient.

En 2011, Schmitt A *et al* ont rapporté leur expérience en traitant 2 patients par injection de lymphocytes T CD8 anti-CMV isolés à l'aide de streptamères (CMVpp65/HLA-B7 et CMVpp65/HLA-A24, respectivement pour les 2 patients). Les patients 1 et 2 ont reçu respectivement 2,2x10⁵ et 0,37x10⁵CD8 spécifiques/kg. La virémie à CMV a été contrôlée dans les 2 cas de façon concomitante à une expansion des lymphocytes T CD8 spécifiques du CMV *in vivo* (Schmitt *et al.*, 2011).

CTL anti-EBV

Uhlin M *et al.* ont rapporté le cas d'une femme de 18 ans ayant une virémie EBV et un PTLN et traitée par des CTL anti-EBV produites à partir de sa mère haplo-identique à J₈₃ post-greffe de sang placentaire pour une LAM. Les CD8 anti-EBV ont été sélectionnés par le biais de pentamères HLA-A2 puis par billes magnétiques. Une première dose de 1,1x10⁴ CTL/kg d'une pureté >60% est injectée à la patiente ; après 36 heures, les CD8 spécifiques atteignent 4% des LT CD8 totaux dans le sang circulant. A J₁₈₉, le PTLN est résolu. Cependant, 12 mois après l'injection des CTL, la patiente a présenté les symptômes d'infection EBV et une deuxième dose de 2x10⁴ CTL/kg CTL a été préparée de façon identique à partir d'un prélèvement de lymphocytes de la mère. Après deux semaines, la charge virale EBV s'est négativée (Uhlin *et al.*, 2010).

La même équipe a rapporté en 2012 le traitement, par CTL sélectionnés par technique immunomagnétique par le biais de multimères, de 8 patients présentant des infections virales à CMV (n=6), à EBV (n=1) et à ADV (n=1) (Uhlin *et al.*, 2012). Le patient EBV⁺ est le même que celui décrit précédemment. Si une négativation de la charge virale a été observée chez 6/7 patients CMV⁺ et 1 patient EBV⁺ accompagnée dans la plupart des cas d'une expansion des CTL *in vivo*, aucune efficacité n'a été observée pour le patient ADV⁺, même si les CTL ont été détectées *in vivo* de façon transitoire à J3 de l'injection.

Tableau X. Résultats d'essais cliniques utilisant des CTL antiviraux produits par technique immunomagnétique par le biais de multimères.

Virus	Patients	Dose CTL/Kg	Evolution clinique	Référence
CMV	9 patients avec virémie CMV ou post-réactivation	dose médiane : $8,6 \times 10^3$ /kg	8/9 : charge virale CMV devenue non détectable ; 1/9 : diminution de la charge virale	Cobbald <i>et al.</i> , 2005
CMV	2 patients	1er: $2,2 \times 10^5$ /kg et 2ème: $0,37 \times 10^5$ /kg	1/2: contrôle de l'infection virale; 1/2: élimination du virus	Schmitt <i>et al.</i> , 2011
CMV	6 patients	$0,8-24,6 \times 10^4$ /kg	4/6 patients: négativation de la charge virale et présence des CTL-CMV <i>in vivo</i> ; 1/6 patient a présenté une diminution transitoire de la charge virale; 1/6 patient : pas de réponse	Uhlin <i>et al.</i> , 2012
EBV	une patiente avec virémie EBV et PTLN	deux injections (1ère: $1,1 \times 10^4$ /kg et 2ème: 2×10^4 /kg)	Négativation de la charge virale EBV	Uhlin <i>et al.</i> , 2010 Uhlin <i>et al.</i> , 2012
ADV	un patient avec infection ADV	deux injections (1ère: $3,1 \times 10^4$ /kg et 2ème: $1,7 \times 10^4$ /kg)	Détection transitoire des CTL-ADV. Evolution défavorable de la charge virale	Uhlin <i>et al.</i> , 2012

3.2.2 Production des CTL sur la base de la sécrétion d'IFN- γ

À partir de 2004, deux équipes ont décrit un protocole qui permet de sélectionner par technique immunomagnétique, les CTL anti-ADV et les CTL anti-CMV sur le CliniMACS (Miltenyi Biotec) sur la base de leur sécrétion d'IFN- γ après stimulation antigénique *ex vivo*, afin d'isoler les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ anti-virus respectivement (Feuchtinger *et al.*, 2004; Rauser *et al.*, 2004). Cette technique a ensuite été appliquée pour produire des CTL-ADV, des CTL-CMV, des CTL-EBV et plus récemment des CTL-multipathogènes.

CTL anti-ADV

L'équipe de Feuchtinger a publié une étude qui consistait à injecter des lymphocytes T spécifiques anti-ADV (entre $1,2-50 \times 10^3$ CD3IFN- γ /kg) à 9 patients après allogreffe de CSH (Feuchtinger *et al.*, 2006). Les 9 patients traités présentaient une infection systémique à adénovirus en échec de traitement conventionnel, sans immunité cellulaire spécifique anti-adénovirus détectée. Les auteurs ont montré la faisabilité de l'essai et ont rapporté la bonne tolérance de l'immunothérapie. Seul un patient qui présentait avant l'injection des CTL anti-ADV une GvHD chronique cutanée a montré une aggravation de la GvHD, résolutive sous corticoïdes. Pour 5 des 6 patients évaluable, l'immunothérapie adoptive a été associée à une diminution ou disparition de la charge virale et à une expansion des LT spécifiques après injection. Chez 3 patients, les auteurs ont montré une persistance des LT spécifiques au-delà de 4 à 6 mois associée à l'absence de détection de la charge virale. Chez

3 autres patients, l'absence de persistance des LT spécifiques a été associée à un maintien ou à une augmentation de la charge virale ADV conduisant au décès de 2 patients pour adénovirose systémique, le troisième ayant rechuté de son lymphome malin non Hodgkinien.

Les échecs du traitement ont été attribués à l'état clinique sévère des patients et le stade invasif de l'adénovirose. Sur cette expérience, les auteurs ont conclu qu'il était préférable de traiter les patients à haut risque de développer une adénovirose maladie à titre pré-emptif avant l'apparition de tout symptôme clinique.

Récemment une autre étude rapporte l'injection chez 5 patients de CTL anti-ADV sélectionnés par technique immunomagnétique (Quasim *et al.*, 2013). Trois ont présenté une disparition de la charge virale. Les deux autres patients sont décédés, l'un à la suite d'une cytopénie sans qu'un lien ne soit établi entre l'injection de CTL et une potentiel myélotoxicité, l'autre d'une pneumopathie à ADV. L'échec de l'immunothérapie chez ce patient a été attribué à la pathologie d'origine du patient : un déficit en molécules HLA de classe II, qui a pu entraîner une altération de la présentation antigénique des antigènes viraux.

Récemment, Di nardo *et al.*, a rapporté une expérience de traitement par CTL anti-ADV d'une insuffisance respiratoire secondaire à une infection ADV résistante au cidofovir chez un jeune patient allogreffé pour une thrombocytopénie amégacaryotique congénitale. Ces CTL ont été sélectionnées par la technique immunomagnétique basée sur la sécrétion d'IFN- γ après stimulation de la leukaphérèse de la mère avec le pool de peptides Peptivator ADV5 Hexon de Miltenyi Biotec. Une négativation de la charge virale ainsi qu'une reconstitution immunitaire ont été objectivées dans les 4 semaines suivant l'injection. Sur le plan clinique, une récupération progressive de la fonction respiratoire a été observée (Di nardo *et al.*, 2013).

Depuis 2007, notre équipe s'est appliquée à développer, une technique rapide de production de grade clinique de CTL anti-ADV (Aïssi-Rothé *et al.*, 2010). Un pool de peptides synthétiques de 15 acides aminés se chevauchant tous les 11 acides aminés et recouvrant l'intégralité de la protéine Hexon de l'ADV 5, le Pepivator-ADV5 Hexon (Miltenyi Biotec) a été comparé à la protéine Hexon de l'ADV2 produite sur lignée cancéreuse utilisée par l'équipe de Feuchtinger (Feuchtinger *et al.*, 2006). Nous avons montré, qu'outre le fait que le Pepivator-ADV5 Hexon présente l'avantage d'être synthétique et de grade clinique, ses capacités de stimulation ne sont que très faiblement inférieures à celles de la protéine Hexon de l'ADV2 et que selon les donneurs, elles sont même supérieures. Les cellules mononucléées (CMN) de 7 donneurs sains différents, dont l'immunité cellulaire anti-ADV avait été confirmée au préalable, ont été stimulées pendant 6 heures avec le PepTivator-ADV5 Hexon. Les cellules sécrétant de l'IFN- γ ont été isolées sur le CliniMACS à l'aide du Cytokine Capture System

(Miltenyi Biotec). Après sélection, un nombre moyen de cellules nucléées totales (CNT) de $1,01 \pm 0,84 \times 10^6$ a été obtenu. Une majorité des cellules T spécifiques de l'ADV étaient CD4⁺ (moyenne = $56\% \pm 5,59\%$, rendement = $51\% \pm 32,43\%$) et dans une moindre mesure CD8⁺ (moyenne = $42\% \pm 27\%$, rendement = $56\% \pm 39,3\%$).

Une expansion des LT isolés (CTL) a été réalisée *in vitro* en présence d'IL-2 et de cellules nourricières autologues afin de disposer de suffisamment de cellules pour réaliser les contrôles qualité fonctionnels. A l'issue de l'expansion, la capacité des CTL amplifiés à sécréter de l'IFN- γ et à proliférer après re-stimulation par l'antigène de stimulation a été confirmée. Une cytotoxicité élevée, à un rapport de 10:1, vis-à-vis des cellules cibles autologues chargées avec un lysat d'ADV2 ou d'ADV5 ou avec le PepTivator-ADV5 Hexon a été mise en évidence alors qu'une cytotoxicité négligeable a été observée vis-à-vis des cellules cibles non chargées ou chargées avec un peptide non relevant (PepTivator-CMV pp65). Enfin, nous nous sommes assurés d'une faible toxicité de ces CTL, c'est-à-dire de leur faible alloréactivité résiduelle : une diminution de 1,27 Log de l'alloréactivité des CTL vis-à-vis de CMN de donneurs sains HLA différents a été observée, comparée à celle des CMN avant sélection. Ce développement a donné lieu à un protocole clinique national actuellement ouvert et ayant inclus 11 patients.

CTL anti-CMV

Une expérience similaire a été menée par Mackinnon *et al.*, avec le CMV (Mackinnon *et al.*, 2007). Les auteurs mentionnent la production de CTL anti-CMV sélectionnés par méthode immunomagnétique sur la base de la sécrétion d'IFN- γ par les LT stimulés pendant 20 heures avec la protéine CMV-pp65. Les CTL anti-CMV ont été administrés à 7 patients, 5 après réactivation de la charge virale et 2 en prophylaxie. Une expansion des CTL anti-CMV a été observée chez tous les patients, qu'il y ait ou non une charge virale CMV détectable. Les 5 patients qui avaient réactivé le CMV ont reçu une thérapie médicamenteuse anti-virale concomitante, mais de courte durée pour 4 d'entre eux.

L'équipe de Peggs a rapporté son expérience de production de CTL anti-CMV par cette technique en utilisant comme antigène de stimulation la protéine CMV-pp65 ou le pool de peptides CMV-pp65 (Miltenyi Biotec) (Peggs *et al.*, 2011). La médiane de pureté des LT spécifiques anti-CMV est de 43,9% (1,4-81,8%) comprenant une majorité de T CD4⁺ (81%) ainsi que des T CD8⁺. Ces CTL-CMV ont été administrés à 18 patients. Onze patients ont eu une injection pré-emptive juste après la détection de la charge virale CMV et 7 une administration prophylactique. Aucune toxicité n'a été observée après l'injection, 5 patients ont eu une GVHD de grade I, 2 patients ont eu une GvHD de grade II et un patient a eu une GvHD de grade III. Parmi les 7 patients traités en prophylaxie, aucun

n'a nécessité de traitement anti-viral pendant les 6 mois suivants. Pour les 11 patients traités en préemptif, 2/11 patients ont été dispensés de traitement antiviral. *In vivo*, une expansion de CTL-CMV a été observée chez ces 11 patients (Peggs *et al.*, 2011).

L'équipe de Feuchtinger a, quant à elle, mené une étude sur 18 patients présentant une infection ou une maladie à CMV à qui ont été administrés des CTL anti-CMVpp65 à la dose de $2,13 \times 10^4$ CD3/kg, en moyenne (Feuchtinger *et al.*, 2010). Dans 83% des cas, il a observé une résolution complète de l'infection à CMV ou une diminution significative de la charge virale CMV, avec en parallèle une expansion *in vivo* des CTL anti-CMV (12 patients/16 évaluable). De plus, aucun effet secondaire ni aucune GvHD n'ont été déplorés.

CTL anti-EBV

L'équipe de Kolb a traité 6 patients présentant un EBV-PTLD avec des CTL anti-EBV produits par sélection immunomagnétique après stimulation des cellules avec un pool de peptides EBV (Moosmann *et al.*, 2010). Trois patients atteints d'un PTLD précoce ont présenté une réponse favorable après injection des CTL anti-EBV, avec négativation de la charge virale avec disparition des symptômes cliniques et résolution du PTLD pour deux d'entre eux avec en parallèle une expansion des LT spécifiques. Le 3^{ème} patient, ayant une pneumonie idiopathique, est décédé à J₉₆. Trois autres patients, à une phase tardive du PTLD au moment de l'immunothérapie, sont décédés. Aucun effet indésirable, ni aucune GvHD n'ont été rapportés. A nouveau, les auteurs suggèrent de traiter les patients présentant un haut risque de PTLD en prophylactique, sans attendre de développement clinique.

Récemment, Feuchtinger *et al.* ont également montré la faisabilité de la sélection *ex vivo* des CTL anti-EBV grâce à leur sécrétion d'IFN- γ et la bonne tolérance de l'immunité cellulaire adoptive anti-EBV en injectant un petit nombre de CTL sélectionnés après stimulation avec l'antigène EBNA1 du virus d'Epstein-Barr (Icheva *et al.*, 2012). Ils ont rapporté leurs résultats obtenus sur dix patients atteints d'un PTLD induit par l'EBV ou une infection à EBV après allogreffe de CSH. Ils ont observé une expansion des lymphocytes T spécifiques chez huit patients, en moyenne 16 jours après l'injection, et parallèlement la résolution du PTLD et la diminution de la charge virale chez sept de ces patients. De plus, les CTL anti-EBV après expansion *in vivo* ont pu être détectés 9 mois après l'immunothérapie adoptive. Aucune mortalité liée à l'EBV n'a été observée chez ces patients. Le PTLD a disparu chez 3 patients, et 4 sont décédés suite à d'autres complications infectieuses pour 3 d'entre eux ou suite à une rechute. Parmi les patients chez lesquels l'expansion des cellules injectées n'a pas été observée, une mortalité liée à l'EBV est survenue chez deux patients. Aucun effet indésirable n'a été noté chez les dix patients étudiés. Cette équipe a conclu qu'une dose de 150 CTL

anti-EBV était sans danger et permettait d'observer une expansion efficace *in vivo*. De plus, la sélection immunomagnétique permet de générer des CTL CD4⁺ et CD8⁺ capables de répondre à de multiples épitopes.

Tableau XI. Résultats d'essais cliniques utilisant des CTL produits par la technique immunomagnétique basée sur sécrétion de l'IFN- γ .

virus	Patients	Dose CTL/Kg	Evolution clinique	Référence
ADV	9 patients avec une infection systémique	1,2-50x10 ⁴	5/6 patients évaluable: résolution complète de l'infection ou diminution significative de la charge virale ADV	Feuchtinger <i>et al.</i> , 2006
ADV	5 enfants avec une virémie	1x10 ⁴ ou 10x10 ⁴	4/5: Expansion de CTL-ADV <i>in vivo</i> et 3/5: résolution de charge virale	Qasim <i>et al.</i> , 2013
ADV	1 enfant avec l'infection pulmonaire à ADV	ND	Une négativation de la charge virale ainsi qu'une récupération de fonction respiratoire	Di nardo <i>et al.</i> , 2013
EBV	6 patients avec un PTLD: 3/6 à un stade précoce et 3/6 à un stade tardif	0,4-9,7x10 ⁶	2 patients/3 en phase précoce :réponse complète (disparition de la charge virale et des signes cliniques); 3 patients/3 en phase tardive : aucune réponse	Moosmann <i>et al.</i> , 2010
EBV	10 patients avec une virémie persistente ou PTLD	0,015-5,38x10 ⁴	8/10 patients: expansion des CTL-EBV <i>in vivo</i> , 7/8 : diminution de la charge virale ou résolution de PTLD	Icheva <i>et al.</i> , 2012
CMV	18 patients avec virémie CMV ou post-réactivation	0,12-16,6x10 ⁴	12/16 patients évaluable: résolution de l'infection à CMV ou diminution significative de la charge virale CMV, expansion <i>in vivo</i> des CTL anti-CMV	Feuchtinger <i>et al.</i> , 2010
CMV	7 patients, 5 après réactivation virale et 2 en prophylactique	1x10 ⁴	7/7 patients : expansion des CTL-CMV <i>in vivo</i>	Mackinnon <i>et al.</i> , 2007
CMV	18 patients, 11 patients en pré-emptif et 7 patients en prophylaxie	1x10 ⁴	18/18 patients : expansion des CTL-CMV <i>in vivo</i> . 7/7 patients recevant des CTL en prophylaxie : pas de traitement antiviral dans les 6 mois; 11/11 patients en pré-emptif : réduction de l'utilisation des agents anti-viraux	Peggs <i>et al.</i> , 2011

CTL dirigés contre plusieurs virus

La même technologie a été utilisée pour générer rapidement en pré-clinique des CTL tri-virus, par l'équipe de M. Brenner (Fujita *et al.*, 2008). Les antigènes de stimulation étaient les mêmes que ceux utilisés par cette équipe pour la génération de CTL tri-virus par culture cellulaire c'est-à-dire des lignées EBV (LCL-EBV) modifiées génétiquement avec un vecteur adénoviral chimérique Ad5f35

exprimant le transgène CMV-pp65: Ad5f35pp65. Aucun essai clinique n'a été publié pour le moment.

3.2.3 Les limites de ces approches

Si les résultats cliniques rapportés précédemment avec la sélection immunomagnétique, soit par le biais des multimères, soit basée sur la sécrétion d'IFN- γ par les cellules stimulées sont extrêmement prometteurs, ces approches rencontrent quelques limites.

En effet, la sélection immunomagnétique par le biais des multimères reste restreinte aux patients qui expriment des allèles HLA pour lesquels des peptides viraux sont disponibles et pour lesquels la fréquence circulante de cellules T réactives dans le sang périphérique est suffisamment élevée. Ainsi, les infections associées aux virus (tel que l'ADV) où la fréquence circulante de cellules T réactives est plus faible que pour le CMV, ne seront pas concernées par ce type d'approche (Leen *et al.*, 2008). L'expérience infructueuse d'Uhlen chez un patient, mentionnée précédemment, confirme cette limite. Toutefois, une approche similaire nécessitant une expansion en présence de cytokines des CTL anti-ADV sélectionnés par le biais de multimères a été envisagée par Geyeregger *et al* en 2013. Aucune administration *in vivo* n'a été rapportée à ce jour.

Par ailleurs, seul un clone T spécifique du peptide présenté dans le contexte HLA du soi peut être sélectionné, ce qui restreint considérablement le nombre de lymphocytes T et la diversité des lymphocytes T dans la fraction sélectionnée.

Concernant la sélection immunomagnétique sur la base de la sécrétion d'IFN- γ , les limites apparaissent du fait : **1-** de l'absence de disponibilité d'antigènes de grade clinique pour tous les agents viraux, **2-** de la cinétique de sécrétion d'IFN- γ différente selon l'antigène viral utilisé, **3-** de la compétition éventuelle qui peut s'exercer entre les différents antigènes viraux lors de la production de CTL multi-pathogènes, **4-** de la capacité de la colonne de sélection limitant le nombre de cellules pouvant être soumises au processus de sélection.

On assiste actuellement à une disponibilité croissante d'antigènes de grade clinique pour plusieurs agents viraux, ce qui rend la production de CTL mono-spécifiques possible vis-à-vis de nombreux virus. S'agissant de la cinétique de sécrétion d'IFN- γ différente selon l'antigène viral utilisé trois travaux pré-cliniques récents ont montré qu'il était possible de sélectionner par méthode immunomagnétique des CTL multi-pathogènes en ciblant un marqueur de co-stimulation ou un marqueur d'activation dont la cinétique d'apparition est indépendante de l'antigène de stimulation.

3.2.4 Production de CTL sur la base de l'expression de marqueurs d'activation

Zandvliet *et al* ont rapporté la sélection avec succès de CTL anti-quadri-virus (CMV, EBV, ADV et influenza (FLU)) sur la base de l'expression du récepteur **CD137**, la cinétique d'expression de ce marqueur de co-stimulation étant optimale après 48 heures, quelque soit l'antigène de stimulation utilisé contrairement à la cinétique de la sécrétion d'IFN- γ (Zandvliet *et al.*, 2011).

Parallèlement, Khanna *et al* ont proposé la génération de CTL multipathogènes (ADV, EBV, CMV, *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*) sur la base de l'expression du **CD154** (CD40 Ligand, exprimé après activation des lymphocytes T) (Khanna *et al.*, 2011). Dans ce dernier travail, les auteurs préconisent une expansion des CTL *in vitro* afin d'observer la présence de CTL vis-à-vis de *l'Aspergillus fumigatus* dont la fréquence est indétectable après sélection. On peut noter que c'est la première publication qui isole avec succès des CTL anti-aspergillus en utilisant un antigène peptidique utilisable en clinique (un travail pré-clinique avait été rapporté par Tramsen *et al* utilisant un extrait cellulaire infecté par la souche d'*Aspergillus fumigatus* CBS 144-89 après inactivation) (Tramsen *et al.*, 2009).

Plus récemment, Lugthart *et al* sont parvenus à générer des CTL tri-virus (ADV, EBV et CMV) sur la base de l'expression du **CD25** (chaîne γ du récepteur de l'IL-2, exprimé après activation des lymphocytes T) après 3 jours de stimulation avec des pools de peptides (Lugthart *et al.*, 2012). Les auteurs mentionnent que cette stratégie permet également un enrichissement en cellules T régulatrices qui pourraient avoir un effet bénéfique sur la GvHD.

La troisième limite de ces techniques qui est la compétition qui s'exerce entre les différents antigènes viraux lors de la production de CTL multi-pathogènes n'est à ce jour pas résolue. En effet, le choix d'une cible telle que le CD154 ou le CD25 ne permet toutefois pas de s'en affranchir et les auteurs observent la prédominance de CTL d'une spécificité donnée au dépend des autres.

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

La production des CTL anti-infectieux telle que nous l'avons présentée jusqu'ici consiste à isoler et éventuellement amplifier une population de lymphocytes T spécifiques pré-existante. Cependant, cette approche n'est pas applicable aux donneurs séronégatifs, n'ayant jamais rencontré les agents viraux concernés ou avec les sangs placentaires allogéniques, dont l'utilisation en allogreffe de CSH est croissante. La production de CTL anti-infectieux à partir de tels donneurs nécessite au préalable le « priming » des LT. Les CPA capables d'effectuer ce « priming » sont les DC. L'équipe de M Brenner a proposé une méthode de production de CTL tri-virus à partir de sangs placentaires en

produisant avec une partie du sang placentaire décongelé des DC pulsées, après 5 jours de culture, avec le vecteur adénoviral chimérique Ad5f35 exprimant le transgène CMV-pp65:Ad5f35pp65. Ces DC pulsées sont mises en co-culture avec les cellules mononucléées du sang placentaire en présence d'un cocktail cytokinique composé d'IL-7, IL-15 et IL-12 pendant 10 jours. Une première stimulation antigénique par la LCL-EBV-Ad5f35pp65 avec IL-15 à J10 et une 2^{ème} stimulation antigénique par la LCL-EBV-Ad5f35pp65 avec IL-2 à J17 ont été effectuées. De l'IL-2 est ensuite ajoutée deux fois par semaine à partir de J20. Neuf lignées de CTLs anti-ADV/EBV/CMV ont été produites à partir de sangs placentaires. Après poursuite de la culture pendant 3 semaines, une médiane de $85,5 \times 10^6$ cellules a été obtenue comprenant en médiane 78,7% CD8+ (46-94%) et 31% de CD4+ (12-54%). Leur spécificité antigénique a été contrôlée par Elispot IFN- γ (Hanley *et al.*, 2009; Hanley *et al.*, 2012) .

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

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

3.4 Production de CTL de tierce partie

L'approche de la production de CTL à partir d'un donneur différent du donneur de CSH, un donneur tierce partie, a été mise en pratique pour la première fois dans le cadre des banques de CTL que nous avons évoquées précédemment. Actuellement il y a trois banques de CTLs existantes : une banque de CTL-EBV en Ecosse (44 patients); une banque de CTL-EBV en France (11 patients) et une banque de CTL tri-virus (ADV/CMV/EBV) aux USA (50 patients). En dehors du contexte des banques de CTL, le recours à un donneur tierce partie s'avère parfois nécessaire lorsqu'il n'est pas possible de revenir au donneur de CSH, comme par exemple dans le cas des greffes de sang placentaire, dans le cas d'une indisponibilité du donneur ou bien d'un donneur de sérologie négative. Dans le rapport du

Memorial Sloan-Kettering en 2012, 5 patients ont été traités par des CTL-EBV tierce partie et des réponses complètes ont été obtenues chez 4/5 patients (Dobrovina *et al.*, 2012). D'autres études ont confirmé ces résultats (Barker *et al.*, 2010; Uhlin *et al.*, 2010 et 2012). Feuchtinger *et al.* ont rapporté leur expérience de traitement de 2 patients après greffe de sang placentaire avec des cellules spécifiques anti-CMV provenant de donneurs tierce partie ne présentant aucune compatibilité HLA avec les patients. Ces cellules ont été produites par technique immunomagnétique. Une expansion des CTL-CMV *in vivo* a été observée chez un patient, concomitante à une négativation de la charge virale (Feuchtinger *et al.*, 2010). L'efficacité pour négativer la charge virale ADV avec les cellules T spécifiques anti-ADV produites par technique immunomagnétique à partir d'un donneur tierce partie a été confirmée par l'équipe anglaise de Qasim (Qasim *et al.*, 2011). Même si les taux de réponse sont légèrement inférieurs à ceux observés avec CTL dérivés du donneur de CSH, on note une efficacité importante sans risque accru d'alloréactivité.

REVUE1



L'essentiel de l'information
scientifique et médicale

www.jle.com

Le sommaire de ce numéro

http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/bio_rech/vir/sommaire.md?type=text.html



Montrouge, le 02/02/2013

Danièle Bensoussan

Vous trouverez ci-après le tiré à part de votre article au format électronique (pdf) :

Immunothérapie adoptive antivirale après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

paru dans

Virologie, 2012, Volume 16, Numéro 6

John Libbey Eurotext

Ce tiré à part numérique vous est délivré pour votre propre usage et ne peut être transmis à des tiers qu'à des fins de recherches personnelles ou scientifiques. En aucun cas, il ne doit faire l'objet d'une distribution ou d'une utilisation promotionnelle, commerciale ou publicitaire.

Tous droits de reproduction, d'adaptation, de traduction et de diffusion réservés pour tous pays.

© John Libbey Eurotext, 2012

Immunothérapie adoptive antivirale après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Lamia Aïssi-Rothé^{1,a}

Yingying Wang^{1,a}

Véronique Decot^{1,2}

Jean-François Stoltz^{1,2}

Danièle Bensoussan^{1,2,3}

¹ Nancy-université,
UMR 7561 CNRS-UHP et FR 3209,
Biopôle,
avenue de la Forêt-de-Haye,
54511 Vandœuvre-lès-Nancy,
France

² CHU de Nancy,
unité de thérapie cellulaire et tissus,
allée du Morvan,
54511 Vandœuvre-lès-Nancy,
France

³ Nancy-université,
faculté de pharmacie,
département de
microbiologie-immunologie,
5, rue Albert-Lebrun,
54001 Nancy cedex,
France
<d.bensoussan@chu-nancy.fr>

Résumé. Après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), surviennent des infections virales associées à une morbidité et une mortalité importantes du fait de l'absence de reconstitution immunitaire spécifique concomitante. Dans ce contexte, les traitements médicamenteux antiviraux présentent une efficacité inconstante. L'idée de proposer une alternative thérapeutique aux antiviraux permettant de restaurer la réponse immunitaire a émergé dans les années 1990 en proposant d'administrer les lymphocytes du donneur au patient, thérapeutique parfois efficace mais malheureusement non dénuée d'effet délétère. L'immunothérapie adoptive spécifique consiste à transférer une immunité issue du donneur par l'administration de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) dirigés contre un ou plusieurs virus, isolés au préalable *in vitro* et éventuellement amplifiés. Les progrès réalisés, durant cette dernière décennie, ont montré que cette approche est un atout essentiel dans la lutte efficace contre les infections virales chez les receveurs d'allogreffes de CSH tout en étant peu associée aux effets secondaires initialement redoutés. Deux grandes évolutions ont permis une meilleure réactivité et une disponibilité rapide des CTL au moment où le patient en a besoin : le développement de banques de CTL allogéniques et l'évolution des techniques de production.

Mots clés : infections virales, allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, immunothérapie adoptive, sélection immunomagnétique

Abstract. Viral infections represent one of the main causes of morbidity and mortality following hematopoietic stem cell transplantation. Antiviral treatment failure may be explained by the absence of specific immune reconstitution. In the 1990s, antiviral immunotherapy initially consisting in total donor lymphocyte infusion presented efficiency but was often associated with adverse events. Specific antiviral immunotherapy emerged and relied on the isolation of mono- or multivirus donor-derived-specific T cells with or without *in vitro* expansion. During the last 10 years, such an adoptive transfer has been proved feasible, and helpful in specific antiviral immune reconstitution, and rarely associated with adverse events. Two main evolutions contributed to allow a good reactivity to propose immunotherapy in case of antiviral treatment failure: the development of allogeneic cytotoxic T lymphocytes (CTL) banks and the improvement of CTL isolation methods using immunomagnetic technology, which presents the advantage to be fast.

Key words: viral infections, hematopoietic stem cell transplantation, adoptive immunotherapy, immunomagnetic isolation

Tirés à part : D. Bensoussan

^a Les deux premiers auteurs ont contribué de manière égale à ce travail.

doi:10.1684/vir.2012.0468

Introduction

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) demeure aujourd'hui le traitement de référence pour de nombreux patients atteints d'hémopathies malignes, non malignes ou de déficits immunitaires primitifs. Dans le contexte des hémopathies malignes, elle consiste en une véritable immunothérapie, les cellules immunocompétentes présentes dans le greffon réagissant contre les cellules anormales. Il s'agit de l'effet bénéfique de l'allogreffe appelé effet du greffon contre la leucémie (GvL). Cependant, la mise en présence de deux systèmes immunitaires engendre des réactions d'alloréactivité bidirectionnelles à l'origine des complications majeures de l'allogreffe de CSH : le rejet du greffon, lié à la réaction du système immunitaire du receveur contre le greffon et la réaction du greffon contre l'hôte (GvH), réaction symétrique du rejet liée à la réaction des cellules immunocompétentes présentes dans le greffon contre les tissus du receveur. Toutefois, la reconstitution d'une immunité à partir du greffon chez le receveur constitue un avantage certain de l'allogreffe de CSH comparé aux allogreffes d'organes : la possibilité d'arrêter tout traitement immunosuppresseur au cours de la vie du patient. Cette reconstitution immunitaire peut prendre du temps et être aggravée par l'immunosuppression engendrée par la GvH et ses traitements. Ce contexte d'immunodépression profonde favorise la survenue d'infections parmi lesquelles les infections virales, plus particulièrement celles à *Herpesviridae* (le virus d'Epstein-Barr [EBV] et le cytomégalovirus [CMV]) et à adénovirus (ADV) qui sont associées à une morbidité et une mortalité importantes [1]. Bien que d'autres virus soient également rencontrés après allogreffe de CSH, l'incidence et la gravité des complications engendrées ne sont pas aussi importantes qu'avec l'EBV, le CMV et l'ADV. La mise en œuvre d'un suivi régulier (*monitoring*) des charges virales après la greffe a apporté des bénéfices considérables parmi lesquels la possibilité d'anticiper le développement d'infections virales causées par ces agents les plus fréquents et l'instauration très précoce, avant toute apparition de signes cliniques en lien avec l'agent infectieux détecté, d'un traitement antiviral à dose curative, appelé : *traitement préemptif*. Cependant, cette seule information peut parfois conduire à l'administration excessive de traitements antiviraux qui peuvent être responsables d'une toxicité chez le patient. En effet, certains patients peuvent, à partir des lymphocytes T matures apportés avec le greffon, développer une immunité spécifique en réponse à l'agent infectieux. De fait, depuis une dizaine d'années, le suivi régulier de la reconstitution immunitaire spécifique est de plus en plus fréquemment associé au *monitoring* virologique, principalement du fait de l'avènement de techniques rapides et

sensibles de quantification de l'immunité cellulaire spécifique. Cette double approche permet alors de cibler avec précision les patients nécessitant la mise en œuvre d'une thérapie antivirale préemptive comparés à ceux disposant de défenses immunitaires suffisantes pour maîtriser l'infection [2, 3]. En effet, plusieurs équipes, dont la nôtre, ont montré dans le cadre des infections EBV survenant après allogreffe de CSH, la pertinence d'associer une technique sensible, rapide, fonctionnelle ou non d'évaluation de la réponse immunitaire spécifique afin de ne traiter en préemptif que les patients incapables de se défendre [4]. Cependant, si la sélection fine des patients nécessitant une thérapeutique médicamenteuse antivirale permet d'éviter le traitement excessif des patients, elle ne garantit pas l'efficacité du traitement. En effet, il a été rapporté pour certains virus que le traitement médicamenteux pouvait s'avérer inefficace en l'absence de reconstitution immunitaire concomitante [5]. Malgré l'émergence de nouvelles molécules antivirales, la nécessité de restaurer cette immunité anti-infectieuse est plus que jamais d'actualité, les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) représentant l'élément principal de défense contre les virus mais également contre les tumeurs. La première stratégie d'immunothérapie adoptive anti-infectieuse développée dans les années 1990 a été la réinjection de lymphocytes du donneur (*donor lymphocyte infusion* [DLI]). Malgré quelques succès rapportés dans la littérature, cette technique est aujourd'hui abandonnée dans cette indication du fait du faible nombre de lymphocytes T spécifiques injectés et du risque associé de survenue d'une GvH, mais reste d'actualité pour favoriser l'effet GvL [6, 7]. Cependant, ces observations ont révélé la nécessité d'évoluer vers des stratégies d'immunothérapies adoptives spécifiques. Deux options différentes ont été explorées en parallèle : d'une part, l'élimination des lymphocytes T alloréactifs des cellules du donneur à réinjecter afin de conserver intacts les lymphocytes T garants de l'activité anti-infectieuse tout en limitant le risque de survenue d'une GvH (*déplétion alloréactive*), d'autre part, la sélection des CTL antiviraux (*figure 1*).

La première option a donné des résultats très prometteurs dans les déficits immunitaires en utilisant une immunotoxine pour éliminer les lymphocytes T alloréactifs [8]. Cependant, les résultats ont été plus décevants dans les hémopathies malignes, l'élimination des lymphocytes T alloréactifs entraînant la disparition des lymphocytes T responsables de l'effet GvL, conduisant à un taux de rechute très élevé [9]. La seconde option consiste à transférer une immunité spécifique issue du donneur en administrant des CTL dirigés contre un ou plusieurs virus, isolés au préalable *in vitro* et éventuellement amplifiés. Cette approche, initialement développée par culture cellulaire de longue durée, a bénéficié des évolutions des techniques de

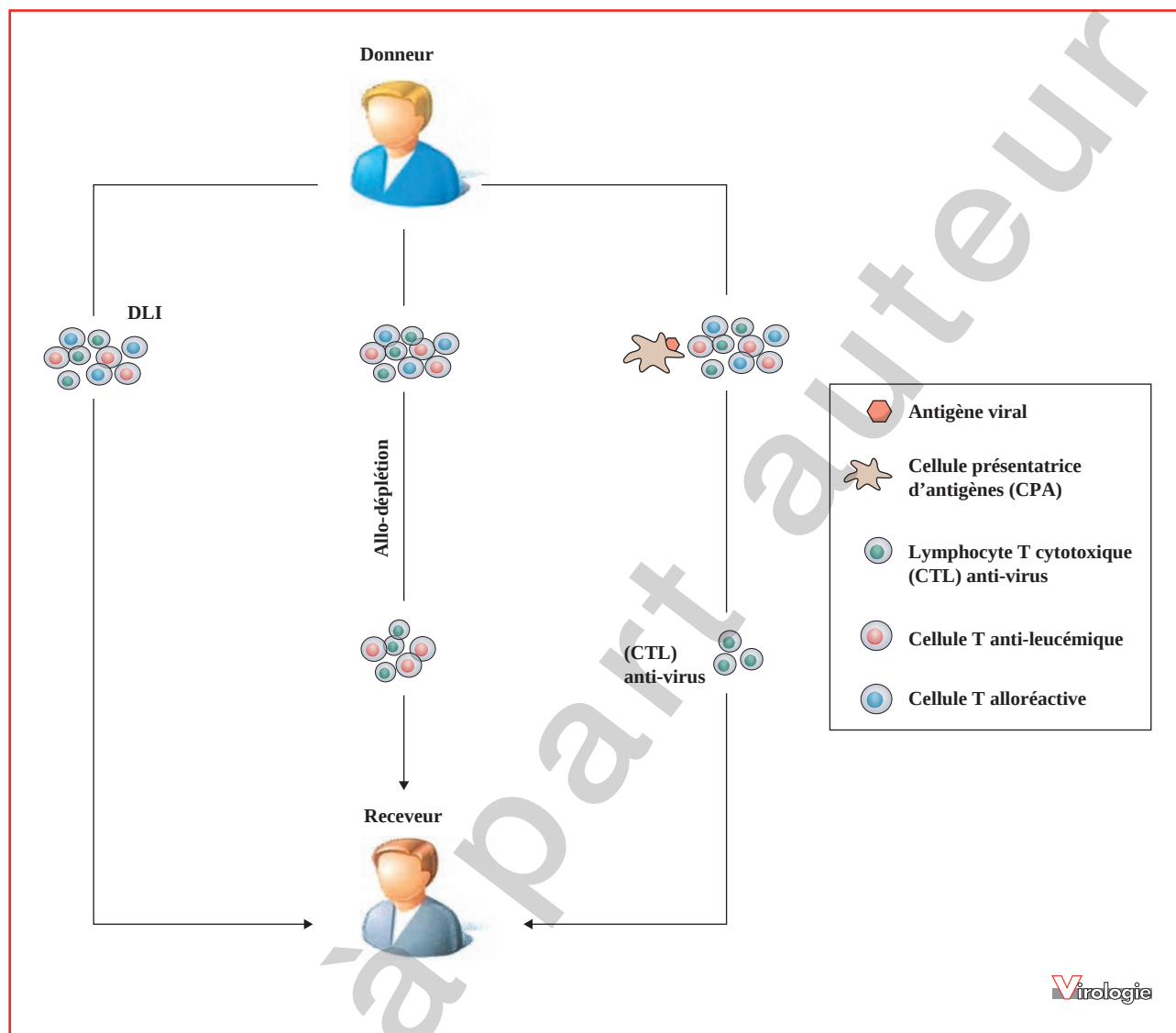


Figure 1. Stratégies d'immunothérapie adoptive.

production de grade clinique permettant aujourd'hui d'avoir une meilleure réactivité et une disponibilité rapide des CTL au moment où le patient en a besoin. Nous nous proposons de présenter dans cette revue les différentes techniques d'immunothérapie cellulaire spécifique antivirale qui sont, pour la plupart, actuellement évaluées dans le cadre de protocoles cliniques.

Immunothérapie spécifique antivirale

Deux grandes méthodes d'obtention de CTL spécifiques antiviraux ont été développées et sont rapportées dans la

littérature : soit l'isolement et l'amplification des CTL anti-infectieux pendant quatre à six semaines de culture cellulaire *in vitro*, soit la sélection rapide des CTL circulants chez le donneur.

Production des lymphocytes T cytotoxiques antiviral par culture cellulaire

Les lymphocytes T cytotoxiques antiviral d'Epstein-Barr

Nous n'évoquerons dans ce chapitre que les études ayant porté sur les syndromes lymphoprolifératifs induits par l'EBV après allogreffe de CSH (*tableau 1*). Cependant,

Tableau 1. Essais cliniques utilisant des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) anti-virus d'Epstein-Barr (EBV) après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

Protocole d'expansion	Cellules injectées	Patients traités	Résultats cliniques	Références
Culture <i>in vitro</i>	CTL polyclonaux	10 (3 comme traitement et 7 comme prophylaxie)	3/3 ont contrôlé l'infection	[10]
Culture <i>in vitro</i>	CTL polyclonaux	39 avec traitement prophylactique	Aucun patient n'a développé de PTLD en comparaison avec 11,5 % du groupe témoin	[11]
Culture <i>in vitro</i>	CTL polyclonaux	6 patients traités	5 patients en rémission complète ; 1 décédé	[11, 16]
Culture <i>in vitro</i>	CTL polyclonaux	114 patients (101 ont reçu un traitement prophylactique ; 13 ont reçu un traitement curatif)	101/101 : aucun développement d'un EBV-PTLD 11/13 : rémission complète	[15]
Culture <i>in vitro</i>	CTL polyclonaux	6 avec une forte charge virale	5/6 ont réduit la charge virale post-CTL 1/6 décédé suite à un PTLD	[12]
Culture <i>in vitro</i>	CTL polyclonaux	1 patient traité pour une lymphoprolifération induite par l'EBV	Pas de réponse à la thérapie	[18]
Culture <i>in vitro</i>	CTL polyclonaux	6 patients (dont 5 ayant développé un PTLD) ont été traités par CTL anti-EBV après échec du traitement par rituximab (2 : absence de réponse ; 4 : réaugmentation de la charge virale EBV à l'arrêt du traitement)	Une négativation de la charge virale EBV, une résolution clinique des PTLD chez tous les patients. Aucun événement indésirable, ni aucune réaction de GvH	[13]
Culture <i>in vitro</i>	CTL polyclonaux provenant d'une banque	8 patients avec un PTLD progressif ne répondant pas aux traitements conventionnels ont été traités	3 patients ont une réponse complète ; 2 patients sans réponse ; 3 patients n'ont pas fini le traitement	[30]
Culture <i>in vitro</i>	CTL polyclonaux provenant d'une banque	33 patients avec un PTLD ne répondant pas aux traitements conventionnels ont été inscrits	14 patients ont une réponse complète ; 3 avec réponse partielle ; 16 sans réponse	[31]

IFN γ : interféron gamma ; GvH : réaction du greffon contre l'hôte ; PTLD : *post-transplant lymphoproliferative disease*.

des CTL anti-EBV ont été également générés dans d'autres contextes cliniques (Syndromes lymphoprolifératifs induits par l'EBV – *EBV-post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD)* – survenant après allogreffes d'organe, lymphome de Hodgkin, carcinome nasopharyngé). En effet, ces pathologies tumorales, du fait de l'expression de nombreux antigènes immunogènes de l'EBV, constituent une cible privilégiée pour un effet antiviral et également antitumoral des CTL.

À partir des années 1993, l'équipe de Heslop et de Rooney a été la première à développer une immunothérapie adoptive à visée préventive et curative des EBV-PTLD après allogreffe de CSH [10, 11]. D'autres équipes ont également travaillé sur le sujet [12, 13]. En effet, avant l'avènement du rituximab au début des années 2000 [14] et son utili-

sation dans le traitement de l'EBV-PTLD, la morbidité et la mortalité liées à l'EBV après une allogreffe T-déplétée étaient très élevées (entre 1 à 25 %).

Les cellules B infectées par l'EBV dans les PTLD ont un phénotype et une expression d'antigènes viraux proches de ceux des lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) transformées *in vitro* par l'EBV (produites en infectant les cellules B du sang périphérique du donneur par la souche EBV B 95.8). Les LCL ont été utilisées comme cellules présentatrices d'antigène (CPA), afin de produire des CTL anti-EBV en co-cultivant les cellules mononucléées (CMN) du donneur avec la LCL du donneur. Au cours d'une culture d'un mois environ, de l'IL2 est ajoutée à chaque changement de milieu et une re-stimulation par la LCL du donneur est réalisée. Grâce à cette méthode, les CTL anti-EBV

produits sont polyclonaux et contiennent des cellules T anti-EBV CD4+ et CD8+, reconnaissant plusieurs antigènes latents ou lytiques du virus.

L'équipe de Heslop et de Rooney a montré une efficacité des CTL anti-EBV dans la prévention de la survenue des EBV-PTLD ainsi que dans l'apparition d'une immunité anti-EBV chez le receveur [10, 11]. Une équipe japonaise a quant à elle rapporté en 1997 une expérience malheureuse chez un patient présentant un EBV-PTLD [16]. Les auteurs ont suggéré que l'injection de CTL anti-EBV était intervenue trop tard par rapport au diagnostic (20 et 30 jours après) et à des doses faibles. Récemment, ont été rapportés par l'équipe de Brenner les résultats de l'injection des CTL anti-EBV chez 114 patients, l'ensemble des patients ayant été pris en charge par ce traitement. Cent un patients ont reçu ce traitement en prophylaxie et aucun d'entre eux n'a développé de syndrome lymphoprolifératif induit par l'EBV [16]. De plus, aucune GvH *de novo* n'a été observée et huit patients qui avaient déjà présenté une GvH ont eu une réactivation rapidement maîtrisée. Les 26 premiers patients ont reçu des CTL anti-EBV marqués génétiquement avec un vecteur rétroviral contenant le gène de résistance à la néomycine (*neo*). Ce marquage a permis de montrer que les CTL pouvaient survivre jusqu'à neuf ans après l'injection [16]. Sur 13 patients traités en curatif par des CTL anti-EBV, 11 ont été mis en rémission complète. Les deux premiers patients avaient été décrits antérieurement [11]. L'un des deux patients n'avait pas répondu au traitement, la tumeur ne présentant plus les deux épitopes principaux (notamment EBNA-3B) contre lesquels réagissaient les CTL anti-EBV, entraînant une résistance au traitement [17]. C'est pourquoi, il est préférable que le produit cellulaire soit polyclonal avec des spécificités antigéniques larges afin de diminuer les risques d'échappement de la tumeur au système immunitaire et composé de cellules T anti-EBV CD4+ et CD8+ [18]. Cette équipe a conclu qu'une dose de 2×10^7 CTL anti-EBV/m² était sans danger et efficace pour une utilisation prophylactique ou curative.

Les lymphocytes T cytotoxiques anti-cytomégalo virus

Le transfert adoptif des CTL anti-CMV activés et amplifiés *in vitro* a également été utilisé comme traitement prophylactique et curatif des infections CMV post-greffe (tableau 2).

L'équipe de Riddell a été la première à s'intéresser à l'immunothérapie adoptive anti-CMV en développant des clones de cellules T CD8+ anti-CMV, isolés à partir du sang du donneur de CSH et amplifiés *in vitro* puis administrés à des doses croissantes de 3×10^6 /kg à 1×10^9 /kg, à 14 patients après allogreffe de CSH [19]. Les auteurs ont montré que ces injections de clones T CD8+ anti-CMV

étaient bien tolérées et qu'elles permettaient le transfert d'une immunité anti-CMV chez le receveur. Les clones ont persisté pendant au moins huit semaines avant de disparaître progressivement chez les patients qui n'avaient pas reconstitué une immunité CD4 anti-CMV endogène. Cette étude a mis en évidence l'importance d'associer aux CTL CD8+ spécifiques une population de lymphocytes T CD4+ spécifiques afin que le transfert d'immunité adoptive soit maintenu dans le temps. Puis Einsele *et al.* ont généré des lignées polyclonales de CTL anti-CMV en utilisant un lysat CMV permettant d'activer et d'amplifier les cellules T CD4+ et CD8+ [20, 21]. Les CTL anti-CMV injectés à la dose de 1×10^7 /m² ont permis la réduction de la charge virale chez sept patients traités sur huit, cet effet étant soutenu dans le temps pour cinq patients, les deux autres ayant réactivé le CMV. Cependant, une deuxième injection de CTL anti-CMV a entraîné la négativation de la charge virale pour l'un d'entre eux [21]. Peggs *et al.* ont utilisé une approche de production légèrement différente en stimulant les CMN du donneur avec des cellules dendritiques (DC) du donneur, CPA chargées avec des antigènes CMV dérivés d'une souche CMV inactivée (*Towne's strain*) [22]. Seize patients ayant présenté une réactivation CMV ont reçu 1×10^5 CTL anti-CMV/kg après 36 jours (en médiane) post-greffe [23]. Aucune réaction de GvH n'a été observée et une expansion massive *in vivo* des CTL anti-CMV (de 3 à 5 log) a été observée chez quatre patients explorés. Les thérapeutiques médicamenteuses anti-CMV ont été arrêtées chez huit patients. Seuls deux patients sur les 14 évaluable ont eu une réactivation du CMV nécessitant la mise en place d'un traitement antiviral.

Les études plus récentes se sont affranchies pour la stimulation cellulaire T de l'utilisation de lysat ou d'antigènes dérivés d'une souche CMV qui peuvent représenter une source de transmission virale au receveur, et qui ne sont pas acceptés par les autorités réglementaires pour la production de cellules administrées à l'homme. L'équipe de Micklethwaite a produit des CTL anti-CMV en stimulant les CMN du donneur avec des DC du donneur chargées avec un peptide synthétique immunodominant NLVPMVATV dérivé de la protéine pp65 et présenté par la molécule HLA-A2 aux lymphocytes T CD8+ [24]. Ces CTL anti-CMV ont été transférés en prophylaxie à des receveurs adultes ou pédiatriques d'allogreffe de CSH après conditionnement non myéloablatif sans aucune déplétion T *in vivo* ou *in vitro*. Chez six patients sur neuf une augmentation modérée post-injection de la fréquence des cellules T CD8+ spécifiques a été observée, mais celles-ci ont disparu après quelques jours voire quelques semaines, probablement du fait de l'absence de lymphocytes T CD4+ spécifiques. Les autres patients ont réactivé le CMV. Une GvH aiguë a été observée chez trois patients dans les 14 jours qui ont suivi l'injection des CTL anti-CMV, conduisant au décès d'un

Tableau 2. Essais cliniques utilisant des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) anti-cytomégalovirus (CMV) après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

Protocole d'expansion	Cellules injectées	Patients traités	Résultats cliniques	Références
Culture <i>in vitro</i>	Clones de cellules T CD8+	Injection prophylactique pour 14 patients	Pas d'infection à CMV	[19]
Culture <i>in vitro</i>	CTL polyclonaux	8 avec infection	5 patients ont eu une négativation de la charge virale CMV après 1 dose de CTL ; 1 patient, après la 2 ^e dose ; 1 n'a pas négativé la charge virale CMV	[21]
Culture <i>in vitro</i>	CTL polyclonaux	16 avec virémie	8 patients ont négativé la charge virale CMV sans antiviraux ; 2 patients/14 évaluables ont réactivés le CMV nécessitant un traitement antiviral	[23]
Culture <i>in vitro</i> /Sélection immunomagnétique	CTL polyclonaux	23 patients avec virémie (16 ont reçu des CTL cultivés <i>in vitro</i> ; 7 ont reçu des CTL-IFN γ [5 après réactivation de la charge virale et 2 en prophylactique])	8/16 : négativation de la charge virale CMV sans antiviraux 8/16 : réactivation du CMV puis négativation concomitante à l'injection de CTL 7/7 : expansion des CTL anti-CMV, qu'il y ait ou non une charge virale CMV détectable (5/7 ont reçu une thérapie médicamenteuse antivirale concomitante, mais de plus courte durée pour 4 d'entre eux)	[37]
Culture <i>in vitro</i>	Cellules T CD8+ spécifiques d'un peptide de pp65	Injection prophylactique à 9 patients	6/9 : expansion <i>in vivo</i> des cellules T spécifiques anti-CMV post-injection ; 2/9 réactivation CMV résolutive sans antiviraux	[24]
Culture <i>in vitro</i>	CTL polyclonaux	Injection prophylactique à 12 patients	12/12 : reconstitution immunitaire spécifique anti-CMV post-injection, durable dans le temps pour 8 patients 4/12 : réactivation CMV résolutive sans antiviraux pour 2 patients	[25]
Culture <i>in vitro</i>	CTL polyclonaux	7 patients avec antigénémie ou virémie positive après plus de 2 semaines de traitement antiviral	5/7 : cytotoxicité anti-CMV dans les 4 à 6 semaines suivant les CTL 2/7 : pas de reconstitution (viabilité des CTL insuffisante ou poursuite du traitement immunosuppresseur)	[26]
Culture <i>in vitro</i>	CTL polyclonaux	1 patient recevant des CTL anti-CMV d'un donneur de CSH séronégatif pour le CMV	Diminution de la charge virale CMV	[47]

IFN γ : interféron gamma ; GvH : réaction du greffon contre l'hôte ; pp65 : une protéine immunodominante du CMV.

des patients. Dans cette étude, tous les patients avaient développé une GvH avant l'injection des CTL anti-CMV et l'incidence de la GvH a coïncidé avec une diminution des doses de corticoïdes, mais la possibilité que les cellules T puissent avoir causé ou renforcé la GvH ne peut être éliminée. Malgré l'avantage de proposer une production de CTL anti-CMV de grade clinique, ce protocole présente plusieurs limites : le fait que la stimulation ne soit faite que par un seul peptide présenté par une molécule HLA donnée

(HLA-A2) restreint cette thérapeutique aux patients présentant ce typage HLA et limite le nombre de clones de lymphocytes T présents dans les CTL à une seule spécificité, contrairement à ce que l'on peut observer lorsque l'antigène de stimulation est un ensemble de peptides issus d'une protéine immunodominante. Enfin, l'absence de lymphocytes T CD4+ spécifiques, indispensables au maintien de la réponse immunitaire dans le temps chez les patients est une limite importante.

C'est pourquoi la même équipe a ensuite produit des CTL polyclonaux anti-CMV en utilisant comme CPA des DC transduites avec un vecteur adénoviral codant pour la protéine pp65 du CMV. Ils ont injecté en prophylaxie une seule dose de $2 \times 10^7/\text{m}^2$ CTL anti-CMV, 28 jours après allogreffe de CSH chez 12 patients adultes [25]. Seuls quatre patients ont présenté une réactivation CMV mais avec des charges virales CMV faibles, ne nécessitant pas la mise en place d'un traitement antiviral pour deux d'entre eux. De plus, le taux de survenue d'une GvH suite à l'injection des CTL n'était pas augmenté par rapport à celui attendu classiquement dans ce type d'allogreffe. La présence d'une immunité anti-CMV suite à une expansion *in vivo* des CTL injectés a été objectivée chez les 12 patients et a été durable dans le temps pour huit d'entre eux. Enfin, tout récemment, l'équipe de Lucas a rapporté un essai clinique portant sur sept patients présentant une infection à CMV résistante au traitement antiviral après plus de deux semaines. Des CTL anti-CMV ont été produits par culture en utilisant un mode de stimulation que nous évoquerons souvent dans la suite de cette revue. Les antigènes de stimulation étaient des pools de peptides synthétiques de 15 acides aminés se chevauchant tous les 11 acides aminés et recouvrant la totalité de la protéine pp65 et de la protéine IE1, deux protéines immunodominantes du CMV. Les CTL ainsi obtenus ont été administrés à une dose comprise entre 2,5 et $5 \times 10^5/\text{kg}$. Parmi les sept patients, cinq ont présenté une activité cytotoxique anti-CMV dans les quatre à six semaines suivant l'injection. Pour les deux autres patients chez lesquels aucune immunité spécifique n'a été observée, les auteurs rapportent que pour l'un la viabilité des CTL injectés était très faible et que l'autre était encore sous traitement immunosuppresseur (ciclosporine A et corticoïdes) lors de l'injection [26]. Dans cette étude, le fait de disposer de CTL anti-IE1 permet d'élargir la spécificité antigénique des CTL anti-CMV compte tenu que seuls 70 à 90 % des CTL reconnaissent les épitopes de la protéine pp65 et que les cellules T anti-IE1 sont importantes pour conférer une immunité protectrice contre le CMV. Il semble de plus que les réponses immunitaires anti-IE1 sont plus fortes et soutenues dans le temps.

Les lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre plusieurs virus

Leen *et al.* ont produit des lignées de CTL tri-virus contenant des CTL spécifiques polyclonaux contre l'EBV, le CMV et l'ADV [27]. Ces lignées de CTL ont été produites en modifiant génétiquement les monocytes et les LCL transformées par l'EBV (LCL-EBV) avec un vecteur adénoviral chimérique Ad5f35 exprimant le transgène CMVpp65:Ad5f35pp65. En utilisant ce protocole, l'équipe de Leen a activé et amplifié les lignées de CTL avec des

spécificités appropriées. Avec cette méthode, les auteurs ont injecté les CTL anti-EBV, anti-CMV et anti-ADV chez 11 patients [27]. Chaque patient a reçu en médiane 5×10^7 cellules/ m^2 à J62 post-greffe. Aucun patient n'a développé de GvH et aucune toxicité n'a été déplorée. La réponse immunitaire spécifique du CMV a pu être évaluée pour dix patients ; une augmentation de la réponse T IFN γ anti-CMV a été observée chez sept d'entre eux dans les deux semaines qui ont suivi l'infection, ce qui a été confirmé pour quatre patients avec la technique des Tétramères. *In vivo*, trois patients ont eu une augmentation de la charge virale CMV dans les deux à sept semaines suivant l'injection des CTL. Aucun traitement médicamenteux n'a été nécessaire, la charge virale étant ensuite devenue négative en une semaine. La réponse immunitaire spécifique de l'EBV a pu être évaluée chez 11 patients. Une augmentation médiane d'un facteur 6 de la réponse IFN γ a été observée en Elispot vis-à-vis de l'EBV dans les deux semaines suivant l'injection pour dix patients. *In vivo*, trois patients ayant présenté une réactivation EBV, dont un avec manifestations cliniques d'un PTLT, quatre à neuf semaines après l'injection des CTL, ont spontanément résolu l'infection et les signes cliniques ont disparu, en même temps que se développaient chez les patients des cellules T spécifiques de l'EBV. Enfin, parmi les 11 patients, cinq présentaient des cultures à ADV positives dans le sang, les selles et le nasopharynx. Les six autres n'étaient pas infectés par le virus. Pour les cinq patients infectés, les auteurs ont mis en évidence une expansion des CTL anti-ADV associée à une diminution de la charge virale. Ils rapportent également une amélioration clinique d'un patient qui présentait une pneumopathie. Quant aux six autres patients non infectés, les auteurs n'ont pas mis en évidence d'expansion des CTL anti-ADV et ne rapportent aucune infection à ADV pendant la durée du suivi. Les auteurs concluent que ces CTL multivirus sont dépourvus d'effet délétère et sont parfaitement fonctionnels *in vivo*. L'expansion observée *in vivo* des lymphocytes T spécifiques de l'EBV, du CMV ou de l'ADV, en l'absence d'un changement significatif du nombre de lymphocytes T global est en faveur d'une contribution réelle des CTL injectés dans le développement de la réponse immunitaire (tableau 3). La même équipe, ayant constaté la réactivation CMV chez trois patients, a souhaité accroître le contrôle des infections CMV en développant, selon un protocole similaire, des CTL tri-virus en insérant également dans le vecteur adénoviral le gène codant pour la protéine IE1 du CMV [28]. Une étude clinique a été initiée.

Les effets secondaires survenant après l'injection de lymphocytes T cytotoxiques antiviraux

L'équipe de Cruz a récemment fait le bilan des effets secondaires observés après injection de CTL anti-infectieux au

Tableau 3. Essais cliniques utilisant des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) multivirus et bi-virus, après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

CTL	Protocole d'expansion	Cellules injectées	Patients traités	Résultats cliniques	Références
Multivirus (CMV, EBV, ADV)	Culture <i>in vitro</i>	CTL polyclonaux	11 patients (injection prophylactique pour 10 ; 1 traité pour une infection à ADV)	3/3 ont contrôlé la réactivation du CMV sans antiviraux 3/3 : disparition de l'infection à EBV sans antiviraux 5 patients avec infection et 1 avec maladie Disparition de la charge virale ADV post-CTL	[27]
Bi-virus (ADV, EBV)	Culture <i>in vitro</i>	CTL polyclonaux	12 patients avec un traitement prophylactique pour une infection à ADV et 1 patient a reçu une dose de CTL en compassionnel	10/12 n'ont pas réactivé l'EBV 3/12 : diminution de la charge virale EBV concomitante à l'apparition de CTL anti-EBV 2/12 : réactivation de l'ADV et diminution de la charge virale concomitante à l'injection de CTL anti-ADV	[33]

ADV : adénovirus ; EBV : virus d'Epstein-Barr ; CMV : cytomégalovirus ; IFN γ : interféron gamma ; GvH : réaction du greffon contre l'hôte.

cours de dix années d'expérience [29]. Les auteurs ont identifié un taux d'événements indésirables de 17,3 %, mais aucun grave. Les événements indésirables étaient dans leur grande majorité attribuables au cryoprotecteur (le DMSO) ou à la diphenhydramine administrée en prémédication, et non aux CTL eux-mêmes. Les auteurs concluent qu'une surveillance du patient d'une heure après l'injection des CTL est suffisante.

Les limites de la production de lymphocytes T cytotoxiques antiviraux par culture cellulaire

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

Le temps de production entre quatre et six semaines (voire plus pour la production de la lignée EBV) nécessite d'anticiper la production pour tous les patients avant ou au moment de la greffe, sans savoir si le patient réactivera les virus concernés. Cela représente une charge de travail considérable, peu compatible avec les structures de thérapie cellulaire actuellement en place, plus particulièrement en France. Un des moyens de contourner cela est le développement de banques de CTL anti-EBV allogéniques mettant à disposition de tout patient des CTL préparés à partir de cellules de donneurs volontaires sains, cryoconservés et sélectionnés pour chaque patient sur la base d'une compatibilité HLA minimale et la validation par une cytotoxicité *in vitro* de l'efficacité des CTL vis-à-vis de la lignée EBV

du donneur de CSH [30, 31]. L'équipe de Haque a mené un essai de phase II multicentrique portant sur 33 patients ayant reçu une transplantation d'organe ($n = 31$) ou de CSH ($n = 2$) atteints d'EBV-PTLD résistant aux traitements conventionnels (réduction de l'immunosuppression, administration de rituximab ou mise en œuvre d'une chimiothérapie). Aucun effet secondaire n'a été noté (aucune GvH secondaire à l'injection des CTL n'a été décrite) et un taux de réponse (complète et partielle) de 64 % à cinq semaines et de 52 % à six mois post-injection a pu être observé. Les lignées de CTL ont été choisies pour leur compatibilité HLA et sélectionnées pour leur forte cytotoxicité contre les LCL-EBV du donneur et leur faible cytotoxicité contre des cellules du receveur ne présentant pas l'EBV. La charge virale EBV a diminué au-dessous d'un seuil de détection pour tous les patients qui ont répondu au traitement. Cette étude a révélé de manière significative que les meilleures réponses cliniques étaient observées avec des CTL contenant une forte proportion de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques et lorsque l'incompatibilité HLA était la plus faible avec le receveur.

L'équipe française de Vié a développé une banque de CTL anti-EBV et propose dans le cadre d'un protocole clinique qui se prolonge sur 2012 une administration préventive ou curative d'une à trois doses de 5×10^6 CTL anti-EBV/kg à 28 jours d'intervalle chez des patients séronégatifs pour l'EBV et présentant un EBV-PTLD post-greffe et une GvH de grade inférieur à II.

Outre le développement de banques de CTL antiviraux, il serait intéressant de disposer de techniques rapides qui pourraient être mises en œuvre dans une stratégie

de traitement préemptif dès que l'on a connaissance de l'augmentation de la charge virale. Nous présenterons dans la deuxième partie de cette revue les techniques développées à ce jour.

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

La troisième limite concerne la compétition antigénique survenant lors de la production de lymphocytes T cytotoxiques multi-virus. On observe que les lymphocytes T produits réagissent majoritairement vis-à-vis du CMV et de façon plus faible vis-à-vis de l'EBV et de l'ADV. Cela est probablement dû à une présentation antigénique des épitopes CMV ou EBV par les molécules HLA des CPA de plus haute affinité ou plus stable que celle des épitopes ADV ayant pour conséquence un nombre élevé de lymphocytes T circulants spécifiques du CMV comparé au faible nombre de lymphocytes T spécifiques de l'ADV circulants (1 log de moins en moyenne) [32]. Afin de s'affranchir de la compétition antigénique apportée par le CMV, Leen *et al.* ont proposé la production de CTL bi-virus (EBV et ADV) [33]. La production a été réalisée selon un procédé similaire à celui des CTL tri-virus mais en utilisant le vecteur Ad5f35. Treize patients ont bénéficié de ces injections de CTL bi-virus, dont six après une allogreffe en situation haplo-identique. Une expansion des CTL anti-EBV *in vivo* a été observée chez dix des 12 patients évaluable. Chez trois patients ayant réactivé l'EBV, la charge virale s'est négativée spontanément après une augmentation de la réponse IFN γ spécifique anti-EBV. Pour l'ADV, sur les 12 patients évaluable, une expansion de l'immunité spécifique de l'ADV n'a été observée que chez les deux patients ayant réactivé l'ADV.

Enfin, la dernière limite est relative au coût de production assez important mais à mettre en balance avec le coût élevé des molécules innovantes telles que le rituximab.

Production des lymphocytes T cytotoxiques par sélection immunomagnétique

La sélection immunomagnétique des CTL est réalisée grâce à des colonnes positionnées dans un champ magnétique (système CliniMACS, Miltenyi Biotec), en utilisant des billes magnétiques couplées à des anticorps dont les cibles peuvent être soit :

- des molécules HLA associées entre elles sous formes de tétramères et chargées avec un peptide antigénique. Les lymphocytes T spécifiques de ces couples peptides-HLA sont ainsi sélectionnés ;
- les lymphocytes T spécifiques qui sécrètent de l'IFN γ après un temps défini de stimulation par l'antigène viral ;

– les lymphocytes T spécifiques qui expriment après stimulation par l'antigène viral une molécule de co-stimulation (par exemple, CD137) ou un marqueur d'activation (par exemple, CD154) (*figure 2*).

Le très faible nombre de cellules obtenu est réinjecté au receveur immédiatement après isolement. L'expansion de ces cellules *in vivo* est générée par la stimulation liée à la charge virale.

Sélection immunomagnétique par le biais de tétramères

L'utilisation de tétramères de molécules HLA a été rapportée en 2005 pour la production de CTL CD8+ anti-peptide-CMV [34]. Une faible quantité de cellules sélectionnées ($8,6 \times 10^3$ /kg en médiane) a été injectée à neuf patients ayant réactivé le CMV dans les quatre heures suivant la sélection et les CTL CD8+ anti-CMV ont été détectés chez tous les patients dix jours après l'injection. Une activité antivirale *in vivo* a été identifiée puisque la charge virale CMV s'est négativée chez huit patients même chez ceux qui avaient présenté une réactivation CMV résistante aux médicaments antiviraux et a diminué chez un patient (*tableau 4*). Malgré des résultats très encourageants, aucune expérience n'a été publiée depuis 2005, les multimères n'étant à ce jour pas produits aux normes *good manufacturing practice* (GMP), ce qui limite leur utilisation.

Sélection immunomagnétique sur la base de la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T

Plusieurs équipes ont décrit un protocole qui permet de sélectionner par sélection immunomagnétique les cellules T CD4+ et CD8+ anti-ADV, anti-CMV et/ou anti-EBV sur la base de leur sécrétion d'IFN γ après stimulation antigénique *ex vivo* sur le CliniMACS (Miltenyi Biotec) [36-39].

En 2006, l'équipe de Feuchtinger a rapporté l'injection de lymphocytes T spécifiques anti-ADV (entre $1,2-50 \times 10^3$ /kg) à neuf patients après allogreffe de CSH [36]. Les neuf patients traités présentaient une infection systémique à ADV en échec de traitement conventionnel, sans immunité cellulaire spécifique anti-ADV détectée. Les auteurs ont montré la faisabilité de l'essai et ont rapporté la bonne tolérance de l'immunothérapie. Seul un patient, qui présentait avant l'injection des CTL anti-ADV une GvH chronique cutanée, a montré une aggravation de la GvH, résolutive sous corticoïdes. Pour cinq des six patients évaluable, l'immunothérapie adoptive a été associée à une diminution ou une disparition de la charge virale et à une expansion des lymphocytes T spécifiques après injection. Chez trois patients, les auteurs ont montré une persistance des lymphocytes T spécifiques au-delà de quatre à six mois associée à l'absence de détection de la charge virale. Chez

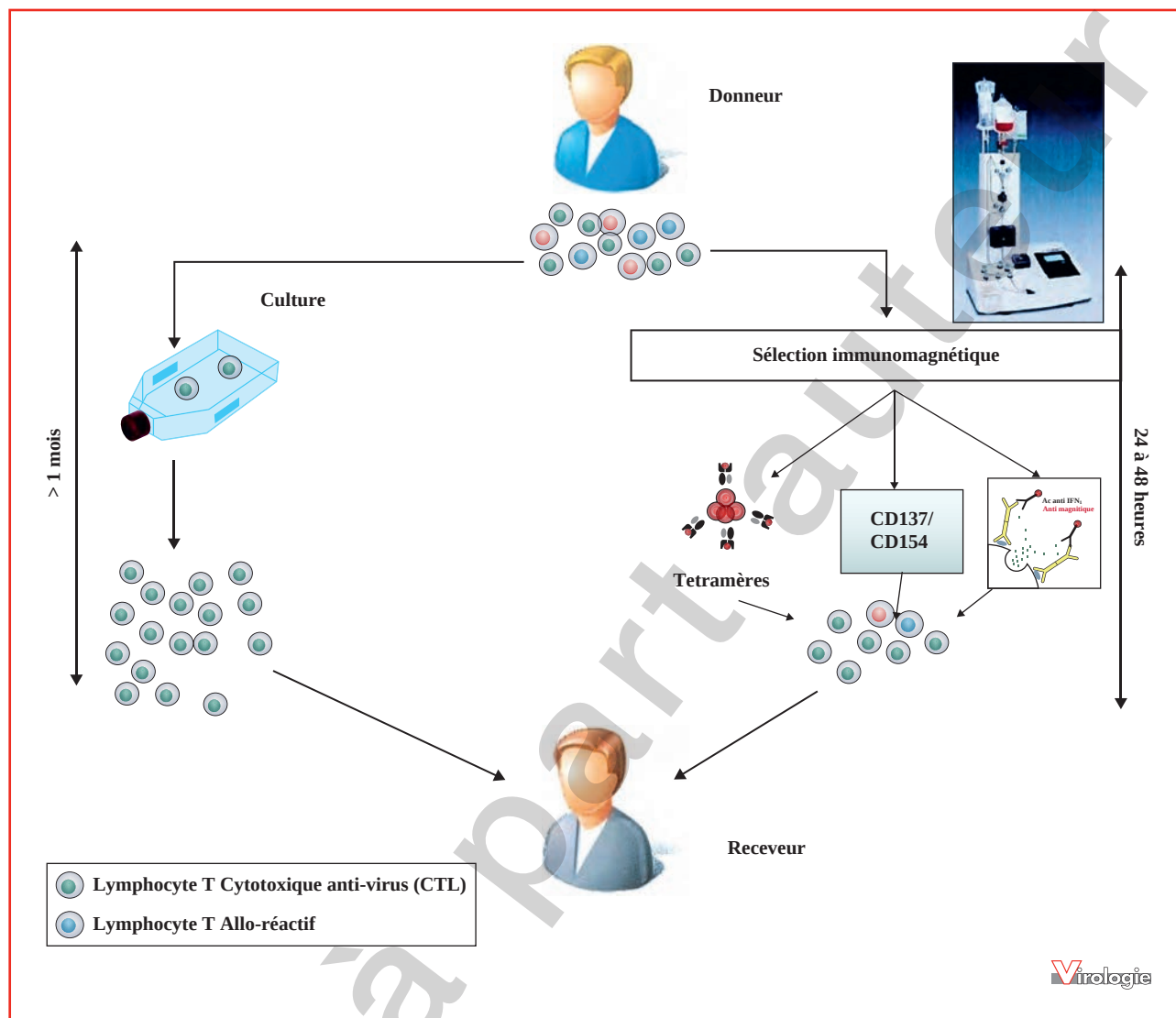


Figure 2. Méthodes d'isolement des lymphocytes T antiviraux.

trois autres patients, l'absence de persistance des lymphocytes T spécifiques a été associée à un maintien ou à une augmentation de la charge virale ADV conduisant au décès de deux patients pour adénovirose systémique, le troisième ayant rechuté de son lymphome malin non Hodgkinien. Les échecs du traitement ont été attribués à l'état clinique sévère des patients et le stade invasif de l'adénovirose. Sur cette expérience, les auteurs ont conclu qu'il était préférable de traiter les patients à haut risque de développer une adénovirose maladie à titre préemptif avant l'apparition de tout symptôme. Tous les essais cliniques que nous rapporterons ont abouti à cette conclusion.

Une expérience similaire a été menée par Mackinnon *et al.*, avec le CMV [37]. Les auteurs mentionnent la production de CTL anti-CMV sélectionnés par méthode immunomagnétique sur la base de la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T stimulés pendant 20 heures avec la protéine pp65. Les CTL anti-CMV ont été administrés à sept patients, cinq après réactivation de la charge virale et deux en prophylaxie. Une expansion des CTL anti-CMV a été observée chez tous les patients, qu'il y ait ou non une charge virale CMV détectable. Les cinq patients qui avaient réactivé le CMV ont reçu une thérapie médicamenteuse antivirale concomitante, mais de courte durée pour quatre d'entre eux.

Tableau 4. Essais cliniques utilisant des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) antiviraux sélectionnés par méthode immunomagnétique, après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

CTL	Protocole d'expansion	Cellules injectées	Patients traités	Résultats cliniques	Références
CMV	Sélection immunomagnétique	Sélection de cellules T CD8+	9 avec virémie CMV ou post-réactivation	8/9 : charge virale CMV devenue non détectable ; 1/9 : diminution de la charge virale	[34]
CMV	Culture <i>in vitro</i> /Sélection immunomagnétique	CTL polyclonaux	23 patients avec virémie (16 ont reçu des CTL cultivés <i>in vitro</i> ; 7 ont reçu des CTL-IFN γ [5 après réactivation de la charge virale et 2 en prophylactique])	8/16 : négativation de la charge virale CMV sans antiviraux 8/16 : réactivation du CMV puis négativation concomitante à l'injection de CTL 7/7 : expansion des CTL anti-CMV, qu'il y ait ou non une charge virale CMV détectable (5/7 ont reçu une thérapie médicamenteuse antivirale concomitante, mais de plus courte durée pour 4 d'entre eux)	[37]
CMV	Sélection immunomagnétique	CTL polyclonaux	18 patients avec infection ou maladie à CMV recevant des CTL anti-CMVpp65 de donneurs de CSH séropositifs pour le CMV : $n = 12$ haplo-identiques, $n = 3$ HLA identiques et $n = 1$ HLA non identiques	12 patients/16 évaluable : résolution de l'infection à CMV ou diminution significative de la charge virale CMV, expansion <i>in vivo</i> des CTL anti-CMV Aucun effet secondaire ni aucune GvH	[38]
ADV	Sélection immunomagnétique	CTL polyclonaux	9 avec une infection systémique	5/6 patients : résolution complète de l'infection ou diminution significative de la charge virale ADV	[36]
EBV	Sélection immunomagnétique	CTL polyclonaux	6 patients avec un PTLT : 3/6 à un stade précoce et 3/6 à un stade tardif	2 patients/3 en phase précoce : réponse complète (disparition de la charge virale et des signes cliniques) 3 patients/3 en phase tardive : aucune réponse	[39]

ADV : adénovirus ; EBV : virus d'Epstein-Barr ; CMV : cytomégalovirus ; IFN γ : interféron gamma ; GvH : greffon contre l'hôte.

L'équipe de Feuchtinger a récemment mené une étude sur 18 patients présentant une infection ou une maladie à CMV à qui il a administré des CTL anti-CMVpp65 à la dose de $2,13 \times 10^4$ CD3/kg, en moyenne [38]. Dans 83 % des cas, il a observé une résolution complète de l'infection à CMV ou une diminution significative de la charge virale CMV, avec en parallèle une expansion *in vivo* des CTL anti-CMV (12 patients sur 16 évaluable). De plus, aucun effet secondaire ni aucune GvH n'ont été déplorés.

Enfin, l'équipe de Moosmann a traité six patients présentant un EBV-PTLD avec des CTL anti-EBV produits par sélection immunomagnétique après stimulation des cellules avec un pool de peptides EBV [39]. Trois patients atteints d'un PTLT précoce ont présenté une réponse favorable après injection des CTL anti-EBV, avec négativation de la charge virale et disparition des symptômes et résolution du PTLT pour deux d'entre eux avec en parallèle une expansion

des lymphocytes T spécifiques. Le troisième patient, ayant une pneumonie idiopathique, est décédé à 96 jours. Trois autres patients, à une phase tardive du PTLT au moment de l'immunothérapie, sont décédés. Aucun effet indésirable ni aucune GvH n'ont été rapportés. À nouveau, les auteurs suggèrent de traiter les patients présentant un haut risque de PTLT en prophylaxie, sans attendre de développement clinique.

La même technologie a été utilisée pour générer rapidement en préclinique des CTL tri-virus, par l'équipe de Fujita [40]. Les antigènes de stimulation étaient les mêmes que ceux utilisés par cette équipe pour la génération de CTL tri-virus par culture cellulaire c'est-à-dire des lignées EBV (LCL-EBV) modifiées génétiquement avec un vecteur adénoviral chimérique Ad5f35 exprimant le transgène CMV-pp65:Ad5f35pp65. Aucun essai clinique n'a été publié pour le moment.

Depuis 2007, notre équipe s'est appliquée à développer, sur la base des travaux déjà publiés, une technique rapide de production de grade clinique de CTL anti-ADV [41]. Un pool de peptides synthétiques de 15 acides aminés se chevauchant tous les 11 acides aminés et recouvrant l'intégralité de la protéine Hexon de l'ADV5, le PepTivator-ADV5 Hexon (Miltenyi Biotec) a été comparé à la protéine Hexon de l'ADV2 produite sur lignée cancéreuse utilisée par l'équipe de Feuchtinger [36]. Nous avons montré, qu'outre le fait que le PepTivator-ADV5 Hexon présente l'avantage d'être synthétique et de grade clinique, ses capacités de stimulation ne sont que très faiblement inférieures à celles de la protéine Hexon de l'ADV2 et que, selon les donneurs, elles sont même supérieures. Les CMN de sept donneurs sains différents, dont l'immunité cellulaire anti-ADV avait été confirmée au préalable, ont été stimulées pendant six heures avec le PepTivator-ADV5 Hexon. Les cellules sécrétant de l'IFN γ ont été isolées sur le CliniMACS à l'aide du Cytokine Capture System (Miltenyi Biotec). Après sélection, un nombre moyen de cellules nucléées totales (CNT) de $1,01 \pm 0,84 \times 10^6$ a été obtenu. Une majorité des cellules T spécifiques de l'ADV étaient CD4 $^{+}$ (moyenne = $56 \pm 5,59$ %, rendement = $51 \pm 32,43$ %) et dans une moindre mesure CD8 $^{+}$ (moyenne = 42 ± 27 %, rendement = $56 \pm 39,3$ %).

Une expansion des lymphocytes T isolés (CTL) a été réalisée *in vitro* en présence d'IL2 et de cellules nourricières autologues afin de disposer de suffisamment de cellules pour réaliser les contrôles de qualité fonctionnels. À l'issue de l'expansion, la capacité des CTL amplifiés à sécréter de l'IFN γ et à proliférer après re-stimulation par l'antigène de stimulation a été confirmée. Une cytotoxicité élevée, à un rapport de 10:1, vis-à-vis des cellules cibles autologues chargées avec un lysat d'ADV2 ou d'ADV5 ou avec le PepTivator-ADV5 Hexon a été mise en évidence alors qu'une cytotoxicité négligeable a été observée vis-à-vis des cellules cibles non chargées ou chargées avec un peptide non relevant (PepTivator-CMV pp65). Enfin, nous nous sommes assurés d'une faible toxicité de ces CTL, c'est-à-dire de leur faible alloréactivité résiduelle : une diminution de 1,27 log de l'alloréactivité des CTL vis-à-vis de CMN de donneurs sains HLA différents a été observée, comparée à celle des CMN avant sélection.

Les limites de ces approches

Si les résultats cliniques rapportés précédemment avec la sélection immunomagnétique soit par le biais des tétramères soit basée sur la sécrétion d'IFN γ par les cellules stimulées sont extrêmement prometteurs, ces approches rencontrent des limites.

En effet, la sélection immunomagnétique par le biais des tétramères reste restreinte aux patients qui expriment des

allèles HLA pour lesquels des peptides viraux sont disponibles et pour lesquels la fréquence circulante de cellules T réactives dans le sang périphérique est suffisamment élevée. Ainsi, les infections associées aux virus (tel que l'ADV), où la fréquence circulante de cellules T réactives est plus faible que pour le CMV, ne seront pas concernées par ce type d'approche [35]. Par ailleurs, seul un clone T spécifique du peptide présenté dans le contexte HLA du soi peut être sélectionné, ce qui restreint considérablement le nombre de lymphocytes T et la diversité des lymphocytes T dans la fraction sélectionnée. Enfin, les lymphocytes T sélectionnés par cette approche n'ont pas fait la preuve de leur efficacité, contrairement à ceux sélectionnés sur la base de la sécrétion d'IFN γ .

Concernant la sélection immunomagnétique sur la base de la sécrétion d'IFN γ , les limites apparaissent du fait :

- de l'absence de disponibilité d'antigènes de grade clinique pour tous les agents viraux ;
 - de la cinétique de la sécrétion d'IFN γ différente selon l'antigène viral utilisé ;
 - de la compétition qui s'exerce entre les différents antigènes viraux lors de la production de CTL multipathogènes.
- On assiste actuellement à une disponibilité croissante d'antigènes de grade clinique pour plusieurs agents viraux, ce qui rend la production de CTL monospécifiques possible vis-à-vis de nombreux virus. S'agissant de la cinétique de sécrétion d'IFN γ différente selon l'antigène viral utilisé, trois travaux précliniques récents ont montré qu'il était possible de sélectionner par méthode immunomagnétique des CTL multipathogènes en ciblant un marqueur de co-stimulation ou un marqueur d'activation dont la cinétique d'apparition est indépendante de l'antigène de stimulation.

Les expériences précliniques

Zandvliet *et al.* ont rapporté la sélection avec succès de CTL anti-quadri-virus (CMV, EBV, ADV et influenza [FLU]) sur la base de l'expression du récepteur CD137, la cinétique d'expression de ce marqueur de co-stimulation étant optimale après 48 heures, quel que soit l'antigène de stimulation utilisé contrairement à la cinétique de la sécrétion d'IFN γ [42].

Parallèlement, Khanna *et al.* ont proposé la génération de CTL multipathogènes (ADV, EBV, CMV, *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*) sur la base de l'expression du CD154 (CD40 ligand, exprimé après activation des lymphocytes T) [43]. Dans ce dernier travail, les auteurs préconisent une expansion des CTL *in vitro* afin d'observer la présence de CTL vis-à-vis de l'*A. fumigatus* dont la fréquence est indétectable après sélection. On peut noter que c'est la première publication qui isole avec succès des CTL anti-*Aspergillus* en utilisant un antigène peptidique utilisable en clinique (un travail préclinique avait été rapporté par

Tramsen *et al.* utilisant un extrait cellulaire infecté par la souche d'*A. fumigatus* CBS 144-89 après inactivation) [44]. Plus récemment, Lugthart *et al.* sont parvenus à générer des CTL tri-virus (ADV, EBV et CMV) sur la base de l'expression du CD25 (chaîne α du récepteur de l'IL2, exprimé après activation des lymphocytes T) après trois jours de stimulation avec des pools de peptides [45]. Les auteurs mentionnent que cette stratégie permet également l'enrichissement en cellules T régulatrices qui pourraient avoir un effet bénéfique sur la GvH.

La troisième limite de ces techniques qui est la compétition qui s'exerce entre les différents antigènes viraux lors de la production de CTL multipathogènes n'est à ce jour pas résolue. En effet, le choix d'une cible telle que le CD154 ou le CD25 ne permet toutefois pas de s'en affranchir et les auteurs observent la prédominance de CTL d'une spécificité donnée aux dépens des autres.

Conclusions et perspectives

L'immunothérapie adoptive, avec le développement de techniques rapides et de grade clinique, fait maintenant partie des alternatives thérapeutiques des infections post-greffes. Les effets secondaires allogéniques tant redoutés ne semblent pas être fréquents ni graves [46].

Toutefois, si l'approche est séduisante, son efficacité n'est pas toujours constante. Pour améliorer l'efficacité, tous les essais cliniques mentionnent le fait de mettre cette thérapeutique en œuvre précocement, alors que la charge virale n'est pas trop élevée chez le patient (le seuil restant encore à définir), et que les signes cliniques ne sont pas encore observés. Par ailleurs, la production de CTL à partir des DLI suppose que le donneur présente une immunité vis-à-vis de l'(ou des) agent(s) infectieux, bien qu'une équipe soit parvenue à produire des CTL anti-CMV à partir de donneurs séronégatifs pour le CMV [47]. Enfin, l'interaction étroite entre les infections à *Herpesviridae* et la survenue d'une GvH conduit souvent à ce que les patients candidats à une immunothérapie anti-infectieuse soient simultanément traités par immunosuppresseurs. Bien que la vulnérabilité des CTL antiviraux aux différents immunosuppresseurs n'ait pas été décrite, il est raisonnable de penser que ces derniers limitent la persistance et l'efficacité des CTL administrés *in vivo*. Quelques équipes se sont penchées sur le transfert d'un gène de résistance aux immunosuppresseurs de la famille des inhibiteurs de la calcineurine dans les CTL antiviraux [48, 49]. Toutefois, la GvH est généralement traitée par une association d'immunosuppresseurs et de mécanisme d'action différents. Ces travaux prometteurs devront être déclinés aux différentes familles d'immunosuppresseurs [50].

Conflits d'intérêts : aucun.

Références

1. Loberiza R, Serna DS, Horowitz MM, Rizzo JD. Transplant centre characteristics and clinical outcomes after hematopoietic stem cell transplantation: what do we know? *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 417-21.
2. Annels NE, Kalpoe JS, Bredius RG, *et al.* Management of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation after allogeneic stem cell transplantation by simultaneous analysis of EBV DNA load and EBV-specific T cell reconstitution. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1743-8.
3. Guérin-El Khourouj V, Dalle JH, Pédrón B, *et al.* Quantitative and qualitative CD4 T cell immune responses related to adenovirus DNAemia in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 476-85.
4. D'Aveni M, Aïssi-Rothé L, Venard V, *et al.* The clinical value of concomitant Epstein Barr virus (EBV)-DNA load and specific immune reconstitution monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol* 2011; 24: 224-32.
5. Feuchtinger T, Lucke J, Hamprecht K, *et al.* Detection of adenovirus-specific T cells in children with adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2005; 128: 503-9.
6. Papadopoulos B, Ladanyi M, Emanuel D, *et al.* Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994; 330: 1185-91.
7. Bordigoni P, Carret AS, Venard V, Witz F, Le Faou A. Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1290-7.
8. André-Schmutz I, Le Deist F, Hache-Bey S, *et al.* Donor T lymphocyte infusion following *ex vivo* depletion of donor anti-host reactivity by a specific anti-interleukin-2 receptor P55 chain immunotoxin. *Transplant Proc* 2002; 34: 2927-8.
9. Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Huls H, *et al.* Adoptive immunotherapy with allodepleted donor T-cells improves immune reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. *Blood* 2006; 108: 1797-808.
10. Heslop HE, Ng CY, Li C, *et al.* Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med* 1996; 2: 551-5.
11. Rooney M, Smith CA, Ng CY, *et al.* Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 1998; 92: 1549-55.
12. Gustafsson A, Levitsky V, Zou JZ, *et al.* Epstein-Barr virus (EBV) load in bone marrow transplant recipients at risk to develop posttransplant lymphoproliferative disease: prophylactic infusion of EBV-specific cytotoxic T cells. *Blood* 2000; 95: 807-14.
13. Comoli P, Maccario R, Locatelli F, *et al.* Treatment of EBV-related post-renal transplant lymphoproliferative disease with a tailored regimen including EBV-specific T cells. *Am J Transplant* 2005; 5: 1415-22.
14. Kuehnle I, Huls MH, Liu Z, *et al.* CD20 monoclonal antibody (rituximab) for therapy of Epstein-Barr virus lymphoma after hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2000; 95: 1502-5.
15. Imashuku S, Goto T, Matsumura T, *et al.* Unsuccessful CTL transfusion in a case of post-BMT Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorder (EBV-LPD). *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 337-40.
16. 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: 925-35.
17. Gottschalk S, Ng CY, Perez M, *et al.* An Epstein-Barr virus deletion mutant associated with fatal lymphoproliferative disease unresponsive to therapy with virus-specific CTLs. *Blood* 2001; 97: 835-43.

18. Leen AM, Tripic T, Rooney CM. Challenges of T cell therapies for virus-associated diseases after hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10: 337-51.
19. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, *et al.* Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 1995; 33: 1038-44.
20. Einsele H, Roosnek E, Rufer N, *et al.* Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 2002; 99: 3916-22.
21. Einsele H, Rauser G, Grigoleit U, *et al.* Induction of CMV-specific T-cell lines using Ag-presenting cells pulsed with CMV protein or peptide. *Cytotherapy* 2002; 4: 49-54.
22. Peggs K, Verfuert S, Mackinnon S. Induction of cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses using dendritic cells pulsed with CMV antigen: a novel culture system free of live CMV virions. *Blood* 2001; 97: 994-1000.
23. Peggs K, Verfuert S, Pizzey A, *et al.* Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* 2003; 362: 1375-7.
24. Micklethwaite K, Hansen A, Foster A, *et al.* Ex vivo expansion and prophylactic infusion of CMV-pp65 peptide-specific cytotoxic T-lymphocytes following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 707-14.
25. Micklethwaite KP, Clancy L, Sandher U, *et al.* Prophylactic infusion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes stimulated with Ad5f35pp65 gene-modified dendritic cells after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2008; 112: 3974-81.
26. Bao L, Cowan MJ, Dunham K, *et al.* Adoptive immunotherapy with CMV-specific cytotoxic T lymphocytes for stem cell transplant patients with refractory CMV infections. *J Immunother* 2012; 35: 293-8.
27. Leen M, Myers GD, Sili U, *et al.* Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med* 2006; 12: 1160-6.
28. Hanley PJ, Shaffer DR, Cruz CR, *et al.* Expansion of T cells targeting multiple antigens of cytomegalovirus. Epstein-Barr virus and adenovirus to provide broad antiviral specificity after stem cell transplantation. *Cytotherapy* 2011; 13: 976-86.
29. Cruz CR, Hanley PJ, Liu H, *et al.* Adverse events following infusion of T cells for adoptive immunotherapy: a 10-year experience. *Cytotherapy* 2010; 12: 743-9.
30. Haque T, Wilkie GM, Taylor C, *et al.* Treatment of Epstein-Barr-virus-positive post-transplantation lymphoproliferative disease with partly HLA-matched allogeneic cytotoxic T cells. *Lancet* 2002; 360: 436-42.
31. Haque T, Wilkie GM, Jones MM, *et al.* Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* 2007; 110: 1123-31.
32. Kedl RM, Rees WA, Hildeman DA, *et al.* T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J Exp Med* 2000; 192: 1105-13.
33. Leen M, Christin A, Myers GD, *et al.* Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 2009; 114: 4283-92.
34. Cobbold M, Khan N, Pourghesari B, *et al.* Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med* 2005; 202: 379-86.
35. Leen M, Heslop HE. Cytotoxic T lymphocytes as immune-therapy in haematological practice. *Br J Haematol* 2008; 143: 169-79.
36. Feuchtinger T, Matthes-Martin S, Richard C, *et al.* Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2006; 134: 64-76.
37. Mackinnon S, Thomson K, Verfuert S, Peggs K, Lowdell M. Adoptive cellular therapy for cytomegalovirus infection following allogeneic stem cell transplantation using virus-specific T cells. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 40: 63-7.
38. Feuchtinger T, Opher K, Bethge WA, *et al.* Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 2010; 116: 4360-7.
39. Moosmann A, Bigalke I, Tischer J, *et al.* Effective and long-term control of EBV PTLN after transfer of peptide-selected T cells. *Blood* 2010; 115: 2960-70.
40. Fujita Y, Leen AM, Sun J, *et al.* Exploiting cytokine secretion to rapidly produce multivirus-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother* 2008; 31: 665-74.
41. Aïssi-Rothé L, Decot V, Venard V, *et al.* Rapid generation of full clinical-grade human antiadenovirus cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother* 2010; 33: 414-24.
42. Zandvliet ML, van Liempt E, Jedema I, *et al.* Simultaneous isolation of CD8(+) and CD4(+) T cells specific for multiple viruses for broad antiviral immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *J Immunother* 2011; 34: 307-19.
43. Khanna N, Stuehler C, Conrad B, *et al.* Generation of a multipathogen-specific T-cell product for adoptive immunotherapy based on activation-dependent expression of CD154. *Blood* 2011; 118: 1121-31.
44. Tramsen L, Koehl U, Tonn T, *et al.* Clinical-scale generation of human anti-*Aspergillus* T cells for adoptive immunotherapy. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43: 13-9.
45. Lughart G, Albon SJ, Ricciardelli I, *et al.* Simultaneous generation of multivirus-specific and regulatory T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother* 2012; 35: 42-53.
46. Melenhorst JJ, Leen AM, Bollard CM, *et al.* Allogeneic virus-specific T cells with HLA alloreactivity do not produce GVHD in human subjects. *Blood* 2010; 116: 4700-2.
47. Horn B, Bao L, Dunham K, *et al.* Infusion of cytomegalovirus specific cytotoxic T lymphocytes from a sero-negative donor can facilitate resolution of infection and immune reconstitution. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28: 65-7.
48. Brewin J, Mancao C, Straathof K, *et al.* Generation of EBV-specific cytotoxic T cells that are resistant to calcineurin inhibitors for the treatment of posttransplantation lymphoproliferative disease. *Blood* 2009; 114: 4792-803.
49. De Angelis B, Dotti G, Quintarelli C, *et al.* Generation of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes resistant to the immunosuppressive drug tacrolimus (FK506). *Blood* 2009; 114: 4784-91.
50. Comoli P. Arming CTLs against immunosuppressors. *Blood* 2009; 114: 4759-60.

REVUE2

Apport des méthodes d'isolement immunomagnétique de lymphocytes T cytotoxiques dans la restauration rapide d'une immunité antivirale après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Lamia Aïssi-Rothé^a, Véronique Decot^{a,b}, Ying Ying Wang^a, Jean-François Stoltz^{a,b}, Danièle Bensoussan^{a,b,c,*}

RÉSUMÉ

Les infections virales sont associées à une morbidité et une mortalité importantes après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) du fait de la faible efficacité des traitements médicamenteux antiviraux en l'absence de reconstitution immunitaire concomitante. Une alternative thérapeutique aux antiviraux permettant de restaurer la réponse immunitaire spécifique est proposée par plusieurs équipes. L'immunothérapie adoptive consiste à transférer une immunité spécifique issue du donneur par l'administration de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) dirigés contre un ou plusieurs virus, isolés au préalable *in vitro* et éventuellement amplifiés. Les progrès réalisés, durant cette décennie, ont montré que cette approche est un atout essentiel dans la lutte contre les infections virales chez les receveurs d'allogreffes de CSH. Les techniques de production par sélection immunomagnétique permettent une meilleure réactivité et une disponibilité rapide des CTL au moment où le patient en a besoin.

Infections virales – allogreffe de cellules souches hématopoïétiques – immunothérapie adoptive – sélection immunomagnétique.

SUMMARY

Cytotoxic T lymphocyte immunomagnetic isolation methods to restore anti-viral immunity after hematopoietic stem cell transplantation

Viral infections represent one of the main causes of morbidity and mortality following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Anti-viral treatment failure may be explained by absence of specific immune reconstitution. Anti-viral immunotherapy relies on isolation of mono or multi-virus donor-derived-specific T cells with or without *in vitro* expansion. During the last ten years, such an adoptive transfer has been proved feasible, safe and helpful in specific anti-viral immune reconstitution. Today, immunomagnetic isolation methods present the advantages to be fast, and to allow a good reactivity to propose immunotherapy in case of anti-viral treatment failure.

Viral infections – hematopoietic stem cell transplantation – adoptive immunotherapy – immunomagnetic isolation.

1. Introduction

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est le traitement de référence pour de nombreux patients atteints d'hémopathies malignes, non malignes ou de déficits immunitaires primitifs. Son succès repose sur l'immunosuppression des cellules du système immunitaire du receveur par le conditionnement et sur la reconstitution immunitaire à partir des cellules souches dérivées du greffon. La mise en présence de deux systèmes immunitaires crée un contexte conflictuel à l'origine des trois complications majeures de l'allogreffe : le rejet, la réaction du greffon contre l'hôte (GvH) et la lenteur de la reconstitution immunitaire. Cette dernière, associée à l'immunosuppression engendrée par la GvH et ses traitements favorisent la survenue de certaines complications post-allogreffe parmi lesquelles les infections virales, notamment celles à *Herpes viridae* (le virus d'Epstein-Barr (EBV) et le cytomegalovirus (CMV)) et à adénovirus (ADV) qui sont responsables d'une morbidité et une mortalité importantes [1]. D'autres virus

^a Biopôle

Nancy-Université – UMR 7561 CNRS-UHP et FR 3209

Av de la Forêt-de-Haye

54511 Vandœuvre-lès-Nancy

^b Unité de thérapie cellulaire et tissus

Centre hospitalier universitaire de Nancy

Allée du Morvan

54511 Vandœuvre-lès-Nancy

^c Département de microbiologie-immunologie

Nancy-Université – Faculté de pharmacie

5, rue Albert Lebrun

54001 Nancy cedex

* Correspondance

d.bensoussan@chu-nancy.fr

article reçu le 15 novembre, accepté le 16 novembre 2011

© 2012 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

Tableau I – Virus impliqués dans les complications après allogreffes de CSH à l'exception du virus d'Epstein Barr, du cytomégalo virus et de l'adénovirus.

Virus	Famille	Incidence post-allogreffe de CSH (%)	Pathologies	Traitements	Références
HSV1/2	Herpesviridae	70-80	Lésions muco-cutanées hémorragiques	Acyclovir, Valacyclovir	Darville et al., 1998 Sandherr et al., 2005
VZV (HHV3)	Herpesviridae	34,7	Eruptions vésiculeuses douloureuses	Acyclovir, Valacyclovir, Famcyclovir	Asano-Mori et al., 2008
HHV6	Herpesviridae	48-72	Retard de sortie d'aplasie, insuffisance médullaire transitoire	Gancyclovir, Acyclovir, Cidofovir	De Pagter et al., 2008
BK virus	Papovaviridae	3,6-20	Cystites hémorragiques	Cidofovir	Corneille et al., 2011
Metapneumovirus	Paramyxoviridae	2,1	Infections respiratoires aiguës	/	Debur et al., 2010
Virus respiratoire syncytial (RSV)	Paramyxoviridae	11,6	Infections respiratoires	Ribavirin	Avetisyan et al., 2009
Parainfluenza	Paramyxoviridae	7,1	Infections respiratoires	/	Nichols et al., 2001

HSV, Herpes simplex virus ; VZV, varicelle zona virus ; HHV6, Human Herpes Virus 6 ; BK virus, polyomavirus.

présentant un risque de complication après allogreffe de CSH sont recensés dans le **(tableau I)**. Le suivi régulier des charges virales permet d'anticiper le développement d'infections virales causées par les agents les plus fréquents. Parmi les bénéfices apportés par ce suivi virologique rigoureux, peut être citée la mise en œuvre d'un traitement préemptif, c'est-à-dire un traitement à dose curative avant toute apparition de signes cliniques en lien avec l'agent infectieux détecté. Cependant, cette seule information conduit parfois à la mise en œuvre abusive de traitements antiviraux non dénués de toxicité. L'idée d'associer au suivi de la charge virale un suivi régulier de la reconstitution immunitaire spécifique se développe depuis une dizaine d'années, du fait de l'avènement de techniques rapides et sensibles de quantification de l'immunité cellulaire spécifique. Cette double approche devrait permettre de distinguer avec précision les patients nécessitant la mise en œuvre d'une thérapie anti-virale préemptive de ceux disposant de défenses immunitaires suffisantes pour maîtriser l'infection [2, 3]. À titre d'exemple, dans le cadre d'une étude de la reconstitution immunitaire spécifique vis-à-vis du virus d'Epstein-Barr après allogreffe de CSH, une technique rapide et fonctionnelle (Elispot interféron gamma: IFN γ) a été mise en place dans notre laboratoire afin de ne traiter en préemptif que les patients ne présentant aucune reconstitution immunitaire spécifique [4]. En effet, il a été rapporté que le traitement médicamenteux de certains virus s'avérait inefficace en l'absence de reconstitution immunitaire concomitante [5]. Afin de restaurer cette immunité anti-infectieuse, plusieurs stratégies d'immunothérapie adoptive ont été développées dont la plus ancienne est la réinjection de lymphocytes du donneur, aujourd'hui abandonnée du fait de son absence de spécificité (*donor lymphocyte infusion*; DLI) [6, 7]. Deux stratégies différentes d'immunothérapie adoptive ont également été envisagées : soit l'élimination des lymphocytes T alloréactifs des cellules

du donneur à réinjecter permettant de conserver intact le contingent de cellules anti-infectieuses (*déplétion alloréactive*) [8], soit la sélection des lymphocytes T anti-infectieux (CTL anti-infectieux) (**figure 1**).

Cette dernière stratégie consiste à transférer une immunité spécifique issue du donneur en administrant des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) dirigés contre un ou plusieurs virus, isolés au préalable *in vitro* et éventuellement amplifiés. Les premiers succès ont été rapportés avec une technique de culture cellulaire permettant de sélectionner les CTL par stimulations répétées avec l'antigène viral puis de les amplifier en présence de cytokines [9, 10]. Les résultats obtenus ont montré que cette approche est un atout essentiel dans la lutte contre les infections virales chez les receveurs d'allogreffe de CSH, en préventif comme en curatif. De plus, aucun effet secondaire

majeur, ni survenue de GvH n'ont été déplorés chez les patients recevant ces CTL, et ce même lorsque les contrôles *in vitro* indiquaient la possibilité de la survenue d'une réaction allogénique [11, 12]. Malgré les résultats encourageants, cette technique de sélection souffre de plusieurs limites dont la plus importante est que la production des CTL doit être anticipée pour tous les patients au moment de l'allogreffe [13]. Or, la méthode de production est relativement contraignante et longue, restreignant cette activité à des laboratoires très spécialisés.

Il est très vite apparu indispensable de disposer d'une meilleure réactivité et d'une disponibilité rapide des CTL au moment où le patient en avait besoin. Les techniques immunomagnétiques ont permis de répondre à ce cahier des charges. L'objectif de cette revue est de présenter les différentes techniques immunomagnétiques d'obtention de CTL antivirales qui sont, pour la plupart, actuellement évaluées dans le cadre de protocoles cliniques.

2. Techniques immunomagnétiques appliquées à l'immunothérapie spécifique anti-infectieuse

2.1. Principe de l'isolement des CTL par sélection immunomagnétique

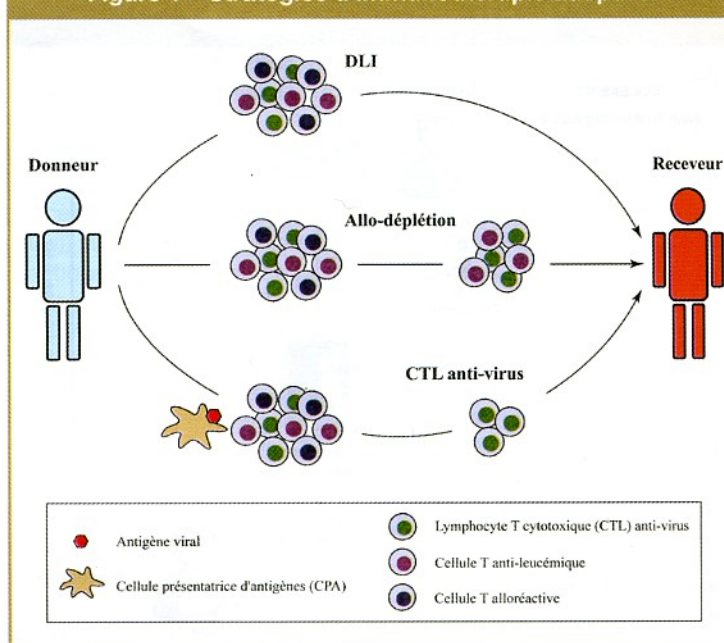
La sélection immunomagnétique est aujourd'hui couramment utilisée pour isoler une population cellulaire d'intérêt à l'échelle de la recherche ou à l'échelle clinique. Si à l'échelle de la recherche, différents systèmes commercialisés peuvent être employés, à l'échelle clinique un seul système possède le marquage CE fonctionnant avec des réactifs produits en condition GMP (*good manufacturing practice*: bonnes pratiques de production) et autorisés par

les autorités régulatrices : le système CliniMACS (Miltenyi Biotec). Ce système permet de sélectionner, grâce à des billes immunomagnétiques, des cellules exprimant un marqueur spécifique sans ou après activation préalable. Grâce à quelques adaptations du protocole, il permet également de sélectionner des cellules qui après activation sécrètent une cytokine donnée (par exemple l'IFN γ).

Tous les travaux précliniques et cliniques publiés à ce jour sur la production de CTL anti-viraux peuvent être regroupés en 3 grandes catégories (*figure 2*) :

- utilisation de tétramères (biotinylés) HLA-restreints présentant un peptide viral et permettant de cibler les lymphocytes T spécifiques. Un anticorps anti-biotine couplé à une bille immunomagnétique permet de sélectionner les cellules d'intérêt ;
- sélection des lymphocytes T qui sécrètent de l'IFN γ en réponse à une stimulation par un antigène viral grâce au Cytokine Capture System (Miltenyi Biotec). Un anticorps à double valence : anti-CD45 permettant de cibler les leucocytes et anti-IFN γ est utilisé dans un premier temps. Une variation de température permet d'observer la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T activés, qui se fixe sur la seconde valence de l'anticorps. Après 45 minutes, la réaction est arrêtée par une nouvelle variation de température et les cellules d'intérêt sont ciblées par un second anticorps anti-IFN γ couplé à une bille immunomagnétique. Ce protocole ne permet pas d'obtenir une population pure de cellules sécrétant de l'IFN γ mais une population enrichie (on ne parle pas de « pureté » mais d'« enrichissement ») ;
- sélection des lymphocytes exprimant après stimulation par l'antigène viral soit un *marqueur de co-stimulation* (par exemple CD137), soit un *marqueur d'activation* (par exemple CD154)

Figure 1 – Stratégies d'immunothérapie adoptive.



2.2. Production des CTL à l'aide de tétramères

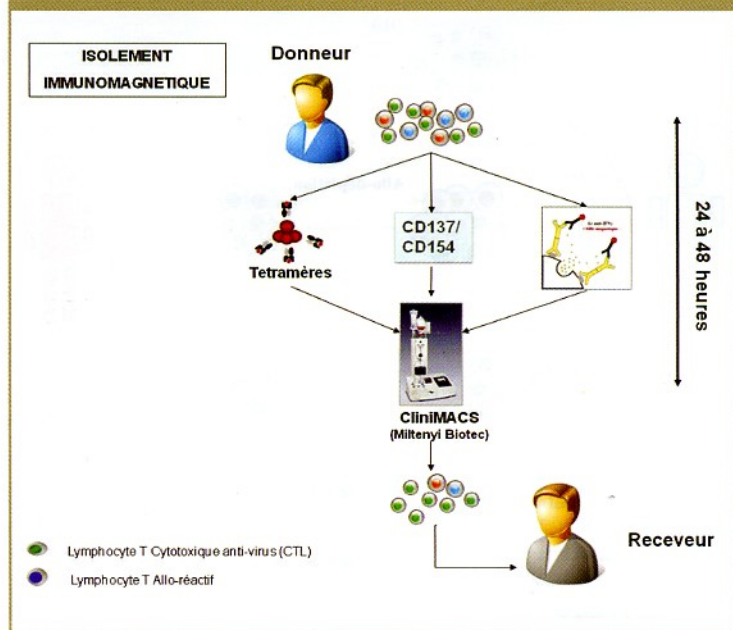
L'utilisation de tétramères HLA-restreints a été rapportée en 2005 pour la production de CTL CD8⁺ anti-peptide-CMV [14] (*tableau II*). Une faible quantité de cellules sélectionnées ($8,6 \times 10^3/\text{kg}$ en médiane) a été injectée à neuf patients ayant réactivé le CMV, dans les 4 heures suivant la sélection et, les CTL CD8⁺ anti-CMV ont été détectés

Tableau II – Essais cliniques utilisant, après allogreffe de CSH, des CTL spécifiques antiviraux sélectionnés par méthode immunomagnétique.

CTL	Protocole d'expansion	Cellules injectées	Patients traités	Résultats cliniques	Références
CMV	Sélection tétramères	Sélection de cellules T CD8 ⁺	9 avec virémie ou post-réactivation	9 patients ont diminué la charge virale ; 8 patients sans infection	[9]
CMV	Sélection IFN γ	CTL polyclonal	23 patients avec virémie (16 ont reçu des CTL cultivés in vitro ; 7 ont reçu des CTL-IFN γ (5 après réactivation de la charge virale et 2 en prophylactique))	8/16 : suppression du CMV sans antiviraux	[12]
CMV	Sélection IFN γ	CTL polyclonal	18 patients recevant des CTL anti-CMVpp65 de donneurs de CSH séropositifs pour le CMV : n = 12 haploidentiques, n = 3 HLA identiques et n = 1 HLA non-identique.	8/16 : réactivation du CMV et suppression concomitante à l'injection de CTL	[13]
ADV	Sélection IFN γ	Sélection polyclonal de cellules T	9 avec une infection systémique	7/7 : expansion des CTL anti-CMV, qu'il y ait ou non une charge virale CMV détectable (5/7 ont reçu une thérapie médicamenteuse anti-virale concomitante, mais de plus courte durée pour 4 d'entre eux)	[11]
EBV	Sélection IFN γ	CTL polyclonal	6 patients avec un PTLN	12 patients/16 évaluable : résolution de l'infection à CMV ou diminution significative de la charge virale CMV, expansion in vivo des CTL anti-CMV et aucun effet secondaire ni aucune GvH.	[14]

CMV, cytomégalovirus ; ADV, adénovirus ; EBV, virus d'Epstein Barr ; CTL, lymphocytes T cytotoxiques ; IFN γ , interféron gamma ; GvH, réaction du greffon contre l'hôte ; PTLN, post-transplant lymphoproliferative disease : syndrome lymphoprolifératif post-transplantation.

Figure 2 – Sélection immunomagnétique de CTL antiviraux spécifiques.



chez tous les patients 10 jours après l'injection. Une activité antivirale *in vivo* a été identifiée puisque la charge virale CMV s'est négativée chez tous les patients même chez ceux qui avaient présenté une réactivation CMV résistante aux médicaments antiviraux.

Bien que les résultats soient très prometteurs, ils n'ont à ce jour pas été reproduits en raison des contraintes réglementaires qui ont été appliquées aux laboratoires quant à l'utilisation de réactifs cliniques. Jusqu'à présent, les multimères n'ont pas été produits aux normes GMP, ce qui limite leur utilisation. Cette approche est également restreinte aux patients qui expriment des allèles HLA pour lesquels des peptides viraux sont disponibles et pour lesquels la fréquence circulante de cellules T réactives dans le sang périphérique est détectable par marquage de multimères. Ainsi, les infections associées aux virus (tel que l'ADV) où la fréquence circulante de cellules T réactives est plus faible que pour le CMV, ne seront pas concernées par ce type d'approche [15].

2.3. Production des CTL basée sur la sécrétion d'IFN γ par les cellules stimulées

Plusieurs équipes ont décrit un protocole qui permet de sélectionner par technique immunomagnétique, les cellules T CD4+ et CD8+ anti-ADV, anti-CMV et/ou anti-EBV sur la base de leur sécrétion d'IFN γ après stimulation antigénique *ex vivo* sur le ClinIMACS (Milenyi Biotec) [16-19] (**tableau II**).

L'équipe de Feuchtinger a publié une étude qui consistait à injecter des lymphocytes T spécifiques anti-adénovirus (entre $1,2-50 \times 10^3/\text{kg}$) à 9 patients après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques [16]. Les 9 patients traités présentaient une infection systémique à adénovirus en échec de traitement conventionnel, sans immunité cellulaire spécifique anti-adénovirus détectée.

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

Pour 5 des 6 patients évaluable, l'immunothérapie adoptive a été associée à une diminution ou une disparition de la charge virale et à une expansion des lymphocytes T spécifiques après injection. Chez 3 patients, les auteurs ont montré une persistance des lymphocytes T spécifiques au-delà de 4 à 6 mois associée à l'absence de détection de la charge virale. Chez 3 autres patients, l'absence de persistance des lymphocytes T spécifiques a été associée à un maintien ou à une augmentation de la charge virale ADV. Parmi les 3 autres patients, 2 sont décédés pendant l'étude d'une adénovirose systémique, le dernier a rechuté de son lymphome malin non hodgkinien.

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

Une expérience similaire a été menée par Mackinnon, *et al.* avec le CMV [17]. Les auteurs mentionnent la production de CTL anti-CMV sélectionnés sur la base de la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T stimulés pendant 20 heures avec la protéine pp65. Les CTL anti-CMV ont été administrés à 7 patients, 5 après réactivation de la charge virale et 2 en prophylactique. Une expansion des CTL anti-CMV a été retrouvée chez tous les patients, qu'il y ait ou non une charge virale CMV détectable. Les 5 patients qui avaient réactivé le CMV ont reçu une thérapie médicamenteuse anti-virale concomitante, mais de plus courte durée pour 4 d'entre eux.

L'équipe de Feuchtinger a également mené une étude sur 18 patients présentant une infection ou une maladie à CMV et ayant reçu des CTL anti-CMVpp65 à la dose de $2,13 \times 10^4$ CD3/kg, en moyenne [18]. Dans 83 % des cas, une résolution complète de l'infection à CMV ou une diminution significative de la charge virale CMV ont été observées, associées à une expansion *in vivo* des CTL anti-CMV (12 patients/16 évaluable). De plus, aucun effet secondaire ni aucune GvH n'ont été mis en évidence.

Récemment, l'équipe de Kolb a rapporté le traitement de 6 patients présentant un syndrome lymphoprolifératif induit par l'EBV (EBV-PTLD) avec des CTL anti-EBV produits par technique immunomagnétique après stimulation des cellules avec un pool de peptides EBV [19]. Deux patients atteints d'un EBV-PTLD précoce ont présenté une réponse favorable après injection des CTL anti-EBV, avec résolution de l'EBV-PTLD. Trois autres patients qui étaient dans une phase tardive de l'EBV-PTLD au moment de l'immunothérapie sont décédés. Pour les 3 patients évaluable, l'immunothérapie adoptive a été associée à une négativation de la charge virale avec disparition des

symptômes cliniques. De plus, ils ont noté une expansion des lymphocytes T spécifiques après injection chez deux patients. Aucun effet indésirable ni GVH n'ont été rapportés. Le 3^e patient présentant une pneumonie idiopathique est décédé à 96 jours. Les auteurs suggèrent de traiter précocement les patients présentant un haut risque d'EBV-PTLD, sans attendre que ce dernier ne se développe cliniquement.

La même technologie a été utilisée pour générer rapidement à l'échelle recherche des CTL tri-virus, par l'équipe de Brenner [20]. Les antigènes de stimulation étaient les mêmes que ceux utilisés par cette équipe pour la génération de CTL tri-virus par culture cellulaire c'est-à-dire des lignées EBV (LCL-EBV) modifiées génétiquement avec un vecteur adénoviral chimérique Ad5f35 exprimant le transgène CMV-pp65 : Ad5f35pp65. Aucun essai clinique n'a été publié pour le moment [21].

Sur la base des travaux publiés ces dernières années par l'équipe de Feuchtinger, nous avons également développé une technique rapide de production de grade clinique de CTL anti-ADV [22]. Nous avons choisi comme antigène de stimulation le Pepivator-ADV5 Hexon (Miltenyi Biotec), un pool de peptides synthétiques de 15 acides aminés se chevauchant tous les 11 acides aminés et recouvrant l'intégralité de la protéine Hexon de l'ADV 5. Les PBMC de sept donneurs sains différents, dont l'immunité cellulaire anti-ADV avait été confirmée au préalable, ont été obtenus après consentement (en moyenne : $0,2-1,1 \times 10^6$). Les PBMC ont été stimulés pendant 6 heures avec le PepTivator-ADV5 Hexon. Les cellules sécrétant de l'IFN γ ont été isolées sur le ClinMACS à l'aide du Cytokine Capture System (Miltenyi Biotec). Après sélection, un nombre moyen de cellules nucléées totales (CNT) de $1,01 \pm 0,84 \times 10^6$ a été obtenu. Les cellules T spécifiques de l'ADV étaient majoritairement CD4⁺ (enrichissement : 56 % $\pm$ 5,59) mais aussi CD8⁺ (enrichissement : 42 % $\pm$ 27 %).

Les lymphocytes T isolés (CTL) ont été cultivés en présence d'IL2 et de cellules nourricières autologues afin de pouvoir réaliser les contrôles qualité fonctionnels. La capacité des CTL amplifiés à sécréter de l'IFN γ et à proliférer après re-stimulation par le PepTivator-ADV5 Hexon a été confirmée. Une cytotoxicité élevée, à un rapport de 10:1, vis-à-vis des cellules cibles autologues chargées avec un lysat d'ADV2 ou d'ADV5 ou avec le PepTivator-ADV5 Hexon, a été mise en évidence alors qu'une cytotoxicité très faible a été observée vis-à-vis des cellules cibles non chargées ou chargée avec un peptide non relevant (PepTivator-CMV pp65). Enfin, nous avons observé une diminution de 1,27 log de l'alloactivité des CTL vis-à-vis de PBMC de donneurs sains HLA différents, comparée à celle des PBMC avant sélection.

2.4. Nouvelles perspectives immunomagnétiques de production de CTL

Si les résultats cliniques rapportés précédemment avec la technique de sélection immunomagnétique basée sur la sécrétion d'IFN γ par les cellules stimulées sont très encourageants, cette technique rencontre des limites du fait : 1. de l'absence de disponibilité d'antigènes de grade clinique pour tous les agents viraux, 2. de la cinétique de sécrétion d'IFN γ différente selon l'antigène viral utilisé,

3. de la compétition qui s'exerce entre les différents antigènes viraux lors de la production de CTL multi-pathogènes. S'agissant de la cinétique de sécrétion d'IFN γ différente selon l'antigène viral utilisé, deux travaux précliniques ont montré qu'il était possible de sélectionner par méthode immunomagnétique des CTL multi-pathogènes en ciblant un marqueur de co-stimulation ou un marqueur d'activation. Récemment, Zandvliet, *et al.* a rapporté la sélection avec succès de CTL anti-quadri-virus (CMV, EBV, ADV et influenza (FLU)) sur la base de l'expression du récepteur CD137, la cinétique d'expression de ce marqueur de co-stimulation étant optimale après 48 heures, quel que soit l'antigène de stimulation utilisé contrairement à la cinétique de la sécrétion d'IFN γ [23].

Parallèlement, Khanna, *et al.* a développé la génération de CTL anti-multipathogènes (ADV, EBV, CMV, *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*) sur la base de l'expression du CD154 (CD40 ligand, exprimé après activation des lymphocytes T) [24]. Dans ce dernier travail, les auteurs préconisent une expansion des CTL in vitro afin d'observer la présence de CTL vis-à-vis de l'*Aspergillus fumigatus* dont la fréquence est indétectable après sélection. On peut noter que c'est la première publication qui isole avec succès des CTL anti-aspergillus en utilisant un antigène peptidique utilisable en clinique (un travail préclinique avait été rapporté par Tramsen, *et al.* utilisant un extrait cellulaire infecté par la souche d'*Aspergillus fumigatus* CBS 144-89 après inactivation) [25]. Le choix d'une cible telle que le CD154 ne permet toutefois pas de s'affranchir de la compétition entre les antigènes qui conduit à la prédominance de CTL d'une spécificité donnée au dépend des autres. Même si tous les problèmes ne sont pas résolus, ces résultats précliniques permettent d'envisager de nouvelles perspectives thérapeutiques des infections après allogreffe de CSH et laissent espérer qu'à terme cette complication ne sera plus létale.

3. Conclusion

L'immunothérapie adoptive, avec le développement de techniques rapides et de grade clinique, fait maintenant partie des alternatives thérapeutiques des infections après allogreffes de CSH. De nombreux protocoles cliniques sont actuellement ouverts dont deux en France permettant de recourir à cette thérapeutique sans difficulté.

Toutefois, si l'approche est séduisante, son efficacité n'est pas toujours constante. En effet, les différentes expériences cliniques ont montré que cette thérapeutique devait être mise en œuvre alors que la charge virale n'était pas trop élevée chez le patient. Comme ces traitements sont encore en évaluation, le recours y est souvent trop tardif, lorsque les traitements antiviraux conventionnels ont fait la preuve de leur inefficacité. L'absence d'effet indésirable dans toutes les études cliniques présentées précédemment doit inciter à proposer la mise en œuvre précoce d'une immunothérapie adoptive par sélection immunomagnétique.

Déclaration d'intérêts : l'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Loberiza R, Serna DS, Horowitz MM, et al. Transplant centre characteristics and clinical outcomes after hematopoietic stem cell transplantation: what do we know? *Bone Marrow Transplant* 2003;31(6):417-21.
- [2] Annels NE, Kalpoe JS, Bredius RG, et al. Management of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation after allogeneic stem cell transplantation by simultaneous analysis of EBV DNA load and EBV-specific T cell reconstitution. *Clin Infect Dis* 2006;42(12):1743-8.
- [3] Guérin-Ei Khourouj V, Dalle JH, Pédrón B, et al. Quantitative and qualitative CD4 T cell immune responses related to adenovirus DNAemia in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17(4):476-85.
- [4] D'Aveni M, Aïssi-Rothé L, Venard V, et al. The clinical value of concomitant Epstein Barr virus (EBV)-DNA load and specific immune reconstitution monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol* 2011;24(4):224-32.
- [5] Feuchtinger T, Lucke J, Hamprecht K, et al. Detection of adenovirus-specific T cells in children with adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2005;128(4):503-9.
- [6] Papadopoulos B, Ladanyi M, Emanuel D, et al. Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994;330(17):1185-91.
- [7] Bordigoni P, A. S. Carret, V. Venard, et al. Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2001;32(9):1290-7.
- [8] André-Schmutz I, Le Deist F, Hacein-Bey S, et al. Donor T lymphocyte infusion following ex vivo depletion of donor anti-host reactivity by a specific anti-interleukin-2 receptor P55 chain immunotoxin. *Transplant Proc* 2002;34(7):2927-8.
- [9] Heslop HE, Ng CY, Li C, et al. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med* 1996;2(5):551-5.
- [10] 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):925-35.
- [11] Cruz CR, Hanley PJ, Liu H, et al. Adverse events following infusion of T cells for adoptive immunotherapy: a 10-year experience. *Cytotherapy* 2010;12(6):743-9.
- [12] Melenhorst JJ, Leen AM, Bollard CM, et al. Allogeneic virus-specific T cells with HLA alloreactivity do not produce GVHD in human subjects. *Blood* 2010;116(22):4700-2.
- [13] Leen AM, Tripic T, and Rooney CM. Challenges of T cell therapies for virus-associated diseases after hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Biol Ther* 2010;10 (3):337-51.
- [14] Cobbold M, Khan N, Pourghesari B, et al. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med* 2005;202(3):379-86.
- [15] Leen M. and H. E. Heslop. Cytotoxic T lymphocytes as immunotherapy in haematological practice. *Br J Haematol* 2008;143(2):169-79.
- [16] 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.
- [17] Mackinnon S, Thomson K, Verfuert S, et al. Adoptive cellular therapy for cytomegalovirus infection following allogeneic stem cell transplantation using virus-specific T cells. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40(1):63-7.
- [18] Feuchtinger T, Opher K, Bethge WA, et al. Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 2010;116(20):4360-7.
- [19] Moosmann A, Bigalke I, Tischer J, et al. Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood* 2010;115(14):2960-70.
- [20] Fujita Y, Leen AM, Sun J, et al. Exploiting cytokine secretion to rapidly produce multivirus-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother* 2008;31(7):665-74.
- [21] Leen M, Myers GD, Sili U, et al. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med* 2006;12(10):1160-6.
- [22] Aïssi-Rothé L, Decot V, Venard V, et al. Rapid generation of full clinical-grade human antiadenovirus cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother* 2010;33(4):414-24.
- [23] Zandvliet ML, van Liempt E, Jedema I, et al. Simultaneous isolation of CD8(+) and CD4(+) T cells specific for multiple viruses for broad antiviral immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *J Immunother* 2011;34(3):307-19.
- [24] Khanna N, Stuehler C, Conrad B, et al. Generation of a multipathogen-specific T-cell product for adoptive immunotherapy based on activation-dependent expression of CD154. *Blood* 2011;118(4):1121-31.
- [25] Tramsen L, Koehl U, Tonn T, et al. Clinical-scale generation of human anti-Aspergillus T cells for adoptive immunotherapy. *Bone Marrow Transplant* 2009;43(1):13-9.

Partie 4 LES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES T

1. Présentation des sous-populations de lymphocytes T

Jusqu'en 2011 le compartiment des lymphocytes T était classiquement divisé en quatre sous-populations :

- Les lymphocytes T naïfs (T_N) qui sont des cellules matures qui n'ont encore jamais rencontré un antigène.
- Les cellules effectrices qui éliminent rapidement des agents pathogènes ou des tumeurs selon différentes fonctions effectrices : lymphocytes T effecteurs (T_{EFF}).
- Les cellules mémoires qui, une fois produites, peuvent être présentes dans l'organisme même en l'absence d'antigènes et qui répondent rapidement à une stimulation antigénique ultérieure : lymphocytes T à mémoire centrale (T_{CM}) et lymphocytes T à mémoire effectrice (T_{EM}) (Appay *et al.*, 2008).

L'avènement de la cytométrie en flux multicolore a permis à l'équipe de Gattinoni de mettre en évidence une autre sous-population T mémoire avec des propriétés de cellules souches dites *T souches mémoires* (T_{SCM}) (Gattinoni *et al.*, 2011; Gattinoni et Restifo, 2013).

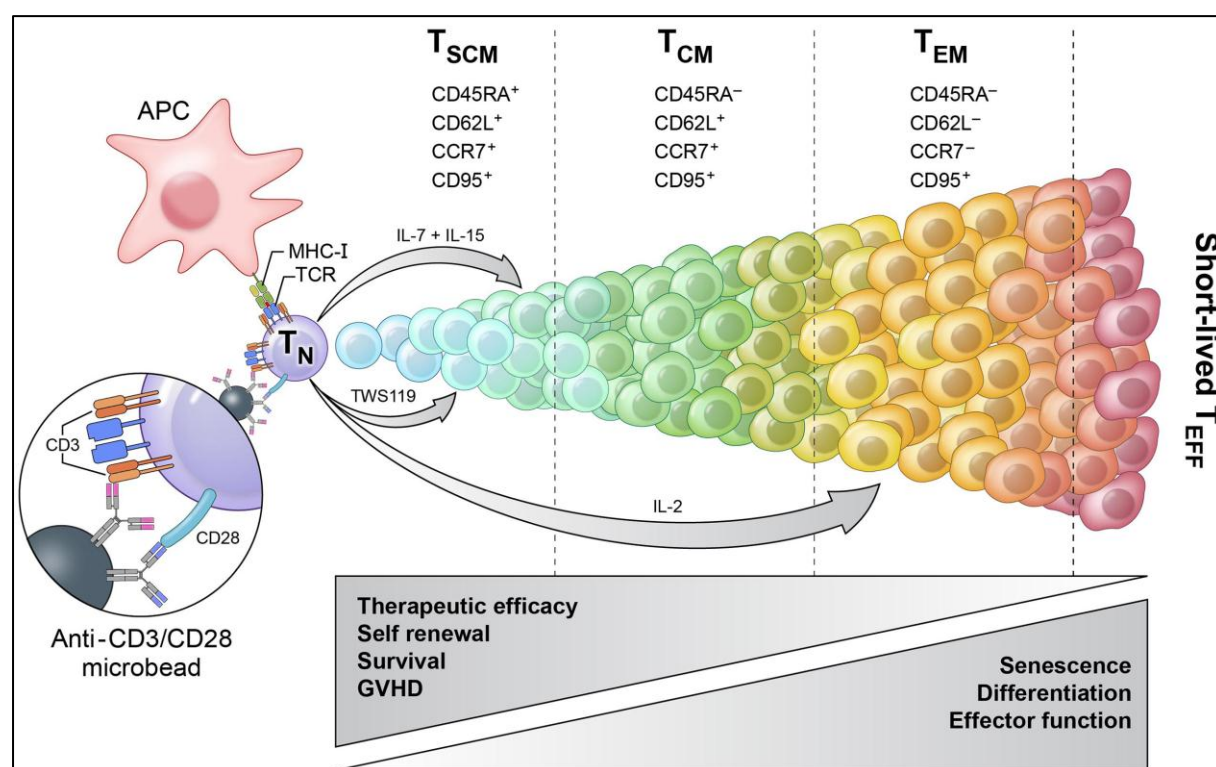


Figure 10. Sous-populations lymphocytaires T: présentation des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles (Gattinoni et Restifo, 2013).

L'hétérogénéité des sous-populations lymphocytaires T est définie par leurs marqueurs phénotypiques et notamment le CD62L et le CCR7 qui confèrent aux cellules une susceptibilité à rejoindre les organes lymphoïdes secondaires. Les cellules dans cette catégorie incluent les T_N, sous-populations la plus abondante chez le donneur sain, ainsi que deux sous-populations ayant déjà rencontré l'antigène, les T_{SCM} et les T_{CM}. Les T_N et les T_{SCM} expriment l'isoforme RA du CD45 tandis que les T_{CM} possèdent l'isoforme RO. T_N et T_{SCM} se différencient par l'expression du CD95 : les T_N sont CD95- et les T_{SCM}, tout comme les T_{CM}, sont CD95+. Outre leur localisation dans les organes lymphoïdes secondaires ces trois sous-populations ont en commun une forte capacité d'auto-renouvellement corrélée à leur capacité à produire de l'IL-2 et sont dépourvues de propriétés cytotoxiques (Klebanoff *et al.*, 2012). Pendant longtemps, la sous-population T_{CM} a été considérée comme la population mémoire «souche» capable d'auto-renouvellement tout au long de la vie de l'hôte, douée de multipotence et capable de divisions asymétriques permettant la différenciation en lymphocytes T mémoires ou effecteurs mais la mise en évidence de la population T_{SCM} chez la souris, le primate et l'homme a repositionné la population T_{CM} comme une population plus engagée dans la différenciation. Comparée à la population T_{CM}, cette nouvelle sous-population possède des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation supérieures, ainsi qu'une résistance à l'apoptose (Lugli *et al.*, 2012). En effet, il a été montré concernant la capacité d'auto-renouvellement de ces cellules que 60% de cellules issues de T_{SCM} sont de même phénotype que les T_{SCM} de départ contrairement aux T_{CM} dont seulement 30% des cellules dérivées gardent le même phénotype. Cet auto-renouvellement est assuré par une production importante d'IL-2 par ces cellules (Gattinoni *et al.*, 2011). Ces cellules, grâce à leur caractère de multipotence, sont capables de se différencier en T_{CM}, T_{EM} ou T_{EFF} après une seconde exposition à l'antigène. Comparés aux T_{CM}, ils ont une capacité de prolifération et de reconstruction rapide du système immunitaire des patients immunodéficients ainsi que des propriétés anti-tumorales plus importantes (Gattinoni *et al.*, 2011). Les T_{SCM} diffèrent des T_N, en terme de fonction, par leur capacité à acquérir rapidement des fonctions effectrices avec production d'IFN- γ et de TNF- α (Gattinoni *et al.*, 2011). Ces cellules constituent 2 à 3 % de lymphocytes CD8⁺ et CD4⁺ circulants. Cependant, elles sont de quantité moindre (inférieure à 1%) dans le sang du cordon ombilical (Gattinoni *et al.*, 2011).

Les T_{CM}, grâce à leur fonction mémoire, peuvent, lors d'une expansion ultérieure au même antigène, acquérir une fonction effectrice immédiate avec production d'IFN- γ , qui va permettre l'élimination du pathogène en activant les macrophages ou en contribuant à la dégranulation des lymphocytes T effecteurs qui contiennent des enzymes lytiques (Stemberger *et al.*, 2009). Ces cellules peuvent se

différencier en T_{EFF} , T_{EM} mais peuvent également redonner naissance aux T_{CM} étant donnée leur capacité constante d'autorenouvellement grâce à la production d'IL-2 (Stemberger *et al.*, 2009).

Les T_{EM} et T_{EFF} sont CCR7- CD62L- et ainsi se retrouvent préférentiellement au niveau des tissus périphériques. Pourvus d'une sécrétion de TNF- α et IFN- γ , ils sont capables d'avoir une cytotoxicité immédiate après une stimulation appropriée. En revanche, ils possèdent des propriétés de prolifération limitées et une durée de vie courte corrélées à leur incapacité à produire de l'IL-2 et leur faible longueur de télomères. Les T_{EFF} se différencient à partir des T_{EM} par leur réexpression de l'isoforme RA du CD45. La réexpression de l'isoforme RA est ici associée au stade de différenciation des T le plus tardif (Henson *et al.*, 2012). Il faut savoir que 90 à 95% des T_{EFF} meurent par apoptose après l'élimination de la cellule cible. Cependant, 5 à 10% des lymphocytes deviendraient des lymphocytes mémoires. Ces cellules ont une activité cytolytique immédiate avec sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α mais présentent une capacité de prolifération limitée et une inefficacité dans la régression des cancers. De ce fait, elles présentent un intérêt moindre en immunothérapie adoptive anti-tumorale (Klebanoff *et al.*, 2012).

2. La différenciation lymphocytaire

La différenciation des lymphocytes T vers l'une ou l'autre des sous-populations dépend de la qualité et de la quantité de la stimulation antigénique, de l'antigène et/ou des cytokines produites lors de la phase de contact avec l'antigène. Il a été mis en évidence que selon que les lymphocytes étaient stimulés avec l'EBV, ADV ou CMV, les phénotypes des cellules obtenues donc les sous-populations obtenues variaient (Appay *et al.*, 2008).

Bien que non élucidée et sujet à controverse, la différenciation des cellules T suivrait probablement l'un de ces deux modèles (Figure 11), compte tenu des propriétés phénotypiques, fonctionnelles, et de l'expression génique des sous-populations (Restifo et Gattinoni, 2013) :

- Modèle 'ON-OFF-ON / OFF-ON-OFF': Les lymphocytes T effecteurs peuvent générer les lymphocytes T mémoires.
- Modèle de développement : Toutes les sous-populations lymphocytaires sont issues des T_N , les T_{EFF} ne peuvent pas donner naissance à des cellules T mémoires.

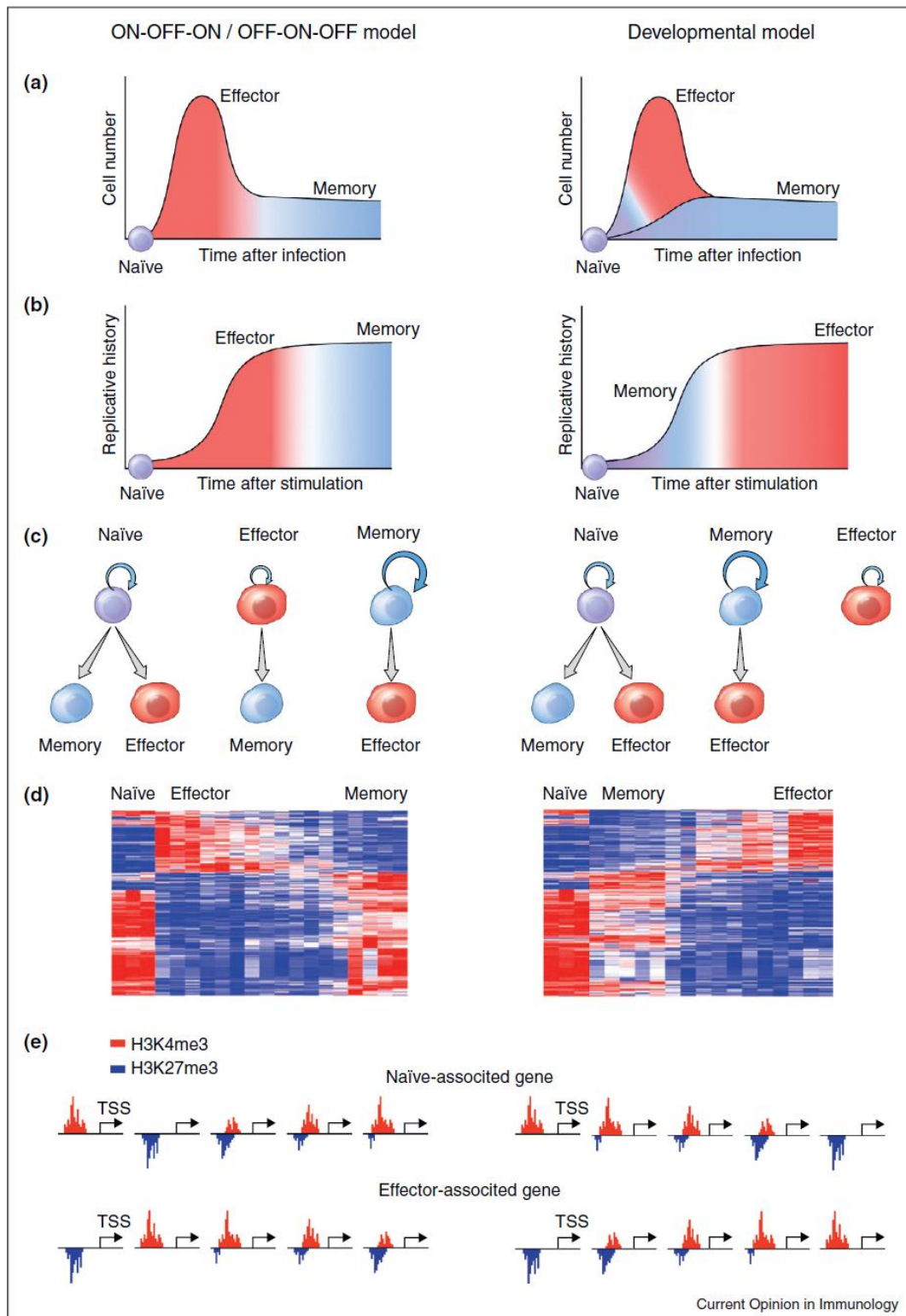


Figure 11. Deux modèles proposés de différenciation des lymphocytes T (Restifo et Gattinoni, 2013).

Une fois que les lymphocytes T mémoire apparaissent, trois modèles principaux ont été proposés pour expliquer leur différenciation (Figure 12)(Ahmed *et al.*, 2009):

- **Modèle de différenciation linéaire** : la stimulation antigénique des T_N se traduit par la génération de lymphocytes effecteurs comme T_{EFF} qui peuvent soit disparaître, soit générer des T_{EM} pouvant eux-mêmes donner naissance aux T_{CM} à $\frac{1}{2}$ vie longue et capables d'auto-renouvellement.
- **Modèle de différenciation bifurcative** : la stimulation antigénique des T_N se traduit par la génération de deux cellules différentes suite à une division asymétrique. L'une donne naissance aux lymphocytes T_{EM} et T_{EFF} et l'autre aux lymphocytes T_{CM} .
- **Modèle effecteur avec auto-renouvellement** : la stimulation antigénique des T_N se traduit par la génération des T_{CM} qui donnent naissance aux T_{EM} , eux-mêmes donnant naissance aux T_{EFF} . Les T_{CM} possèdent des propriétés d'auto-renouvellement.

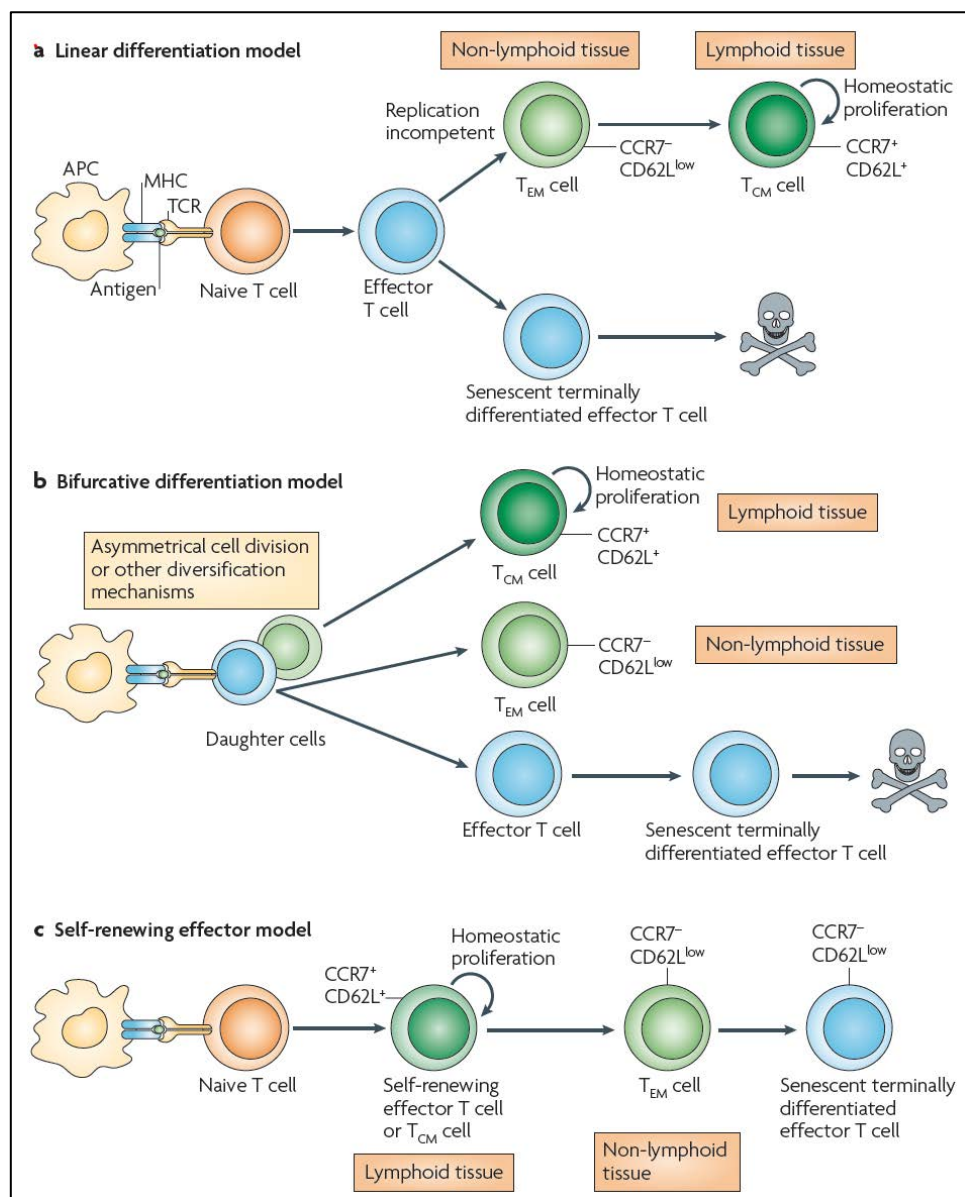


Figure 12. Modèles possibles de la différenciation des lymphocytes T mémoires (Ahmed *et al.*, 2009).

Il semble que la différenciation lymphocytaire soit très complexe. Il est probable que l'ensemble des modèles présentés co-existent dans des conditions différentes, notamment lorsque le micro-environnement diffère.

Le stade de différenciation cellulaire des lymphocytes T est primordial dans le succès de l'immunothérapie : plus les cellules sont indifférenciées plus les T_{EFF} qu'elles engendreront auront des propriétés effectrices importantes. Ainsi, les T_{EFF} issus de T_N présentent des capacités cytotoxiques plus importantes que les T_{EFF} issus des T_{CM} (Hinrichs *et al.*, 2011).

De même, on observe une corrélation linéaire entre le statut de différenciation des sous-populations mémoires et leur efficacité anti-tumorale, les moins différenciées c'est-à-dire les T_{SCM} étant les plus efficaces (Klebanoff *et al.*, 2012; Lugli *et al.*, 2013; Hinrichs *et al.*, 2009).

Outre la stimulation antigénique, l'homéostasie cytokinique jouerait un rôle capital dans la différenciation cellulaire. En effet l'IL-2 associée à une stimulation du TCR aboutit à une différenciation des T (Pipkin *et al.*, 2010). De plus, il a été récemment montré que la culture de T_N en présence d'IL-15 et d'IL-7 entraîne leur différenciation en cellules phénotypiquement proches de T_{SCM} (Cieri *et al.*, 2013).

3. Sous-populations T au sein des CTL

Les équipes qui ont travaillé sur l'immunothérapie adoptive anti-virale se sont intéressées à la composition en sous-populations T des cellules spécifiques produites. Depuis les années 2000, l'équipe Houston ont étudié la sous-population de CTL-EBV produit par technique de culture cellulaire avec marqueur CCR7, CD45RA, CD62L. Ils ont montré que la majorité des lymphocytes T CD4 et CD8 sont T_{EM} ou T_{EFF} (CCR7 et CD62L) (Heslop *et al.*, 2010). Une étude sur 20 CTLs en 2009 montre qu'il y a une moyenne de $55,16 \pm 32,03\%$ de T_{EM} (CD45RA⁻ CD62L⁻) et de $34,48 \pm 30,87\%$ de T_{CM} (CD45RA⁻ CD62L⁺) (Leen *et al.*, 2009).

Feuchtinger a le premier étudié les sous-populations T présentes dans 12 CTL anti-ADV sélectionnés par technique immunomagnétique en réalisant un marquage individuel des épitopes CD27, CCR7, CD45RA, CD62L ou CD28 (Feuchtinger *et al.*, 2008). Les cellules effectrices peu différenciées définies comme étant CD27⁺, CD28⁺, CCR7⁻, CD62L⁺ et CD45RA⁺ sont principalement retrouvées après sélection. Cependant, après culture en présence d'IL-2 et de cellules nourricières irradiées autologues, les cellules spécifiques de la protéine Hexon de l'ADV sont devenues des cellules effectrices très différenciées avec perte d'expression du CD27 et du CD62L (Feuchtinger *et al.*, 2008). En 2010, la même équipe a montré avec un marquage par cytométrie en flux multi-

couleur que les sous-populations T_{CM} ($CD45RO^+CD62L^+$) et T_{EM} ($CD45RO^+CD62L^-$) étaient majoritaires au sein des CTL anti-CMV sélectionnés par technique immunomagnétique tandis que les T_N représentaient moins de 10% des CD4 et des CD8 (Feuchtinger *et al.*, 2010). Les sous-populations de CTL spécifiques du virus d'Epstein-Barr ont été étudiées par une équipe chinoise avec les marqueurs CD27, CCR7 et CD45RA. Les cellules spécifiques de l'EBV ont été sélectionnées, par technique immunomagnétique, sur la base de l'expression du marqueur d'activation CD137 ou de sécrétion d'IFN- γ suite à une stimulation des CMN par la protéine LMP2A du virus d'Epstein-Barr. Les auteurs constatent que les cellules fraîchement isolées sont principalement composées de lymphocytes T_{CM} alors que les cellules mises en expansion sont majoritairement composées de lymphocytes T_{EM} et T_{EFF} . Ils constatent également qu'après expansion, les cellules effectrices ont une spécificité antigénique et une activité effectrice plus importante (Han *et al.*, 2009). Récemment, notre équipe a identifié pour la première fois la sous-population T_{SCM} parmi des CTL anti-EBV sélectionnés par technique immunomagnétique (Wang *et al.*, 2014). Toutes les sous-populations y compris la sous-population T_{SCM} ont été observées, avec une prédominance des T_{EM} . Une culture *in vitro* de courte durée (15 jours) en présence d'IL-2 n'a que légèrement modifié la répartition des sous-populations, avec une diminution des T_N et une augmentation des T_{SCM} .

Certes, l'efficacité de l'immunothérapie adoptive et la reconstitution immunitaire sont d'autant plus importantes que la cellule est indifférenciée, mais cette indifférenciation est aussi corrélée au risque d'apparition GvHD. En effet l'équipe de Dutt a mis en évidence que les T_N étaient responsables de GvHD chez l'homme plus sévères et plus rapides que les T mémoires (Distler *et al.*, 2011). Par ailleurs, il a été montré que les T_{SCM} étaient les seuls T mémoires capables d'induire une réaction xénogénique chez la souris preuve de leur efficacité anti-tumorale (Gattinoni *et al.*, 2011; Cieri *et al.*, 2013).

La composition du greffon en chaque sous-populations de lymphocytes T de part de leur fonctionnalité, leur durée de vie, leur capacité d'auto-renouvellement et d'alloréactivité est donc devenue un paramètre essentiel à caractériser afin d'appréhender au mieux l'efficacité de l'immunothérapie adoptive.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est devenue un traitement standard des hémopathies et des déficits immunitaires primitifs. Cependant, en l'absence de reconstitution immunitaire, les infections notamment virales constituent une complication sévère et fréquente après allogreffe de CSH. Dans ce contexte d'absence de reconstitution immunitaire, la faible efficacité et l'importante toxicité des traitements antiviraux utilisés ont conduit à envisager une alternative thérapeutique. L'immunothérapie cellulaire adoptive par injection de lymphocytes T antiviraux constitue un traitement prometteur en plein essor des infections virales.

Depuis plusieurs années, l'UTCT du CHU de Nancy s'emploie à développer l'immunothérapie adoptive antivirale par injection de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) dans le but de restaurer une immunité spécifique et efficace chez des patients allogreffés. Ainsi, depuis 2008 nous avons réussi à produire des CTL anti-ADV par une technique de sélection immunomagnétique basée sur la sécrétion de cytokine IFN- γ . Les résultats relatifs à cette étude ont été publiés en 2010 dans un journal international. Par la suite un protocole clinique multicentrique a été instauré en 2012. Actuellement 10 patients ont déjà été inclus.

C'est dans la continuité de ces travaux réalisés sur l'ADV que nous avons souhaité développer une immunothérapie adoptive anti-EBV. Dans cette optique, est au préalable nécessaire de déterminer un antigène capable d'induire une stimulation optimale des lymphocytes T spécifiques quel que soit le contexte HLA du donneur pour permettre la production de CTL anti-EBV. L'objectif à terme étant de réaliser un transfert en clinique en initiant un protocole clinique.

Cependant, l'efficacité des CTL produits par technique immunomagnétique réside dans leur formidable capacité à s'expander *in vivo* chez les patients du fait de la stimulation virale. Il nous a paru important de vérifier la composition en sous-

populations cellulaires T afin de vérifier que les sous-populations décrites avec un fort potentiel d'expansion étaient bien sélectionnées par la technique immunomagnétique. En effet, la description récente de la sous-population T souche mémoire (T_{SCM}), possédant des capacités d'auto-renouvellement et d'expansion particulièrement importantes, en a fait une sous-population critique en immunothérapie adoptive. Cela nous a conduit à définir la composition en sous-populations T du CTL produit puisque celle-ci influera sur son efficacité et sur le succès de l'injection. Nous nous sommes attachés à caractériser les sous-populations T spécifiques de l'ADV et du CMV présentes chez le donneur sain, contenues dans les CTL après sélection immunomagnétique, mais aussi dans les CTL mis en culture *in vitro* pendant plusieurs jours en présence d'IL-2 afin de déterminer l'impact éventuel de l'homéostasie cytokinique.

Un patient allogreffé est particulièrement à risque de développer de multiples infections et la possibilité de pouvoir produire des CTL dirigés contre plusieurs pathogènes constituerait un bénéfice thérapeutique et financier non négligeable. Cependant des études ont pointé du doigt la difficulté de produire des CTL multivirus, mettant en évidence une compétition antigénique.

Nous avons souhaité valider le fait que les propriétés et l'efficacité des CTL multivirus était comparable à celle des CTL mono-spécifiques correspondantes. Pour cela, nous avons sur les PBMC d'un même donneur réalisé des CTL anti-ADV, des CTL anti-EBV et des CTL bispécifiques anti-ADV et -EBV.

En conclusion, ce travail poursuit 3 objectifs principaux :

- La validation pré-clinique d'une technique efficace de production des CTL anti-EBV de grade clinique.
- La caractérisation des sous-populations des lymphocytes T contenues dans les CTL avant sélection, après sélection et après expansion *in vitro*.
- La validation pré-clinique de la production de CTL bispécifiques anti-ADV et anti-EBV comparables en termes de spécificité, efficacité et toxicité aux CTL mono-spécifiques correspondantes.

RÉSULTATS

Article 1: *Combination of Epstein -Barr virus Nuclear Antigen 1, 3 and lytic antigen BZLF1 peptide pools allows fast and efficient stimulation of EBV specific T cells for adoptive immunotherapy*

Utilisation d'une combinaison de pools peptidiques antigéniques latents et lytiques issus du virus Epstein-Barr (EBNA1, 3 et BZLF1) afin de permettre une stimulation rapide et efficace des lymphocytes T spécifiques de l'EBV dans le cadre d'une immunothérapie adoptive .

Article 1 :

Combination of Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 1, 3 and lytic antigen BZLF1 peptide pools allows fast and efficient stimulation of EBV specific T cells for adoptive immunotherapy

Yingying WANG, Lamia AÏSSI-ROTHÉ, Jean Marc VIRION, Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT, Neslihan ULAS, Sandra AUDONNET, Alexandra SALMON, Laurence CLEMENT, Véronique VENARD, Hélène JEULIN, Jean-François STOLTZ, Véronique DECOT, Danièle BENSOUSSAN.

Cytotherapy. 2014 Jan;16(1):122-34

OBJECTIF :

Dans cette étude, nous avons eu pour objectif de mettre au point la production de CTL anti-EBV de grade clinique. Pour la production de CTL anti-EBV, comparé aux CTL anti-ADV, la difficulté réside dans le fait qu'il existe plusieurs antigènes immunodominants. En d'autres termes, la réponse immunitaire varie d'un individu à l'autre selon l'antigène de stimulation. Ainsi, il est nécessaire, dans l'optique d'une production de CTL anti-EBV, de disposer d'un pool de peptides antigéniques permettant de stimuler la réponse immunitaire chez la majorité des individus. Notre objectif a donc été dans un premier temps de définir l'antigène et les temps d'activation permettant une production optimale de CTL anti-EBV, puis dans un second temps, en fonction de ces résultats, de produire des CTL anti-EBV et d'évaluer leur efficacité, spécificité et toxicité *in vitro*.

Ce travail a fait l'objet d'une collaboration avec la Plateforme Nancytomique du CHU de Nancy, avec le Laboratoire de Virologie du CHU de Nancy ainsi qu'avec le service d'Epidémiologie et d'Evaluation clinique du CHU de Nancy.

MATERIELS ET METHODES :

A l'aide des antigènes de stimulation nous avons réalisé 6 productions de CTL anti-EBV à partir des cellules mononucléées (CMN) de donneurs sains dont la réponse immunitaire cellulaire anti-EBV avait été contrôlée *in vitro* au préalable par la technique d'Elispot IFN- γ . Les CMN ont été stimulées pendant 9 heures avec les pools de peptides EBV, puis les cellules ont été récupérées et une sélection immunomagnétique des cellules sécrétant de l'IFN- γ a été réalisée avec le kit clinique Cytokine Capture System sur colonne MACS (Miltenyi Biotec). Après la sélection, nous avons analysé par cytométrie en flux les cellules isolées puis, nous les avons mises en culture en présence d'IL-2 et de cellules nourricières autologues (la fraction négative) afin de les amplifier pour en obtenir un nombre suffisant permettant d'effectuer des contrôles fonctionnels : le dosage des cytokines intra-cellulaires (ICC), l'Elispot IFN- γ , le test de prolifération lymphocytaire (TTL) après incubation avec l'antigène de stimulation, la cytotoxicité et l'étude de l'alloréactivité par culture mixte lymphocytaire.

RESULTATS :

Notre travail s'est en premier lieu centré sur la recherche d'un antigène de stimulation qui soit le plus performant possible et qui soit présenté dans la plus large variété de typages HLA. Nous avons, tout d'abord, réalisé un Elispot IFN- γ en stimulant des CMN décongelées de 4 donneurs sains avec les LCL autologues et les 3 pools de peptides de grade clinique présents sur le marché : les PepTivators : PepT-LMP2A, PepT-EBNA1 et PepT-BZLF1 (Miltenyi Biotec) séparément ou simultanément. Nous avons obtenu une sécrétion d'IFN- γ élevée de 2101 ± 911 SFCs/ 10^6 PBMC après stimulation des CMN avec les LCL et une très faible réponse de 143 ± 165 , 18 ± 35 , 33 ± 39 et 51 ± 15 SFCs/ 10^6 PBMC après stimulation avec respectivement les 3 PepTivators-EBV, PepT-LMP2A, -EBNA1 et -BZLF1 (Figure 13).

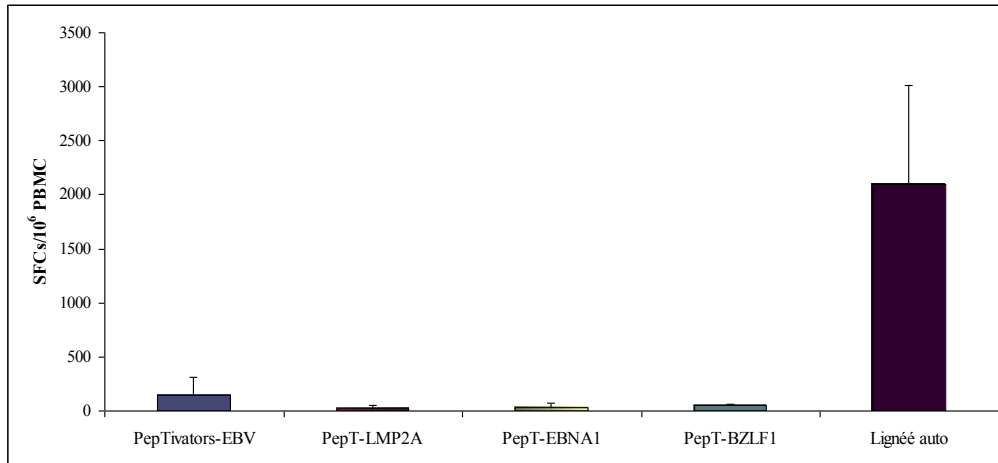


Figure 13. Comparaison entre les pools de peptides « PepTivators-EBV » et les LCL. Stimulation des CMN décongelées (n=4) avec les LCL autologues et avec les 3 PepTivators séparément ou simultanément. Une réponse IFN- γ élevée a été obtenue après stimulation des CMN avec les LCL en comparaison avec les pools de peptides « PepTivators-EBV ».

Les CMN décongelées de 12 donneurs sains ont également été stimulées avec différentes combinaisons de ces 3 PepTivators. Nous avons observé une réponse significativement supérieure après stimulation des CMN avec l'utilisation simultanée des 3 PepTivators LMP2A/EBNA1/BZLF1 (121 ± 88 SFCs/10⁶ PBMC) en comparaison avec les combinaisons : PepT-LMP2A/-EBNA1 (19 ± 35 SFCs/10⁶ PBMC, $p < 0,05$), PepT-LMP2A/-BZLF1 (47 ± 52 SFCs/10⁶ PBMC, $p < 0,05$) et PepT-EBNA1/-BZLF1 (68 ± 81 SFCs/10⁶ PBMC, $p < 0,05$) (Figure 14).

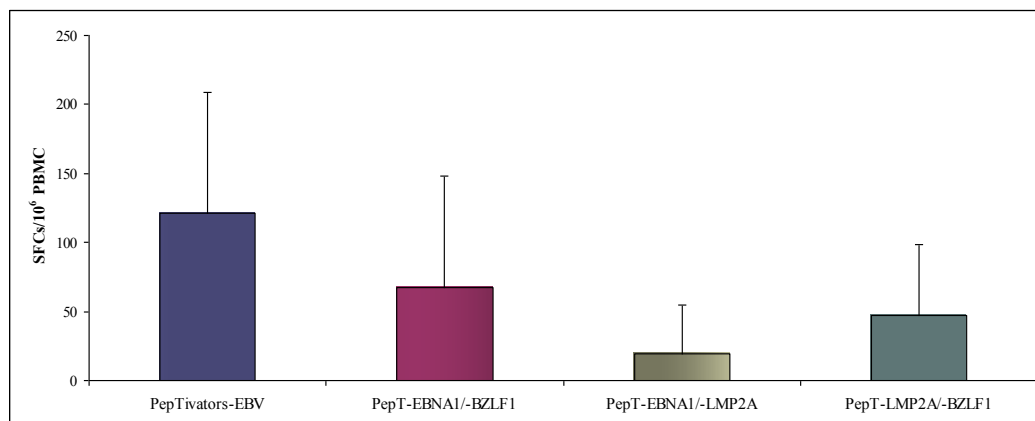


Figure 14. Comparaison entre les pools de peptides « PepTivators-EBV ». Les CMN décongelées (n=12) ont été stimulées avec différentes combinaisons des 3 PepTivators. Une réponse significativement supérieure après stimulation des CMN avec les 3 PepTivators simultanément a été observée en comparaison avec les autres combinaisons ($p<0,05$).

Au regard des faibles résultats obtenus avec la stimulation des CMN par les PepTivators-EBV par rapport à ce qui a été observé avec les LCL, nous avons pris l'initiative de faire synthétiser par la société « JPT Peptide Technologies » un pool de peptides que nous avons soigneusement défini à partir de la bibliographie (Hislop *et al.*, 2007). Nous avons commandé un pool de 12 peptides immunodominants des protéines virales EBNA3A, 3B et 3C de l'EBV (PepMix). Nous avons réalisé un Elispot IFN γ en stimulant des CMN décongelées provenant de 8 donneurs sains avec 5 concentrations différentes du PepMix. Nous avons obtenu une réponse de 224 ± 443 , 264 ± 425 , 171 ± 237 , 75 ± 111 et 117 ± 113 SFCs/ 10^6 PBMC après stimulation des CMN avec respectivement 5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 0,75 $\mu\text{g/ml}$, et 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de PepMix, (Figure 15). Aucune différence significative n'a été observée entre les 5 concentrations du PepMix ($p>0,05$). Nous avons donc choisi de stimuler les CMN avec la deuxième concentration qui est de **2,5 $\mu\text{g/ml}$** .

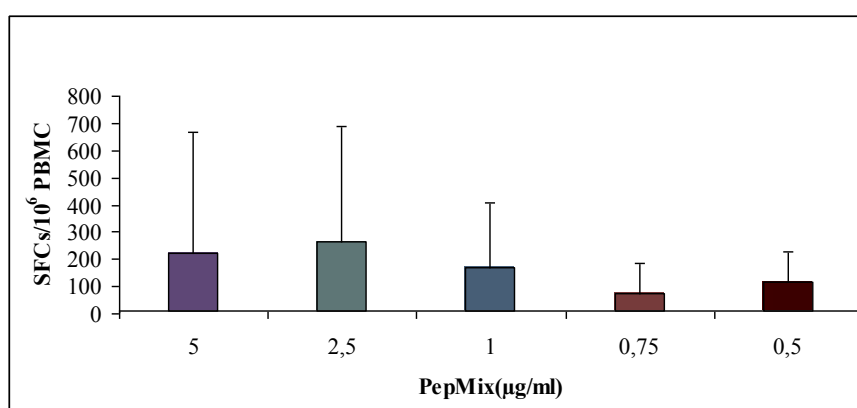


Figure 15. Concentration optimale de l'antigène de stimulation « PepMix ». Les CMN décongelées provenant de 8 donneurs sains ont été stimulées avec 5 concentrations différentes du PepMix. Il n'y a pas de différence significative entre les 5 concentrations ($p>0,05$).

Une fois ces informations obtenues, nous avons réalisé des combinaisons des différents pools de peptides afin de définir dans un test Elispot celle qui permettrait d'obtenir la meilleure sécrétion d'IFN- γ . Nos résultats publiés ont montré que la combinaison PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1 engendrait une stimulation significativement supérieure à celle observée avec les autres combinaisons testées. Avant de débiter la sélection immunomagnétique des CTL anti-EBV, il était nécessaire de définir le temps optimal de stimulation pour obtenir la sécrétion d'IFN- γ la plus importante. Pour cela, nous avons réalisé une cinétique en stimulant des CMN fraîches de 3 donneurs sains présentant une réponse immunitaire cellulaire vis-à-vis de l'antigène de stimulation EBV (PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1), pendant 3, 6, 9, 12 ou 16 heures. Le test de Cytokine IFN- γ Detection assay (CDA) a permis de mettre en évidence que le taux de CD4⁺IFN- γ ⁺ et de CD8⁺IFN- γ ⁺ (respectivement, $0,45 \pm 0,51\%$ et $0,27 \pm 0,33\%$) était maximal après 9 heures de stimulation. Malgré l'absence de différence significative ($p > 0,05$) probablement du fait d'écarts types importants liés au faible échantillon ($n=3$), nous avons retenu ce temps pour toutes les manipulations ultérieures (Figure 16).

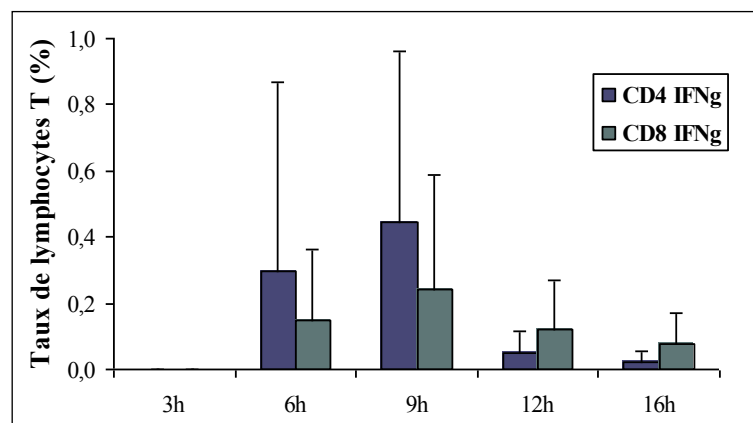


Figure 16. Détermination du temps optimal de stimulation avec l'antigène EBV (PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1). Il n'y pas de différence significative entre les différents temps de stimulation ($p > 0,05$).

Pour les donneurs pour lesquels nous disposions du typage HLA de classe I ($n=17$), nous avons comparé la production d'IFN- γ par technique Elispot en réponse aux

différents antigènes de stimulation : PepMix seul, PepT-BZLF1 seul, PepT-EBNA1 seul et la combinaison des trois : PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1 (n=5). Les résultats sont synthétisés dans le tableau XII. On observe pour les 4 donneurs ayant un typage HLA de classe I ne permettant pas la présentation de peptides du PepMix une fréquence négative de 0 à 3 SFC/10⁶PBMC. Pour les 5 donneurs dont le typage HLA est connu et pour lesquels l'association PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1 a été utilisée, on observe que la réponse IFN- γ est proche de la somme des réponses IFN- γ observées avec chacun des antigènes.

Tableau XII. Sécrétion d'IFN- γ évaluée par Elispot en réponse aux différents antigènes EBV (donneurs avec typage HLA classe I connu).

Donneur	Nombre de SFCs/10 ⁶ PBMC																	Nombre de peptides pr ésentés/11	Nombre de SFCs/10 ⁶ PBMC		
		HLA classe I					Pool de peptides (PepMix) présentées en classe I												PepT- BZLF1	PepT- EBNA1	PepMix+PepT- BZLF1+ EBNA1
	PepMix						RLR	RPP	QAK	RYS	YPL	IVT	TYS	VEI	QPR	RRYI	KEH				
3	40	A2	A33	B44	B50													2	83	30	
4	307	A2	A23	B44	B50													2	0	10	
5	3	A3	A26	B55	B65													0	0	17	
6	0	A3	A1	B18	B51													0	68	13	
7	0	A2	A26	B38	B51													0	17	15	
8	60	A3	A33	B7	B58													2	0	7	
9	407	A2	A24	B18	B50													2	697	7	
10	43	A1		B8														1	280	40	280
11	203	A2		B44	B18													2	117	37	330
12	0	A2	A68	B27	B57													1	0	3	
13	363	A23	A24	B44	B18													4	53	20	663
17	63	A24	A26	B38	B62													1	0	0	
18	587	A2	A11	B27	B51													2	10	7	227
19	97	A1	A24	B44	B35													5	33	0	155
20	207	A3	A24	B7	B28													4	0	33	
21	0	A1	A33	B14	B52													0	17	10	
33	60	A2	A24	B44														4	10	40	
34	40	A2	A26	B55	B61													0	973	0	0

Ces travaux préliminaires, nous ont permis de réaliser 6 productions de CTL anti-EBV à partir de 100 à 200×10⁶ CMN issues de donneurs sains, stimulées pendant 9 heures avec l'antigène de stimulation défini précédemment,. Nous avons observé après stimulation en moyenne 0,07±0,07% CD4⁺IFN- γ ⁺ parmi les lymphocytes T CD4⁺ et 0,14±0,07% CD8⁺IFN- γ ⁺ parmi les lymphocytes T CD8⁺. Après sélection, nous avons obtenu en moyenne 0,53±0,25×10⁶ CNT, avec un enrichissement de 24,77±18,01% en cellules CD4⁺IFN- γ ⁺ parmi les lymphocytes T CD4⁺ et de 51,42±26,92% en CD8⁺IFN- γ ⁺ parmi les lymphocytes T CD8⁺. Après amplification et stimulation avec les pools de peptides de l'EBV, nous avons mis en évidence par technique ICC, une spécificité antigénique des cellules sélectionnées avec une importante proportion de CD4⁺IFN- γ ⁺ (50,11±23,58% parmi les lymphocytes T CD4⁺) et des CD8⁺IFN- γ ⁺ (60,12±21,11% parmi les lymphocytes T CD8⁺). De plus,

cette spécificité a été confirmée par technique Elispot IFN- γ mais aussi par un test TTL qui a mis en évidence une forte capacité de prolifération des CTL amplifiés vis-à-vis de l'antigène de stimulation en comparaison à la capacité de prolifération des PBMC avant sélection.

L'étude de la cytotoxicité vis-à-vis de blastes autologues chargés avec l'antigène de stimulation au rapport 10/1, a permis d'observer une lyse spécifique en moyenne de $57,6 \pm 11,5\%$, et également une lyse spécifique en moyenne de $18,3 \pm 7,3\%$ contre l'EBV-LCL autologue. En revanche, la cytotoxicité des CTL sélectionnés est de moins de 10% vis-à-vis de cibles chargées avec des antigènes non pertinents ou des cibles autologues non chargées. L'étude de l'alloréactivité a mis en évidence une réduction moyenne de $94,7 \pm 3,3\%$ de la prolifération allogénique des CTL anti-EBV vis-à-vis de PBMC des donneurs comparée à celle des CMN avant sélection vis-à-vis de ces mêmes PBMC.

CONCLUSION :

Nous avons montré par ce travail qu'il était possible d'isoler, en utilisant des antigènes d'origine synthétique, des CTL anti-EBV ayant une cytotoxicité importante et spécifique vis-à-vis de cibles autologues chargées avec les peptides EBV et de faible alloréactivité résiduelle. La technique utilisée est rapide et, si nous ne pouvons affirmer à ce stade que les CTL produits sont entièrement de grade clinique du fait de l'utilisation d'un pool de peptides qui ne dispose pas de cette appellation, nous avons apporté la preuve qu'il est absolument nécessaire de disposer de peptides issus des protéines latentes EBNA 3A, 3B et 3C pour obtenir une stimulation efficace.

De plus, l'analyse des sous populations lymphocytaires composant les CTL anti-EBV a montré pour la première fois la présence de la population souche mémoire (T_{SCM}) qui du fait de ses propriétés d'auto-renouvellement et d'expansion présente un intérêt tout particulier en immunothérapie adoptive.

Combination of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1, 3 and lytic antigen BZLF1 peptide pools allows fast and efficient stimulation of Epstein-Barr virus-specific T cells for adoptive immunotherapy

YINGYING WANG^{1,6}, LAMIA AÏSSI-ROTHE^{1,6}, JEAN MARC VIRION², MARCELO DE CARVALHO BITTENCOURT⁵, NESLIHAN ULAS¹, SANDRA AUDONNET⁵, ALEXANDRA SALMON³, LAURENCE CLEMENT³, VERONIQUE VENARD⁴, HELÈNE JEULIN⁴, JEAN-FRANÇOIS STOLTZ^{1,6}, VERONIQUE DECOT^{1,6} & DANIELE BENSOUSSAN^{1,6,7}

CHU de Nancy, ¹Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, ²Epidémiologie et Evaluation Cliniques, ³UTMA, ⁴Laboratoire de Virologie, ⁵Laboratoire d'Immunologie et Plateforme Nancytomique, and ⁶CNRS, UMR 7365 et FR 3209, Faculté de Médecine, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, and ⁷Faculté de Pharmacie, Département de Microbiologie-Immunologie, Université de Lorraine, Nancy Cedex, France

Abstract

Background. Epstein-Barr virus (EBV) infection is a major cause of morbidity following hematopoietic stem cell transplantation. EBV-infected B cells may not respond to rituximab treatment and may lead to a life-threatening post-transplantation lymphoproliferative disorder. Adoptive cellular immunotherapy using EBV-lymphoblastoid cell lines (LCL) as stimulating antigen has proved effective in restoring specific immunity. However, EBV presents several immunodominant antigens, and developing a swift and effective clinical-grade immunotherapy relies on the definition of a Good Manufacturing Practices (GMP) universal stimulating antigen. **Methods.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from six donors with a cellular immune response against EBV were immunoselected after stimulation with a new EBV antigen associated with an EBNA3 peptide pool. **Results.** After immunoselection, a mean of $0.53 \pm 0.25 \times 10^6$ cells was recovered consisting of a mean of $24.77 \pm 18.01\%$ CD4⁺-secreting interferon (IFN)- γ and $51.42 \pm 26.92\%$ CD8⁺-secreting IFN- γ . The T memory stem cell sub-population was identified. EBV-specific T cells were expanded *in vitro*, and their ability to secrete IFN- γ and to proliferate after re-stimulation with EBV antigen was confirmed. A specific lysis was observed against autologous target cells pulsed with EBV peptide pools ($57.6 \pm 11.5\%$) and against autologous EBV-LCL ($18.3 \pm 7.3\%$). A mean decrease of $94.7 \pm 3.3\%$ in alloreactivity against third-party donor mononuclear cells with EBV-specific T cells was observed compared with PBMCs before selection. **Conclusions.** Our results show that a combination of peptide pools including EBNA3 is needed to generate EBV-specific T cells with good specific cytotoxicity and devoid of alloreactivity, but as yet GMP grade is not fully achieved.

Key Words: adoptive immunotherapy, EBV-specific T cells, Epstein-Barr virus infection, post-transplantation lymphoproliferative disorder (PTLD), T memory stem cells (T_{SCM})

Introduction

Epstein-Barr virus (EBV) is a latent human virus that infects >90% of the adult population (1). In healthy carriers, it is controlled in the latent state by the immune system, especially by EBV-specific T cells (2,3). During the first 6 months after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), while immune reconstitution is not fully achieved (4) and immunosuppressive drugs are used to prevent or treat graft-versus-host disease (GVHD), patients are

highly immunocompromised and susceptible to reactivation of EBV. Without immune control, EBV infection may lead to an aggressive and potentially life-threatening malignancy known as post-transplantation lymphoproliferative disorder (PTLD). The cumulative incidence of PTLD ranges from 0.2–8.1% depending on the number of risk factors, such as anti-thymocyte globulin therapy, matched unrelated donor transplant, or age at transplantation

(≥ 50 years old). PTLTLD is associated with significant morbidity and mortality (4,5).

Immune reconstitution by donor-origin EBV-specific T cells after HSCT is essential to control associated viral disease. A dual approach of viral monitoring and regular checks of the specific immune status has been developed for decades and should permit precise distinction between patients requiring pre-emptive anti-viral therapy and patients having efficient specific immune reconstitution to control infection, avoiding unnecessary implementation of anti-viral treatments (6).

Therapies that affect the balance of infected B cells and specific cytotoxic T cells have been successfully developed, including preventive treatment combining donor B-cell and T-cell depletion before HSCT (7) and curative treatment with donor lymphocyte infusion (8). Donor lymphocyte infusion is now obsolete in this field because of the low number of specific T cells infused and the associated risk of GVHD occurrence. More recently, monoclonal anti-CD20 antibody (rituximab) has become the usual treatment for post-HSCT EBV infections. This treatment is not devoid of side effects, mainly affecting B-cell immune reconstitution, and treatment failure is observed in $>30\%$ of patients (9,10). It has been reported that for some viruses anti-viral drug therapy was ineffective without concomitant immune reconstitution (11).

To restore specific anti-EBV immunity, adoptive transfer of donor virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) was successfully performed. Since 1993, Brenner's group has developed an adoptive immunotherapy aimed at preventing and curing EBV-induced lymphoproliferative syndromes (12,13). In 2010, these investigators reported their experience in treating EBV-PTLD prophylactically in 101 patients who did not develop EBV-PTLD and curatively in 13 patients, 11 of whom are in complete remission (14). They also reported the absence of severe toxicity related to donor CTLs and the absence of GVHD, even with *in vitro* alloreactivity (15,16). In these studies, EBV-specific T cells for infusion were generated by repetitive stimulation of the donor T cells with donor EBV-lymphoblastoid cell lines (LCL) as the stimulating antigen; this required a cell culture time of >2 months. Despite the encouraging results reported with this process, there have been setbacks in the development of this approach. First, because it takes 2 months to culture EBV-specific T cells and they should be available when EBV-DNAemia increases following HSCT, cell culture should be started at the time of HSCT. Second, laboratory facilities are required to perform such long cultures in Good Manufacturing Practices (GMP) conditions (17).

To overcome these problems, different strategies have been developed including allogeneic anti-EBV

CTL banks that make cryopreserved CTLs available to all patients. Encouraging results with a complete or partial response rate of 52% at 6 months after allogeneic CTL infusion have been reported (18,19). In the last few years, immune-magnetic selection techniques based on interferon (IFN)- γ secretion were developed using the CliniMACS device (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), providing virus-specific CTLs from donor cells within 2 days. Feuchtinger *et al.* (20,21) first reported successful clinical experiences with anti-adenovirus (ADV) CTLs and anti-cytomegalovirus (CMV) CTLs. Moosmann *et al.* (22) reported treating six patients with EBV-PTLD (three early-stage and three late-stage PTLTLD) with EBV-specific T cells produced by immune-magnetic selection after stimulating donor cells with an EBV peptide pool (23 synthetic peptides of 8–15 amino acids from 11 EBV antigens). For the three patients in early-stage PTLTLD who could be assessed, the adoptive immunotherapy was associated with clearance of the viral load, disappearance of clinical symptoms and, for two of these patients, an expansion of specific T lymphocytes after infusion. More recently, Icheva *et al.* (23) reported using either EBNA1 recombinant protein or a GMP-grade EBNA1 peptide pool to stimulate IFN- γ secretion by EBV-specific T cells. Among 10 patients with EBV infection or PTLTLD treated with IFN- γ selected cells, seven showed clinical and virologic responses. No adverse events or *de novo* GVHD were reported in those two trials. These approaches were the first to enable rapid selection of EBV-specific T cells using defined peptide pools as the stimulating antigen, making it easier to obtain authorizations from regulatory agencies to manufacture clinical-grade cells.

So far, three overlapping EBV peptide pools, covering the whole proteins EBNA1, LMP2A, and BZLF1, have been developed for clinical-grade applications. However, among latent EBV proteins, although EBNA1 has been shown more recently to be important for generating EBV-specific T cells (24), EBNA3 proteins are also known to be highly immunogenic as LCL-stimulated cultured CTLs, dominated by EBNA3-specific CD8⁺ T cells, which have proved effective against PTLTLD (14,25,26).

In this study, we aimed first to define the peptide pool combination allowing optimal specific T-cell stimulation. Generation of EBV-specific T cells was performed secondarily, and their *in vitro* efficiency was checked. We also showed that to generate EBV-specific T cells with good specific cytotoxicity against EBV targets and reduced alloreactivity, we had to use a non-fully clinical grade stimulating peptide pool combination because the EBNA3 peptide pool required for optimal stimulation is not yet available in GMP grade.

Materials and Methods

Peptide pools and Epstein-Barr virus antigens

Three EBV peptide pools, PepTivator-EBNA1 (PepT-EBNA1), PepTivator-LMP2A (PepT-LMP2A) and PepTivator-BZLF1 (PepT-BZLF1), consisting of 15-mer sequences with 11 amino acids overlap, covering the whole protein of EBNA1, LMP2A and BZLF1 (Miltenyi Biotec) and an EBV peptide mix, PepMix-EBNA3A,3B,3C, consisting of the previously described 11 human leukocyte antigen (HLA) class I-restricted epitopes and one HLA class II-restricted epitope from EBNA-3A,-3B,-3C latent antigens (JPT Peptide Technologies, Berlin, Germany) (Table I) were used alone or in combination for EBV-specific CTL stimulation (22,27,28). Additional peptide pools of the immunodominant ADV hexon and CMV pp65 proteins (PepTivator-ADV5 Hexon and PepTivator-CMV pp65; Miltenyi Biotec) were used as irrelevant antigens for functional characterization of generated EBV-specific T cells.

Donor selection

The different EBV peptide pools were initially tested in a large number of consecutive healthy donors (37–46 donors) from a French blood collection center, who gave informed consent but were not selected for their EBV-cellular immune response. With informed consent, the peripheral blood from six EBV-positive healthy volunteers was collected in a French blood collection center. Donors were selected based on the presence of an anti-EBV cellular immune response evidenced by IFN- γ enzyme-linked immunosorbent spot analysis (ELISpot) assay.

Generation of EBV-specific T cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from donor peripheral blood by Lymphoprep density gradient centrifugation (Abcys, Paris, France). Recovered PBMCs were washed twice, and 1 to 2×10^8 PBMCs were suspended in RPMI-1640 (Eurobio, Courtaboeuf, France) supplemented with 10% human AB serum at 1×10^7 cells/mL and incubated for 9 h with the stimulating antigen PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1 (0.6 nmol/peptide/mL for PepTivators; 2.5 μ g/mL for PepMix). After antigen stimulation, IFN- γ -secreting cells were enriched using the Cytokine Capture System, as previously described, via magnetic cell separation (Miltenyi Biotec) (29). Briefly, cells were labeled with an anti-IFN- γ monoclonal antibody conjugated to a CD45-antibody and diluted and incubated for 45 min. Next, cells were washed and magnetically

Table I. PepMix composition: 12 EBV peptides from three proteins—EBNA3A, 3B and 3C.

Short name	Amino acid sequence	Protein	HLA restriction
RRL	RLRAEAQVK	EBNA3A	A0301
RPP	RPPIFIRRL	EBNA3A	B0702
QAK	QAKWRLQTL	EBNA3A	B0801
RYS	RYSIFFDYM	EBNA3A	A2402
YPL	YPLHEQHGM	EBNA3A	B3501
IVT	IVTDFSVIK	EBNA3B	A1101
TYS	TYSAGIVQI	EBNA3B	A2402
VEI	VEITPYKPTW	EBNA3B	B44
QPR	QPRAPIRPI	EBNA3C	B0702
RRIY	RRIYDLIEL	EBNA3C	B2702/04/05
KEH	KEHVQNAAF	EBNA3C	B4402
PAPQ	PAPQAPYQGYQEPPAPQAPY	EBNA3C	DR1/DR4

labeled with anti-IFN- γ micro-beads during 15 min. Finally, these labeled cells were selected using Mid-iMACS (Miltenyi Biotec). The positive fraction eluted from the column was enriched in EBV-specific T cells. Positive and negative control stimulations were simultaneously carried out on 10×10^6 PBMCs with 20 μ g/mL Cytostim (Miltenyi Biotec) and culture medium, respectively.

Detection of EBV-specific T cells by IFN- γ ELISpot assay

ELISpot assays were performed as previously described (6). Briefly, after overnight coating of 96-well Multiscreen Immobilon R-P plates (MAIPS; Millipore, Bedford, MA, USA) with a monoclonal anti-human IFN- γ antibody, 1-D1K (Mabtech, Stockholm, Sweden), donor PBMCs or EBV-specific T cells were added in triplicate wells at concentrations of 1×10^6 or 1×10^4 cells/mL and incubated with stimulating antigens, a mitogen as positive control (phytohemagglutinin [PHA]; Oxoid, Dardilly, France) and culture medium as negative control. After undisturbed incubation for 20 h at 37°C with 5% CO₂, the cells were discarded, and revelation was performed using a second biotinylated anti-human IFN- γ 7B 6-1 biotin (Mabtech), a streptavidin conjugated alkaline phosphatase (Mabtech) and an alkaline phosphatase-conjugate substrate kit (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Finally, the reaction was stopped, and the plates were washed and air-dried. Dark spots were counted using an automated ELISpot reader, Bioreader 4000 PRO-S (BIO-SYS, SERLABO, Entraigues sur la Sorgues, France). The number of antigen-specific T cells expressed as specific spot-forming cells (SFCs) per 10^6 PBMCs was calculated after subtracting negative control values.

Phenotypic analysis and intracellular cytokine staining by flow cytometry

Antigen-stimulated T cells were stained before and after magnetic enrichment with the following antibodies: APC-H7-anti-CD4 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), APC-anti-CD8 (BD Biosciences), PE-anti-IFN- γ antibody (Miltenyi Biotec) and FITC-anti-CD14 (Beckman Coulter, Villepinte, France). CD14⁺ cells and dead cells identified by 7AAD (Beckman Coulter) staining were removed from analysis. At least 100,000 lymphoid cells were analyzed on a Canto 1 flow cytometer using the DIVA software (BD Biosciences). Intracellular staining was performed to check the response of expanded EBV-specific T cells to antigen stimulation. Briefly, expanded EBV-specific T cells were stimulated with EBV antigen for 16 h, and Brefeldin A was added for the last 12 h. The following day, Perm/Fix Solution (BD Biosciences) was added, and the cells were stained with APC-H7-anti-CD4, APC-anti-CD8, PE-anti-IFN- γ antibody and PerCP-Cy5.5-anti-IL-2 antibody (BD Biosciences). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 2 μ g/mL; Sigma-Aldrich, L'Isle D'Abeau Chesnes, France), complemented with ionomycin (5 μ g/mL; Calbiochem, San Diego, CA, USA) was used as positive control. Flow cytometry analysis was performed on 50,000 events per sample on a Canto 1 analyzer.

Analysis of T-cell differentiation sub-populations

Freshly selected EBV-specific T cells ($n = 1$), 10-day expanded EBV-specific T cells ($n = 1$) and thawed EBV-specific T cells expanded for 1 week longer ($n = 4$) were stained by LIVE/DEAD AQUA fluorescent-reactive dye (Life Technologies, Saint Aubin, France), ECD-anti-CD4 (Beckman Coulter), APC-Alexa Fluor 700 anti-CD8 (Beckman Coulter), APC-Alexa Fluor 750 anti-CD3 (Beckman Coulter), V450-anti-CD45RA (BD Biosciences), FITC-anti-CD27 (BD Biosciences), PE-Cy7-anti-CD197 (CCR7) (BD Biosciences), PE-Cy5-anti-CD95 (Biollegend, San Diego, CA, USA) and PE-anti-IFN- γ antibody (Miltenyi Biotec). Expression of CD27, CCR7, CD45RA and CD95 was analyzed on CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD3⁺CD8⁺IFN- γ ⁺ gated T cells. Flow cytometry acquisition was performed on 500,000 events per sample on a Navios cytometer (Beckman Coulter). Kaluza software (v1.2; Beckman Coulter) was used for analysis.

EBV-specific T-cell expansion

After phenotypic analysis, the remaining EBV-specific T cells were cultured for a mean of 2 weeks

in RPMI-1640 supplemented with 10% human AB serum and 100 IU/mL of interleukin (IL)-2 (Pepro-Tech, TEBU, Paris, France) in a culture flask. Irradiated autologous feeder cells from the negative fraction were added at day 0 and day 7 at a ratio of 100:1 and 10:1, respectively. Cultures were fed with fresh culture medium every 2 days.

Proliferative assay

Specific proliferation was studied by incubating 1×10^5 PBMCs or expanded EBV-specific T cells in the presence of different peptide pool antigens or PMA/ionomycin over 4 days at 37°C. ³H-Thymidine (1 μ Ci; GE Healthcare, Orsay, France) was added for the last 18 h of culture. At the end of the test, cells were harvested onto a filter plate, and the counts per minute (cpm) were determined using a liquid scintillation counter (Top Count; PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Proliferative responses are expressed in cpm.

Cytotoxicity assay

Autologous and allogeneic PHA-blasts were generated from 5×10^6 PBMCs stimulated by 1 μ g/mL PHA on day 0 and with 100 IU/mL IL-2 on day 3 and every 2 days for a median of 7 days. Autologous PHA-blasts were pulsed for 16 h with different EBV peptide pools and an irrelevant peptide pool. LCL were generated *in vitro* by infecting PBMCs with B95-8 EBV supernatant, as previously reported (6). Autologous and allogeneic LCL were also used as target cells ($n = 4$).

EBV-specific T-cell cytotoxicity was measured in a standard 4-h chromium-51 release assay, as previously described, using effector-to-target cell ratios of 10:1 in triplicate (with 1×10^4 target cells), with EBV-specific T cells as effector cells (29). The percentage of specific lysis was calculated as follows: (experimental release – spontaneous release) / (maximum release – spontaneous release) $\times 100$.

Mixed lymphocyte reaction

Expanded EBV-specific T cells were plated with irradiated allogeneic or autologous PBMCs (25 Gy; 1×10^5 of each cell type; responder to stimulator ratio 1:1) for 6 days at 37°C, 5% CO₂, and ³H-thymidine incorporation was evaluated as described previously for the proliferative assay.

Statistical analysis

A comparison of IFN- γ responses with the four antigens (PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1, PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1/-LMP2A, PepMix alone and

PepT-EBNA1/-BZLF1/-LMP2A) was performed by the non-parametric Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$). The comparison between each antigen and the PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1 was also performed with this test ($P < 0.0167$). The data analysis was generated using SAS/STAT software, Version 9.2 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). A paired Student t test was applied to compare the specific lysis against antigen-loaded target cells and non-loaded target cells and the specific lysis against autologous LCL and allogeneic LCL. The same statistical test was carried out to compare proliferative response between EBV-specific T cells and PBMCs before selection against different antigens. P values < 0.05 were considered significant.

Results

Combination of PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1 allows optimal specific T-cell stimulation

PBMCs from different healthy donors were stimulated with different combinations of EBV peptide pools, and the release of IFN- γ was evaluated using

ELISpot assay. Altogether, we tested three peptide pools individually, PepT-EBNA1 ($n = 40$), PepT-LMP2A ($n = 37$) and PepT-BZLF1 ($n = 40$), and four combinations, PepMix-EBNA3A,3B,3C ($n = 40$), PepT-EBNA1/-BZLF1/-LMP2A ($n = 40$), PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1/-LMP2A ($n = 46$) and PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1 ($n = 43$). We noted a low IFN- γ secretion after stimulation with each individual PepTivator, especially with PepT-LMP2A, where the mean response was 16 ± 30 SFCs/ 10^6 PBMCs (Figure 1), with only two donors showing IFN- γ secretion >100 SFCs/ 10^6 PBMCs. Among the four different combinations of all these peptide pools, significantly different IFN- γ secretions were observed ($P < 0.001$). The PepMix generated an IFN- γ secretion of 163 ± 395 SFCs/ 10^6 PBMCs. Antigen stimulation was significantly higher using a PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1 combination (380 ± 465 SFCs/ 10^6 PBMCs) than with other antigen combinations ($P < 0.0001$) except PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1/-LMP2A (248 ± 355 SFCs/ 10^6 PBMCs, $P = 0.0980$), suggesting that addition of PepT-LMP2A does not improve IFN- γ secretion and even seems to decrease it.

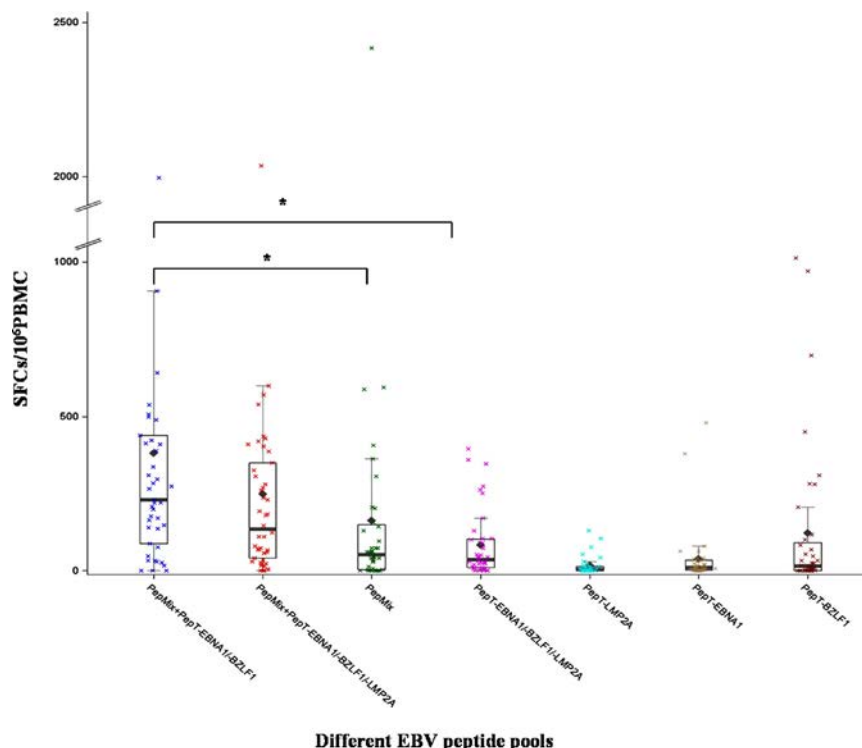


Figure 1. Determination of optimal peptide pool combination allowing for EBV-specific T-cell stimulation by IFN- γ ELISpot assay. IFN- γ response was evaluated after stimulation by different EBV peptide pools: PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1 ($n = 43$), PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1/-LMP2A ($n = 46$), PepT-EBNA1/-BZLF1/-LMP2A ($n = 40$), PepMix ($n = 40$), PepT-EBNA1 ($n = 40$), PepT-LMP2A ($n = 37$) and PepT-BZLF1 ($n = 40$). Medians are shown as dark lines. Results are expressed as SFCs/ 10^6 PBMCs. A significant difference was observed between the four different combinations of peptide pools ($P < 0.05$). The PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1 combination induced significantly higher IFN- γ secretion than the other antigen combinations ($*P < 0.0167$) except for PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1/-LMP2A ($P = 0.0980$).

EBV-specific T-cell isolation by IFN- γ capture immune-magnetic technique

As previously described, we stimulated $100\text{--}200 \times 10^6$ PBMCs from six healthy donors with the previously defined antigen PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1. After 9 h of stimulation, $0.07 \pm 0.07\%$ of $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$ and $0.14 \pm 0.07\%$ of $\text{CD8}^+\text{IFN-}\gamma^+$ among CD4^+ and CD8^+ cells, respectively, were detected before isolation. These cells were immunoselected with the clinical Cytokine Capture System on the MidiMACS system (Miltenyi Biotec), and a mean number of $0.53 \pm 0.25 \times 10^6$ cells was recovered. Among these isolated cells, a mean of $24.77 \pm 18.01\%$ of CD4^+ cells secreting IFN- γ and a mean of $51.42 \pm 26.92\%$ of CD8^+ cells secreting IFN- γ were obtained. Mean viability of these isolated cells was $59.43 \pm 12.16\%$ (Table II).

Expansion of selected EBV-specific T cells

After isolation, a mean of $0.42 \pm 0.22 \times 10^6$ EBV-specific T cells was expanded in culture with autologous, irradiated negative fraction cells as feeder cells and IL-2 to perform functional assays. After a mean of 2 weeks, $81 \pm 23 \times 10^6$ total cells were generated, and a mean of 2.24 Log expansion was observed (Figure 2).

Antigen specificity of expanded cells

EBV specificity of these expanded cells was checked using intracellular cytokine staining, proliferative assay and IFN- γ ELISpot assay. With intracellular cytokine staining, a mean of $50.11 \pm 23.58\%$ of EBV-specific CD4^+ T cells gated on CD4^+ cells and a mean of $60.12 \pm 21.11\%$ of EBV-specific CD8^+ T cells gated on CD8^+ cells were observed after re-stimulation by PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1 for 16h. A marked increase in the proportion of

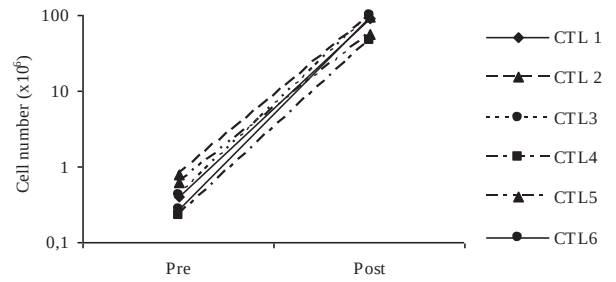


Figure 2. Expansion of isolated EBV-specific T cells. A mean of 2.24 Log expansion is observed after about 2 weeks of *in vitro* expansion in the presence of IL-2 and irradiated autologous feeder cells. Results are shown on a Log 10 scale on the y axis.

$\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$ was observed among CD4^+ cells except in two cases, whereas weak variations in the proportion of $\text{CD8}^+\text{IFN-}\gamma^+$ were detected among CD8^+ cells except in one case. The highest increase in the proportions of $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$ and $\text{CD8}^+\text{IFN-}\gamma^+$ during expansion was observed starting with the lowest enriched population after selection. There was greater expansion of CD8^+ cells than of CD4^+ cells (5.1% versus 3.8% after selection and 39.49% versus 8.59% after expansion). A small population of IFN- γ -secreting and IL-2-secreting T cells was observed with a mean of $0.38 \pm 0.57\%$ $\text{CD4}^+\text{IL-2}^+\text{IFN-}\gamma^+$ and $5.25 \pm 8.39\%$ $\text{CD8}^+\text{IL-2}^+\text{IFN-}\gamma^+$. The negative control with culture medium and the control with irrelevant antigens showed neither IFN- γ nor IL-2 response (Table III).

EBV specificity of expanded cells was confirmed by IFN- γ ELISpot assay after stimulation by different peptide pools. We observed a median 316-fold increase in IFN- γ secretion against PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1 compared with PBMCs before selection ($147,725$ versus 633 SFCs/ 10^6 cells) (Figure 3). This increase was similar to that observed by cytometry analyses with a median 373-fold increase. A weak IFN- γ secretion was observed against irrelevant antigens.

Table II. Generation of EBV-specific T cells from six healthy donors: results before and after immune-magnetic selection.

Assay No.	Before isolation					After isolation					Viability (%)
	TNC (10^6)	CD4 (%) ^a	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ (%) ^b	CD8 (%) ^a	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ (%) ^b	TNC (10^6)	CD4 (%) ^a	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ (%) ^b	CD8 (%) ^a	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ (%) ^b	
1	60.40	39.60	0.04	20.10	0.15	0.53	9.80	14.40	10.50	53.34	56.10
2	116.80	48.28	0.11	6.98	0.16	0.93	5.73	10.28	1.75	35.52	74.00
3	94.00	41.30	0.04	21.70	0.21	0.56	1.70	11.21	3.90	62.50	72.04
4	163.20	40.07	0.03	15.47	0.10	0.24	0.82	49.02	2.05	84.14	57.95
5	171.20	28.42	0.20	16.87	0.19	0.63	1.99	46.57	10.47	65.90	55.50
6	118.08	42.93	0.03	18.32	0.01	0.27	3.11	17.16	2.03	7.12	41.00
Mean	120.61	40.10	0.07	16.57	0.14	0.53	3.86	24.77	5.12	51.42	59.43
SD	41.78	6.53	0.07	5.20	0.07	0.25	3.37	18.01	4.23	26.92	12.16

SD, standard deviation.

^aPercentage of CD4^+ and CD8^+ cells refers to the total number of viable cells (7AAD-negative population).

^bPercentage of $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$ and $\text{CD8}^+\text{IFN-}\gamma^+$ cells refers to the total number of CD4^+ and CD8^+ cells.

Table III. Intracellular cytokine staining after expansion.

Assay (No.)	CD4 (%) ^a	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ (%) ^b	CD4 ⁺ IL-2 ⁺ (%) ^b	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ IL-2 ⁺ (%) ^b	CD8 (%) ^a	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ (%) ^b	CD8 ⁺ IL-2 ⁺ (%) ^b	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ IL-2 ⁺ (%) ^b
1	0.28	44.52	ND	ND	38.65	43.51	ND	ND
2	1.17	26.41	ND	ND	33.06	29.83	ND	ND
3	7.00	91.40	0.00	0.00	71.90	76.20	0.00	0.90
4	22.50	57.20	0.20	1.20	20.30	86.30	0.00	1.90
5	4.50	29.40	0.40	0.00	46.20	56.10	0.10	0.40
6	16.10	51.70	0.10	0.30	26.80	68.80	0.00	17.80
Mean	8.59	50.11	0.18	0.38	39.49	60.12	0.03	5.25
SD	8.87	23.58	0.17	0.57	18.26	21.11	0.05	8.39

ND, not detectable; SD, standard deviation.

^aPercentage of CD4⁺ and CD8⁺ cells refers to the total number of cells (ungated population).

^bPercentage of CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-2⁺, CD4⁺IFN- γ ⁺IL-2⁺, CD8⁺IFN- γ ⁺, CD8⁺IL-2⁺ and CD8⁺IFN- γ ⁺IL-2⁺ cells refers to the total number of CD4⁺ and CD8⁺ cells.

Finally, specific proliferation of expanded EBV-specific T cells against PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1, PepT-BZLF1, PepMix or PepT-EBNA1 alone was confirmed in a proliferative assay, and after incubation with the first two EBV antigens, a significantly increased proliferative response was achieved compared with PBMCs before selection ($P < 0.05$). In contrast, the increase in proliferative response was not significant with the last two EBV antigens. Significantly lower proliferation was detected after stimulation by irrelevant antigens or by PMA/ionomycin compared with PBMCs before selection ($P < 0.05$) (Figure 4).

Efficacy of expanded EBV-specific T cells in killing specific target cells

Autologous and allogeneic PHA-blasts and LCL, loaded or not, were used as target cells for expanded EBV-specific T cells in a cytotoxic chromium assay. According to an effector-to-target cell ratio of 10:1, the EBV-specific T cells showed a high specific lysis against stimulating peptide pool-loaded target cells ($57.6 \pm 11.5\%$). A mean significant specific lysis of

$39.5 \pm 22.3\%$ and $42.7 \pm 24.1\%$ was achieved when target cells were loaded with PepT-BZLF1 and PepMix, respectively, compared with unloaded autologous target cells ($P < 0.05$). Low lysis was observed against PepT-EBNA1-loaded autologous target cells ($9.2 \pm 12.0\%$; $P > 0.05$), irrelevant peptide pool-loaded autologous target cells or allogeneic target cells. A significant specific lysis of $18.3 \pm 7.3\%$ (range, 10.5–28%) was observed against autologous LCL compared with allogeneic LCL ($3.8 \pm 3.5\%$; $P < 0.05$) (Figure 5).

Depletion of alloreactive T cells

Mixed lymphocyte reaction was used to study the residual alloreactivity of expanded EBV-specific T cells. PBMCs before selection and EBV-specific T cells after expansion were co-cultured with irradiated PBMCs from two or three third-party donors for 6 days. PBMCs before selection showed a strong proliferative response against these third-party irradiated lymphocytes. A marked reduction of $94.7 \pm 3.3\%$ of alloreactivity was achieved for EBV-specific T cells after expansion (Figure 6). These results were confirmed by the absence of specific lysis against allogeneic targets in the cytotoxicity assay (Figure 5).

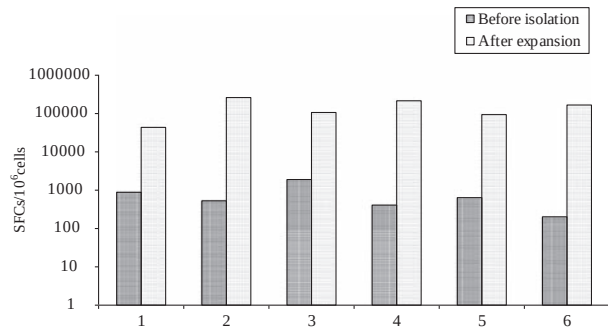


Figure 3. IFN- γ ELISpot assay of EBV-specific T cells after expansion and PBMCs before selection. IFN- γ response was evaluated after stimulation by PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1. Results are expressed as SFCs/10⁶ PBMCs. A high increase in IFN- γ secretion was observed compared with PBMCs before selection.

T-cell differentiation sub-populations

The T-cell sub-populations of EBV-specific T cells and their evolution were studied. However, although CD27 was highly expressed after selection, we noticed a marked decrease in its expression after expansion. To compare T-cell sub-populations after selection and after expansion, we decided to eliminate CD27.

For one donor, after isolation of EBV-specific T cells, all the T-cell sub-populations previously described (30) were observed among CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD3⁺CD8⁺IFN- γ ⁺ T

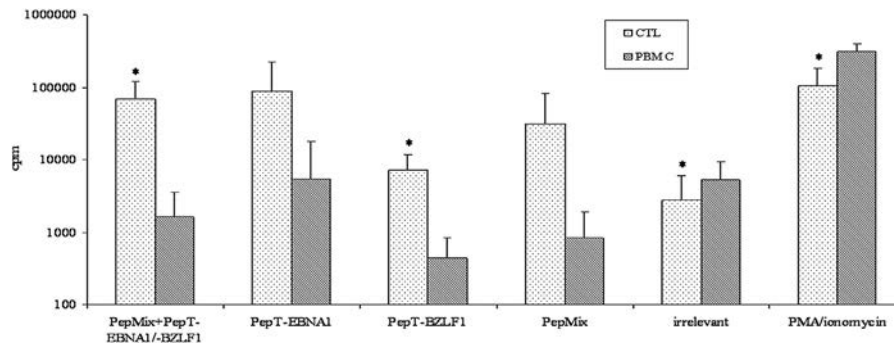


Figure 4. Proliferation assay: comparison between EBV-specific T cells and PBMCs before selection. Proliferative response was tested using the stimulating antigen, each component of the stimulating antigen or an irrelevant peptide pool as negative control. A significant increase in proliferative response was observed with stimulating antigen and one component of stimulating antigen: PepT-BZLF1 (* $P < 0.05$). The increase in proliferative response with the other two components, PepT-EBNA1 and PepMix, was not significant ($P > 0.05$). A significant decrease in proliferative response was observed in the presence of irrelevant antigen or PMA/ionomycin ($P < 0.05$).

cells. The effector memory T-cell compartment (T_{EM} , $CD45RA^-CCR7^-$) was the largest in both $CD3^+CD4^+IFN-\gamma^+$ and $CD3^+CD8^+IFN-\gamma^+$ T cells (79.14% and 86.01%, respectively). However, the T memory stem cell compartment (T_{SCM} , $CD45RA^+CCR7^+CD95^+$) was also identified in both $CD3^+CD4^+IFN-\gamma^+$ and $CD3^+CD8^+IFN-\gamma^+$ T cells (0.45% and 0.60%, respectively). T_{SCM} represented 80% of the $CD45RA^+CCR7^+CD3^+CD8^+IFN-\gamma^+$ T cells. Naïve T cells (T_N , $CD45RA^+CCR7^+CD95^-$) were present, mainly in $CD3^+CD4^+IFN-\gamma^+$ T cells (3.51%) (Figure 7).

After 10 days of culture with autologous feeder cells and IL-2, re-stimulated expanded EBV-specific T cells showed almost the same distribution reported after selection, with a 2-fold increase in T_{SCM} . The main difference observed was the decrease in the naïve $CD3^+CD4^+IFN-\gamma^+$ T cell compartment (0.05%).

Four samples of previously expanded EBV-specific T cells were thawed and further expanded for 1 week longer and then re-stimulated with stimulation antigen. Immunophenotyping showed that T_{EM} was the main sub-population in both $CD3^+CD4^+IFN-\gamma^+$ and $CD3^+CD8^+IFN-\gamma^+$ T cells (97.02% and 98.84%, respectively). A marked decrease in T_{CM}

and T_{SCM} frequencies was observed, and T_N were no longer detected.

Discussion

Adoptive transfer of EBV-specific T cells has been reported as efficient and safe in preventive and curative treatment of PTLN (14,22,23). Long-term specific immune reconstitution was described, and in a curative setting the latter was concomitant to EBV viral load clearance. Until 2010, most infused EBV-CTLs were produced using a time-consuming culture technique requiring dedicated facilities. More recently, a rapid immune-magnetic technique of EBV-specific T-cell production using a synthetic stimulating peptide pool antigen was reported (22). Moosmann *et al.* (22) reported good results with a non-clinical grade peptide pool from a large spectrum of EBV proteins, showing the importance of a wide panel of antigens to stimulate specific T cells efficiently. Icheva *et al.* (23) reported good clinical results with the PepT-EBNA1 stimulating peptide pool, the only clinical-grade peptide pool available at the time. On the basis of our successful experience of generating clinical-grade ADV-CTLs, we were interested in producing clinical-grade EBV-specific

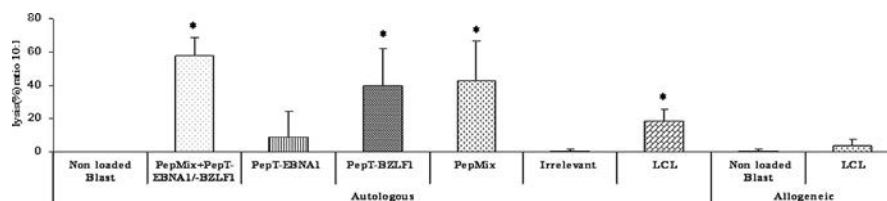


Figure 5. Cytotoxicity assay of expanded EBV-specific T cells. Specific lysis was tested against target cells: autologous or allogeneic LCL or PHA-blasts loaded with PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1, PepT-BZLF1, PepMix or PepT-EBNA1 at an effector-to-target cell ratio of 10:1. Non-loaded target cells or cells loaded with an irrelevant peptide pool were used as negative control. A significant specific lysis was observed against target cells loaded with the stimulating antigen or two components of the stimulating antigen, PepT-BZLF1 and PepMix, or against autologous LCL compared with non-loaded target cells or allogeneic LCL, respectively (* $P < 0.05$). Absence of alloreactivity of EBV-specific T cells was observed using allogeneic target cells.

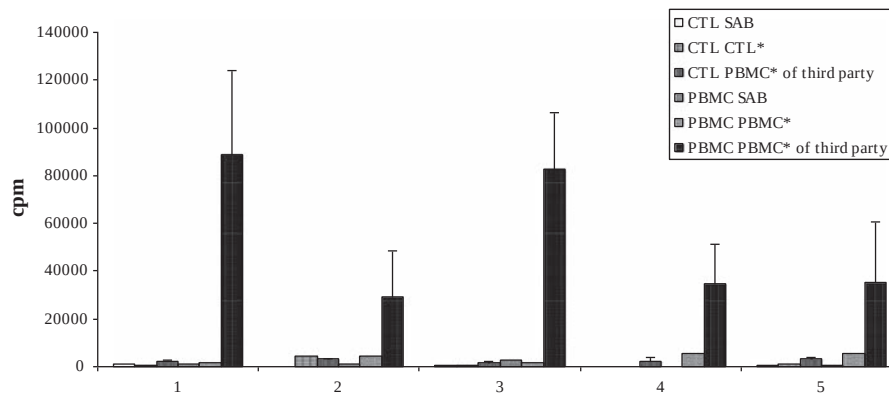


Figure 6. Detection of alloreactive proliferation of EBV-specific T cells compared with PBMCs before selection. Residual alloreactivity was measured for five expanded EBV-specific T cells in mixed lymphocyte reaction with irradiated PBMCs from two or three third-party donors. Results are expressed as a percentage of alloreactive proliferation with PBMCs before selection. A mean reduction of alloreactive proliferation of $94.7 \pm 3.3\%$ was observed with EBV-specific T cells compared with PBMCs.

T cells (29). The first step of this study consisted of choosing the antigen to stimulate EBV-specific T cells. In contrast to ADV or CMV, expressing one (Hexon protein for ADV) or two (pp65 and IE1 proteins for CMV) immunodominant proteins regardless of HLA typing, EBV presents several immunodominant proteins (nine latent proteins such as EBNA1, EBNA2, EBNA3A, 3B, 3C, LMP2 and many lytic proteins) with wide variations of specific immune response according to HLA typing (27). The immunodominance hierarchy of latent EBV proteins was defined as EBNA1 > EBNA3/LMP2 for CD4⁺ and EBNA3 > LMP2 > EBNA1 for CD8⁺ T cells (27,28). Donor EBV-LCL expresses the same spectrum of latent cycle antigens as PTLT patient tumor cells and proved to be an efficient stimulating antigen for the production of antiviral CTLs by cell culture (14). Although EBV cell lines express a wide spectrum of latent antigens, regardless of HLA typing, making EBV-LCL a “generic stimulating antigen,” it can hardly be used in a clinical setting because it requires almost 1–2 months to be generated (unless available in allogeneic cell banks).

As previously reported, a stimulating antigen composed of 15-mer peptides with 11 amino acid overlap and covering a whole immunodominant protein remains as flexible as a protein, without having production-related drawbacks, allowing for GMP-grade products (29,31). However, immunodominant EBV latent proteins are different depending on HLA typing (27). To define a generic antigen, a combination of peptide pools from different EBV latent proteins seemed necessary. It was reported that PTLT patient tumor cells could undergo lytic cycles, suggesting that selection of lytic antigen-specific T cells could be useful. We first tested the different peptide pools available for clinical

use (PepTivator-EBNA1, PepTivator-LMP2A and PepTivator-BZLF1; Miltenyi Biotec). The mean IFN- γ secretion observed was very low (82 ± 109 SFCs/ 10^6 PBMCs) compared with our previously reported results with EBV-LCL from healthy EBV-seropositive donors (1997 ± 813 SFCs/ 10^6 PBMCs) or even with PepTivator-ADV5 Hexon, where a low immune response is expected (135 ± 141 SFCs/ 10^6 PBMCs) (6,29). In contrast to Icheva *et al.* (23) who used PepT-EBNA1 in a clinical setting, we observed that only a few healthy donors among the 40 tested in ELISpot assays showed IFN- γ secretion. Because EBNA3 proteins are known to be highly immunogenic, we decided to evaluate the same EBNA3 peptides reported by Moosmann *et al.* (22) to which was added an EBNA3C peptide restricted to class II HLA DR1/DR4, a frequent HLA polymorphism in the white population (32). We observed that the combination of this PepMix with clinical-grade PepTivators available significantly increased ELISpot results. Considering the absence of any improvement in results after addition of PepT-LMP2A and even a trend to impairment, we finally concluded that PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1 was the optimal combination to stimulate EBV-specific T cells.

In the present study, we report rapid immunemagnetic selection of EBV-specific T cells, performing stimulation with the combination of three EBV synthetic peptide pools (two out of three with GMP-grade products: PepTivator-EBNA1 and PepTivator-BZLF1), and the possibility of isolation with the CliniMACS device, all the procedures being performed in a closed system. After isolation, we obtained a mean of $51.42 \pm 26.92\%$ of CD8⁺ cells secreting IFN- γ and $24.77 \pm 18.01\%$ of CD4⁺ cells secreting IFN- γ . These enrichment results are very similar to results reported by Moosmann *et al.* (22)

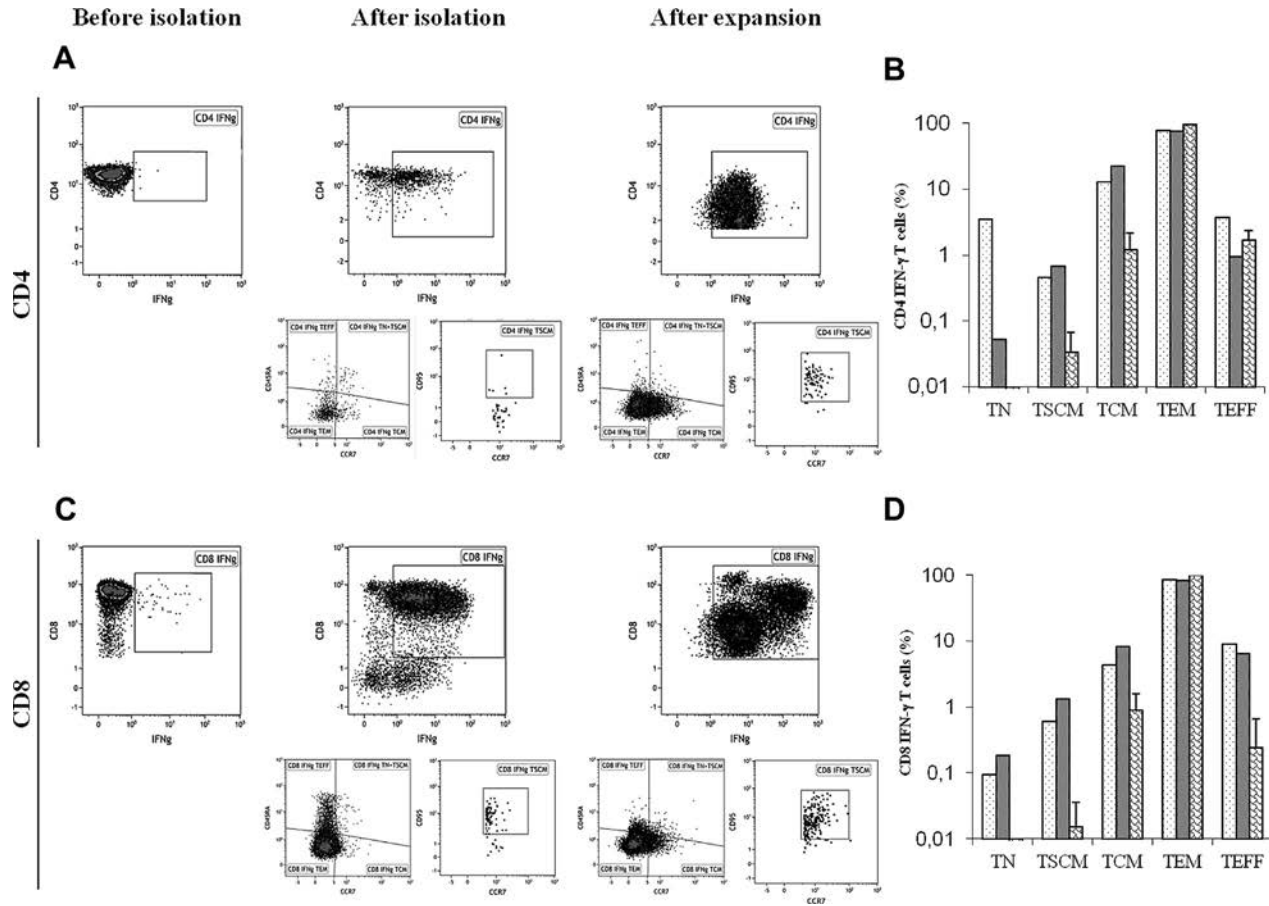


Figure 7. Phenotypic analysis of EBV-specific T cells. EBV-specific T cells before isolation ($n = 1$), after isolation ($n = 1$), after 10-day expansion ($n = 1$) and after thawing followed by a further week of expansion ($n = 4$) were analyzed with different markers. Data shown are gated on viable T lymphocytes, identified as LIVE/DEAD AQUA fluorescent-reactive dye negative and CD3 positive cells (not shown). Among CD4⁺ and CD8⁺ T cells, we defined CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD8⁺IFN- γ ⁺ EBV-specific T cells. Different T-cell sub-populations were identified according to their expression of CD45RA, CCR7 and CD95 among the gated EBV-specific T cells. Naïve T cells (T_N) were defined as CD45RA⁺CCR7⁺CD95⁻, T memory stem cells (T_{SCM}) were defined as CD45RA⁺CCR7⁺CD95⁺, central memory T cells (T_{CM}) were defined as CD45RA⁻CCR7⁺, effector memory T cells (T_{EM}) were defined as CD45RA⁻CCR7⁻ and effector T cells (T_{EFF}) were defined as CD45RA⁺CCR7⁻. (A and C) EBV-specific CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells before and after selection and after expansion ($n = 1$); EBV-specific T-cell sub-populations are also reported. (B and D) Comparison of frequencies between EBV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells before and after expansion ($n = 1$) and after thawing followed by 1 week of expansion ($n = 4$).

with a mean of $50 \pm 15\%$ and $26 \pm 20\%$ of CD8⁺ and CD4⁺ cells secreting IFN- γ . Except for CTL-6, more EBV-specific CD8⁺ T cells than EBV-specific CD4⁺ T cells were selected. As previously shown by Hislop *et al.* (27), there is a higher frequency of EBV-specific CD8⁺ T cells than CD4⁺ T cells in circulating blood of healthy people after EBV infection. We also report for the first time a single result for distribution of T-cell differentiation sub-populations, including the more recently described T_{SCM}, among IFN- γ ⁺ EBV-specific T cells after isolation. T_N, T_{SCM}, T_{CM}, T_{EM} and T_{EFF} were identified. Similar results were obtained by Feuchtinger *et al.* (21) with CMV-specific T cells, although they had not studied the IFN- γ ⁺ population or T_{SCM} (not described by then). T_{SCM}, a long-lived memory sub-population, with a high

proliferative potential and an enhanced capacity for self-renewal, is of great interest in adoptive immunotherapy for the treatment of cancer and infectious diseases (30,33). The frequency of T_{SCM} observed among CD45RA⁺CCR7⁺CD3⁺CD8⁺ EBV-specific T cells corresponds with the frequency of T_{SCM} reported among CD45RA⁺CCR7⁺CD3⁺CD8⁺ CMV-specific T cells in healthy donors (30). Although the number of isolated EBV-specific T cells available for infusion to patients is low, the presence of T_{SCM} allows for a high *in vivo* expansion potential on antigen stimulation.

Expansion of isolated T cells in the presence of IL-2 and autologous feeder cells was performed to obtain enough cells for functional assays. However, this expansion step is not required in the event of infusion to a patient because the viral load is

considered to contribute to *in vivo* CTL expansion (20). After a mean culture of 2 weeks, a mean of 2.24 Log expansion of total nucleated cells was achieved. IL-2 was chosen because it has been used for a long time, and it was reported more recently that adding γ c chain-receptor linking cytokines such as IL-7, IL-15 or IL-21 does not improve expansion compared with IL-2 (34,35). Additionally, it was reported that IL-2 changes neither the phenotypic (IL7R α , CD27, CD28 and CD62L) profile nor cytokine secretion function (INF- γ and tumor necrosis factor- α) of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (34). We performed a T-cell differentiation sub-population study on a single case after a 10-day expansion in the presence of IL-2. Our results showed a similar distribution of memory T cells compared with selection, with a 2-fold increase in T_{SCM} and T_{CM}, although T_N decreased markedly, especially in CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ T cells. However, an increased expansion time with IL-2 promoted T_{EM} in both CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD3⁺CD8⁺IFN- γ ⁺ T cells at the expense of T_{SCM} and T_N, which completely disappeared. Such results confirm that infused EBV-specific T cells and expanded EBV-specific T cells used for functional assays present the same distribution of T-cell differentiation sub-populations, provided that the expansion step does not exceed 2 weeks. Nevertheless, an impact of cryopreservation cannot be excluded. In a culture process of CTL production, Fujita *et al.* (35) described improved expansion of virus-specific T cells with IL-15, and Gerdemann *et al.* (36) reported that an IL-4 and IL-7 combination induced selective expansion of polyclonal T_H1-polarized T cells among CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

After expansion, we reported a marked increase in the proportion of CD4⁺IFN- γ ⁺ among CD4⁺ cells and weak variations in the proportion of CD8⁺IFN- γ ⁺ among CD8⁺ cells. However, in contrast to CD4⁺ cells, the proportion of CD8⁺ cells increased significantly during expansion, leading to a marked absolute increase in specific CD8⁺ T cells. Comparing CTL-3 and CTL-4 CD4⁺ cell compartments, we observed that in the first case, expansion was nearly exclusively in the EBV-specific population, whereas in the latter, expansion concerned both EBV-specific and non-specific T cells. Also, for CTL-4, we observed a population of T cells secreting both IFN- γ and IL-2 (1.2% among CD4⁺ cells and 1.9% among CD8⁺ cells). In CTL-6, a high proportion of CD8⁺ T cells secreted both cytokines (17.8%). These poly-functional T cells have been shown more recently to be very important for immune protection against EBV, and their presence in CTL may be beneficial (28). CTL-4 and CTL-3 showed the highest proliferative response to the stimulating antigen *in vitro* (97788 cpm and 115696

cpm, respectively). Expanded EBV-specific T cells exhibited a high specific cytotoxic lysis against targets loaded with the stimulating antigen ($57.6 \pm 11.5\%$), at an effector-to-target cell ratio of 10:1. We were pleasantly surprised by the cytotoxic lysis observed against autologous EBV-LCL: $18.3 \pm 7.3\%$, at the same ratio. Because EBV-LCL expresses all latent proteins encountered in PTLD, this result indicates that EBV-specific T cells have every chance of being efficient *in vivo*. Confirmation in the literature is difficult because the only *in vitro* studies relying on an EBV protein or peptide pool stimulation concern multi-pathogen CTL generation. However, Fujita *et al.* (35) reported that at the same ratio multi-virus-specific T cells stimulated with an Ad5f35-LMP2 vector presented a cytotoxic lysis of <5% against LCL and less than 10% against LCL loaded with LMP2. Such low results were explained by the occurrence of antigenic competition during stimulation. Khanna *et al.* (37) reported EBV-specific T-cell generation on the basis of CD154 expression after stimulation with an LMP2 peptide pool. The authors observed a cytotoxic lysis of 20% at a ratio of 20:1. Gerdemann *et al.* (36) generated multi-pathogen CTL with a culture technique using 15-mer peptide pools for stimulation. EBV stimulation was performed with EBNA1, LMP2 and BZLF1 peptide pools. For one donor, they reported specific lysis <10% with PHA-blasts pulsed with a peptide pool after 9 days of culture at a ratio of 40:1. This lysis increased to 30% after 16 days of expansion. Finally, Luthart *et al.* (38) proposed multi-pathogen CTL generation based on CD25 expression with a peptide pool stimulating antigen. For EBV, they used the peptide pool previously designed by Moosmann *et al.* (22). They observed specific cytotoxicity against autologous LCL of 32.2% at a ratio of 30:1 but also of 11.5% against allogeneic LCL.

As previously mentioned in previous immunomagnetic CTL generation protocols, alloreactivity was significantly reduced after selection and expansion. In our study, we report a $94.7 \pm 3.3\%$ reduction in alloreactivity compared with PBMCs before selection. We did not observe any cytotoxic lysis against allogeneic loaded target cells or allogeneic LCL. Taking into account such low alloreactivity and the low dose of CTL usually infused for adoptive transfer (around 10^4 CD3⁺ cells/kg body weight), the risk of inducing GVHD is very low, and GVHD is nearly never reported (15,16).

In conclusion, we could not generate clinical-grade EBV-specific T cells because GMP-grade EBNA3 family peptide pools are not yet available. However, the EBNA3 peptide pool is part of a pool that has already been used in a clinical study. Nevertheless, we showed that generating EBV-specific

T cells with a combination of peptide pools including EBNA3 family peptides is efficient *in vitro*, providing good specific cytotoxicity and practically devoid of alloreactivity. Additionally, we describe here for the first time the T_{SCM} sub-population in IFN- γ ⁺ EBV-specific T cells, which is of great interest for adoptive immunotherapy. We hope that our results will convince peptide manufacturers that EBNA3 peptide pools are essential to stimulate T cells effectively for IFN- γ -based CTL isolation and will encourage manufacturers to produce such a peptide pool under GMP conditions. Allogeneic EBV-specific T cells could be produced under GMP conditions, with good reactivity in the event of EBV infection or early-stage EBV-PTLD.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Direction de la Recherche Clinique from Nancy Hospital. We wish to thank Dr Delphine Sauce (INSERM UMR S 945, Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Paris, France) for her advice and helpful discussions.

Disclosure of interest: The authors have no commercial, proprietary or financial interest in the products or companies described in this article.

References

1. Rickinson AB, Moss DJ. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:405–31.
2. Mautner J, Bornkamm GW. The role of virus-specific CD4⁺ T cells in the control of Epstein-Barr virus infection. *Eur J Cell Biol.* 2012;91:31–5.
3. Callan MFC. The immune response to Epstein-Barr virus. *Microbes Infect.* 2004;6:937–45.
4. Landgren O, Gilbert ES, Rizzo JD, Socié G, Banks PM, Sobocinski KA, et al. Risk factors for lymphoproliferative disorders after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2009;113:4992–5001.
5. Styczynski J, Einsele H, Gil L, Ljungman P. Outcome of treatment of Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in hematopoietic stem cell recipients: a comprehensive review of reported cases. *Transpl Infect Dis.* 2009;11:383–92.
6. D'Aveni M, Aïssi-Rothé L, Venard V, Salmon A, Falenga A, Decot V, et al. The clinical value of concomitant Epstein Barr virus (EBV)-DNA load and specific immune reconstitution monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol.* 2011;24:224–32.
7. Cavazzana-Calvo M, Bensussan D, Jabado N, Haddad E, Yvon E, Moskwa M, et al. Prevention of EBV-induced B-lymphoproliferative disorder by ex vivo marrow B-cell depletion in HLA-phenotypical or non-identical T-depleted bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 1998;103:543–51.
8. Papadopoulos EB, Ladanyi M, Emanuel D, Mackinnon S, Boulad F, Carabasi MH, et al. Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1994;330:1185–91.
9. Kuehnle I, Huls MH, Liu Z, Semmelmann M, Krance RA, Brenner MK, et al. CD20 monoclonal antibody (rituximab) for therapy of Epstein-Barr virus lymphoma after hemopoietic stem-cell transplantation. *Blood.* 2000;95:1502–5.
10. Van Esser JW, van der Holt B, Meijer E, Niesters HG, Trensche R, Thijsen SF, et al. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation is a frequent event after allogeneic stem cell transplantation (SCT) and quantitatively predicts EBV-lymphoproliferative disease following T-cell-depleted SCT. *Blood.* 2001;98:972–8.
11. Feuchtinger T, Richard C, Pfeiffer M, Neuhauser F, Lücke J, Handgretinger R, et al. Adenoviral infections after transplantation of positive selected stem cells from haploidentical donors in children: an update. *Klin Padiatr.* 2005;217:339–44.
12. Heslop HE, Ng CY, Li C, Smith CA, Loftin SK, Krance RA, et al. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med.* 1996;2:551–5.
13. Rooney CM, Roskrow MA, Smith CA, Brenner MK, Heslop HE. Immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated cancers. *J Natl Cancer Inst Monographs* 1998;(23):89–93.
14. Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, Hale GA, Rousseau A, Smith CA, et al. Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood.* 2010;115:925–35.
15. Cruz CR, Hanley PJ, Liu H, Torrano V, Lin Y-F, Arce JA, et al. Adverse events following infusion of T cells for adoptive immunotherapy: a 10-year experience. *Cytotherapy.* 2010;12:743–9.
16. Melenhorst JJ, Leen AM, Bollard CM, Quigley MF, Price DA, Rooney CM, et al. Allogeneic virus-specific T cells with HLA alloreactivity do not produce GVHD in human subjects. *Blood.* 2010;116:4700–2.
17. Aïssi-Rothé L, Decot V, Wang YY, Stoltz J-F, Bensussan D. Apport des méthodes d'isolement immunomagnétique de lymphocytes T cytotoxiques dans la restauration rapide d'une immunité antivirale après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. *Revue Francophone des Laboratoires.* 2012;439:55–60.
18. Haque T, Wilkie GM, Taylor C, Amlot PL, Murad P, Iley A, et al. Treatment of Epstein-Barr-virus-positive post-transplantation lymphoproliferative disease with partly HLA-matched allogeneic cytotoxic T cells. *Lancet.* 2002;360:436–42.
19. Haque T, Wilkie GM, Jones MM, Higgins CD, Urquhart G, Wingate P, et al. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood.* 2007;110:1123–31.
20. Feuchtinger T, Matthes-Martin S, Richard C, Lion T, Fuhrer M, Hamprecht K, et al. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2006;134:64–76.
21. Feuchtinger T, Opher K, Bethge WA, Topp MS, Schuster FR, Weissinger EM, et al. Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood.* 2010;116:4360–7.

22. Moosmann A, Bigalke I, Tischer J, Schirrmann L, Kasten J, Tippmer S, et al. Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood*. 2010;115:2960–70.
23. Icheva V, Kayser S, Wolff D, Tuve S, Kyzirakos C, Bethge W, et al. Adoptive transfer of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific T cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2013;31:39–48.
24. Jones K, Nourse JP, Morrison L, Nguyen-Van D, Moss DJ, Burrows SR, et al. Expansion of EBNA1-specific effector T cells in posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood*. 2010;116:2245–52.
25. Haigh TA, Lin X, Jia H, Hui EP, Chan ATC, Rickinson AB, et al. EBV latent membrane proteins (LMPs) 1 and 2 as immunotherapeutic targets: LMP-specific CD4⁺ cytotoxic T cell recognition of EBV-transformed B cell lines. *J Immunol*. 2008;180:1643–54.
26. Merlo A, Turrini R, Dolcetti R, Martorelli D, Muraro E, Comoli P, et al. The interplay between Epstein-Barr virus and the immune system: a rationale for adoptive cell therapy of EBV-related disorders. *Haematologica*. 2010;95:1769–77.
27. Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:587–617.
28. Ning RJ, Xu XQ, Chan KH, Chiang AKS. Long-term carriers generate Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD4(+) and CD8(+) polyfunctional T-cell responses which show immunodominance hierarchies of EBV proteins. *Immunology*. 2011;134:161–71.
29. Aïssi-Rothé L, Decot V, Venard V, Jeulin H, Salmon A, Clement L, et al. Rapid generation of full clinical-grade human antiadenovirus cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother*. 2010;33:414–24.
30. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 2011;17:1290–7.
31. Kiecker F, Streitz M, Ay B, Cherepnev G, Volk H-D, Volkmer-Engert R, et al. Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides: what kind of peptide for which purpose? *Hum Immunol*. 2004;65:523–36.
32. Pedron B, Yakouben K, Adjaoud D, Auvrignon A, Landman J, Guerin V, et al. Listing of common HLA alleles and haplotypes based on the study of 356 families residing in the Paris, France, area: implications for unrelated hematopoietic stem cell donor selection. *Hum Immunol*. 2005;66:721–31.
33. Gattinoni L, Restifo NP. Moving T memory stem cells to the clinic. *Blood*. 2013;121:567–8.
34. Merlo A, Turrini R, Trento C, Zanovello P, Dolcetti R, Rosato A. Impact of γ -chain cytokines on EBV-specific T cell cultures. *J Transl Med*. 2010;8:121.
35. Fujita Y, Leen AM, Sun J, Nakazawa Y, Yvon E, Heslop HE, et al. Exploiting cytokine secretion to rapidly produce multivirus-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother*. 2008;31:665–74.
36. Gerdemann U, Keirnan JM, Katari UL, Yanagisawa R, Christin AS, Huye LE, et al. Rapidly generated multivirus-specific cytotoxic T lymphocytes for the prophylaxis and treatment of viral infections. *Mol Ther*. 2012;20:1622–32.
37. Khanna N, Stuehler C, Conrad B, Lurati S, Krappmann S, Einsele H, et al. Generation of a multipathogen-specific T-cell product for adoptive immunotherapy based on activation-dependent expression of CD154. *Blood*. 2011;118:1121–31.
38. Lugthart G, Albon SJ, Ricciardelli I, Kester MGD, Meij P, Lankester AC, et al. Simultaneous generation of multivirus-specific and regulatory T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother*. 2012;35:42–53.

Article 2: *Virus-specific T cell subsets in human peripheral blood and after IFN- γ immunomagnetic selection*

Etude des sous-populations de lymphocytes T spécifiques de virus

chez les donneurs sains et après isolement par technique

immunomagnétique basée sur la sécrétion d'IFN- γ

Article 2 :

Virus-specific T cell subsets in human peripheral blood and after IFN- γ immunomagnetic selection

Yingying WANG, Chongsheng QIAN, Huili CAI, Caroline LAROYE, Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT, Laurence CLEMENT Jean-François STOLTZ, Véronique DECOT, Danièle BENSOUSSAN

soumis

OBJECTIF :

Ce travail a été initié lors de ma dernière année de thèse, dans la continuité des résultats préliminaires qui avaient été obtenus avec les CTL-EBV. Le but de notre étude a été de déterminer le phénotype des lymphocytes T composant les cellules T spécifiques anti-virales (Virus Specific T cells : VSTs). Par la suite nous utiliserons indifféremment les abréviations CTL et VSTs. Nous avons caractérisé les différentes sous-populations présentes dans le sang périphérique de donneurs sains avant et après sélection immunomagnétique de CTL, et comparé la composition de l'échantillon de CTL sélectionnés avant et après expansion *in vitro* en présence d'IL-2. Nous avons également pour objectif de déterminer si les conditions de culture peuvent influencer sur le phénotype des CTL et en conséquence biaiser les résultats des tests qualités. Cette étude a été réalisée sur tous les échantillons de CTL obtenus en recherche (CTL-CMV) ou en recherche clinique (CTL-ADV) en complément de l'analyse cytométrique de contrôle qualité. Ce travail a fait l'objet d'une collaboration avec la Plateforme Nancytomique du CHU de Nancy. Pour la conception de la stratégie d'analyse, nous avons bénéficié des conseils du Dr Sauce (INSERM U1135-UPC UMRS CR7, Paris 6).

MATERIELS ET METHODES :

Les VSTs -ADV et -CMV ont été marqués par les anticorps de cytométrie anti-CD4,

anti-CD8, anti-CD3, anti-CD45RA, anti-CD197 (CCR7), anti-CD95, anti-IFN- γ , ainsi que par le marqueur de viabilité LIVE/DEAD AQUA fluorescent, avant et après sélection immunomagnétique. La sélection des VSTs a été effectuée comme décrit précédemment (Aïssi-Rothé *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2014). Une fois sélectionnés, les VSTs-ADV ont été amplifiés *in vitro* en présence d'IL-2 puis marqués de façon extracellulaire et intracellulaire après perméabilisation membranaire, par les anticorps précédemment cités. L'expression des marqueurs CCR7, CD45RA, et CD95 au sein des populations T CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ et T CD3⁺CD8⁺IFN- γ ⁺ viables a été analysée sur un cytomètre de type Navios (Beckman Coulter). Les lymphocytes T_N, T_{SCM}, T_{CM}, T_{EM}, et T_{EFF} ont été définis comme étant respectivement : CD45RA⁺CCR7⁺CD95⁻; CD45RA⁺CCR7⁺CD95⁺; CD45RA⁻CCR7⁺; CD45RA⁻CCR7⁻; CD45RA⁺CCR7⁻. L'acquisition d'un grand nombre d'évènements (500 000 évènements) a permis une analyse fine de chaque sous-population avec une stratégie de fenêtres successives. Les analyses ont été effectuées *via* le logiciel d'analyse « Kaluza » (Beckman Coulter).

RESULTATS :

Dans le sang circulant de donneurs sains, la fréquence des lymphocytes T CD4 et CD8 anti-ADV (n=2) et anti-CMV (n=7) est faible mais cohérente avec la littérature. Toutes les sous-populations ont pu être identifiées au sein des lymphocytes T spécifiques CD3⁺IFN- γ ⁺ selon une répartition relativement homogène, même si le nombre d'évènements observés dans la fenêtre CD45RA⁺CCR7⁺ était parfois insuffisant pour effectuer une discrimination entre T_N et T_{SCM} sur l'expression du CD95. Cette distinction entre ces deux sous-populations a pu être faite dans 2 cas, montrant une bonne représentation de la population T_{SCM} (de l'ordre de 20%). Après sélection immunomagnétique, la concentration des sous-populations les plus matures, est observée. En effet, au sein des VSTs-ADV sélectionnés (n=5), les T_{EM} sont majoritaires, avec en moyenne 93,31±4,48% des CD4⁺IFN- γ ⁺ et 70,94±19,25% des CD8⁺IFN- γ ⁺. Les T_{EFF}, quant à eux, représentent respectivement 3,67±3,81% et 26,94±19,46% des lymphocytes T CD4⁺IFN- γ ⁺ et T CD8⁺IFN- γ ⁺. Tout comme les VSTs-ADV, les VSTs-CMV sélectionnés sont majoritairement composés de T_{EM}

(CMV-1: 94,07%; CMV-2: 93,13% pour les $CD4^+IFN-\gamma^+$). Cependant et contrairement aux VSTs-ADV, cette nette pré-dominance des sous-populations T_{EM} disparaît au profit des T_{EFF} pour les $CD8^+ IFN-\gamma^+$ (respectivement 40,57% et 57,11% de T_{EM} pour CMV-1 et CMV-2). Enfin, la sous-population T_{SCM} n'a pas été identifiée parmi les VSTs-ADV $CD4^+IFN-\gamma^+$ alors qu'elle est présente dans les $CD8^+IFN-\gamma^+$ à une fréquence de $0,75\pm 1,14\%$. En comparaison cette fréquence est particulièrement élevée dans les $CD8^+IFN-\gamma^+$ des VST-CMV-1 (11,39%). Nous avons émis l'hypothèse que le système immunomagnétique concentrait les populations les plus matures, c'est-à-dire celles qui sécrètent le plus d' $IFN-\gamma$. Il est probable que les populations les moins différenciées présentent une intensité de sécrétion d' $IFN-\gamma$ qui soit certes suffisante pour une détection par cytométrie en flux mais insuffisante pour une sélection immunomagnétique. Toutefois, le même profil n'étant pas observé avec le CMV, ni avec l'EBV (cf article précédent), on peut supposer que l'intensité de sécrétion d' $IFN-\gamma$ des sous-populations les moins différenciées après stimulation par un virus latent est très supérieure à ce qui peut être observé avec l'ADV. Nous avons également soulevé dans cet article le fait surprenant que la population T_N soit présente au sein de VSTs qui sécrètent de l' $IFN-\gamma$ et nous pensons qu'il s'agit de lymphocytes T en cours de transition vers un phénotype mémoire ayant déjà acquis une partie des fonctions des T mémoires. Cette observation renforce l'hypothèse d'un modèle progressif où les sous-populations les moins différenciées donnent naissance aux plus différenciées.

Après une expansion de plusieurs jours en présence d'IL-2, une analyse phénotypique des CTL anti-ADV, a été effectuée. Une disparition de la sous-population T_N a été observée aussi bien parmi les lymphocytes T $CD4^+IFN-\gamma^+$ que les lymphocytes T $CD8^+IFN-\gamma^+$. De même, les $CD8^+IFN-\gamma^+ T_{SCM}$ ne sont plus présents après expansion *in vitro*. Les T_{EM} restent quant à eux largement représentés et constituent la sous-population majoritaire avec en moyenne $99,30\pm 0,52\%$ de $CD4^+IFN-\gamma^+ T_{EM}$ et $98,43\pm 2,90\%$ de $CD8^+ IFN-\gamma^+ T_{EM}$. Enfin, il a été observé que l'expansion *in vitro* en présence d'IL-2 entraîne au sein de l'échantillon de CTL sélectionnés, une

augmentation des sous-populations T_{EM} (65,53% vs 98,43%) et une diminution des sous-populations T_{EFF} (32,31% vs 0,93%) CD8⁺IFN- γ ⁺ T.

CONCLUSION :

Ce travail a permis de caractériser les sous-populations lymphocytaires des VSTs présentes *in vivo* chez les donneurs sains en prenant en considération les sous populations mémoires les moins différenciées. En revanche, la sous-population T_{SCM} est très minoritaire dans le produit d'immunothérapie adoptive antivirale où sont principalement concentrées les sous-populations les plus différenciées. Toutefois, la population T_{SCM}, même faiblement représentée peut suffire à maintenir une réponse immunitaire chez les patients le temps qu'ils reconstituent leur immunité à partir du greffon de CSH, compte tenu de ses potentiels d'autorenouvellement et d'expansion particulièrement intéressants. La culture cellulaire en présence d'IL-2 semble aboutir à des modifications phénotypiques des CTL. L'impact de l'homéostasie cytokinique au cours d'une expansion *in vitro* de CTL devra être confirmé par des études complémentaires utilisant d'autres cytokines telles que l'IL-15 et l'IL-7.

Virus-specific T cell subsets in human peripheral blood and after IFN- γ immunomagnetic selection

**Yingying WANG^{a,b#}, Chongsheng QIAN^{a,b#}, Huili CAI^d, Caroline LAROYE^{a,b}
Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT^d, Laurence CLEMENT^e,
Jean-François STOLTZ^{a,b}, Véronique DECOT^{a,b}, Danièle BENSOUSSAN^{a,b,c}.**

^aCHU de Nancy, Unité de Thérapie cellulaire et Tissus and FR 3209, Vandoeuvre-Lès-Nancy, F54511-France.

^bUniversité de Lorraine, UMR 7563 and FR 3209 CNRS-INSERM-UL-CHU, Vandoeuvre-Lès-Nancy, F54511-France.

^cUniversité de Lorraine, Faculté de Pharmacie, Département de Microbiologie-Immunologie, Nancy, F54001, France.

^dCHU de Nancy, Laboratoire d'Immunologie and Plateforme Nancytomique, Vandoeuvre-lès-Nancy, F54511, France

^eCHU de Nancy, Unité de Transplantation Médullaire Allogénique, Vandoeuvre-lès-Nancy, F54511, France

These two authors contributed equally to the work

Corresponding author:

Prof. Danièle Bensoussan,
Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus,
CHU de Nancy, Allée du Morvan,
54511 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
Phone: +33 (0)3 83 15 48 69
E-mail: d.bensoussan@chu-nancy.fr

ABSTRACT

Due to its efficacy in restoring anti-viral immunity and its absence of toxicity, adoptive anti-viral cellular immunotherapy by infusion of virus-specific T cells (VSTs) is becoming an alternative treatment of viral infection after hematopoietic stem cell transplantation. The recently described Stem cell-like memory T cell subset (T_{SCM}) plays a crucial role in immunotherapy, exhibiting self-renewal and multipotency properties required for sustained efficacy *in vivo*. We identified T_{SCM} in adenovirus (ADV)- and cytomegalovirus (CMV)- specific IFN- γ +T cells before and after IFN- γ based immunomagnetic selection. Moreover, we analyzed the distribution of the main T-cell subsets in VSTs: Naive T cells (T_N), T_{SCM}, Central memory T cells (T_{CM}), Effector memory T cells (T_{EM}) and Effector T cell (T_{EFF}) after selection. In this study, we report that healthy donors present with a panel of heterogeneous VSTs, while the IFN- γ based immunomagnetic selection system sorts the most differentiated T-cell subsets. Comparing T-cell sub-population profiles before and after *in vitro* expansion, we observed that *in vitro* cell culture with IL-2 facilitates the differentiation process towards the most mature memory stages.

KEY WORDS

Adoptive immunotherapy, IFN- γ based immunognetic isolation, T cell subsets, T memory stem cells (T_{SCM}), Virus-specific T cells

ABBREVIATION

ADV, adenovirus

CMV, cytomegalovirus

EBV, Epstein-Barr virus

GvHD, Graft versus Host Disease

GMP, Good Manufacturing Practice

HSCT, hematopoietic stem cell transplantation

PBMCs, Peripheral blood mononuclear cells

T_N, naive T cells

T_{EFF}, effector T cells

T_{SCM}, T memory stem cells

T_{CM}, T central memory cells

T_{EM}, T effector memory cells

VSTs, virus-specific T cells

1. INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the standard treatment for malignant and non-malignant hematological disorders and primary immunodeficiencies. However, after HSCT, patients are deeply immunocompromised and susceptible to viral infections which are a major cause of morbidity and mortality. Combining viral load determination and specific anti-viral immune monitoring can help to implement pre-emptive anti-viral treatment before any onset of clinical signs which is important to control viral infection [1]. Nevertheless, although anti-viral agents are now available for most types of viral infections, they are not devoid of side effects and their efficacy is sometimes limited in the absence of concomitant anti-viral immune reconstitution [2]. A promising alternative is to reconstitute the recipient's specific anti-viral immunity with donor's virus-specific T cells (VSTs), either produced by cell culture during 2 to 8 weeks, or isolated by rapid immunomagnetic selection of IFN- γ secreting T cells within less than 48 hours [3,4].

These approaches have been proved feasible, and effective as prophylaxis and curative treatment of Epstein-Barr virus (EBV)[3,5,6], cytomegalovirus (CMV)[7] and adenovirus (ADV)[8] infections. They are rarely associated with adverse events or Graft versus Host Disease (GvHD)[9,10]. IFN- γ -based immunomagnetic isolation exhibits the advantage of being a fast Good Manufacturing Practice (GMP)-grade procedure. Up to now, 48 patients have been reported in the literature to have been treated by IFN γ + VSTs (ADV n=14; EBV n=16; CMV n=18) with doses ranging from 0.15 to 166×10^3 IFN- γ ⁺ T cells /kg in five clinical studies[5-8,11]. Among the 38 evaluable patients, 31 experienced reduction or complete clearance of viral load (81.6%) and simultaneous *in vivo* expansion of VSTs.

As very few VSTs are available after isolation for infusion into the recipients, efficiency may depend both on an immediate cytotoxic effect to quickly decrease viral load and on high *in vivo* expansion of VSTs which restore anti-viral immunity, repopulating the memory T cell compartment and generating new cytotoxic T cell effectors.

T cells are heterogeneous with three main different compartments: naive T cells (T_N), memory T cells and effector T cells (T_{EFF}). Different subsets have been described in the memory T cell compartment: T memory stem cells (T_{SCM}); T central memory cells (T_{CM}); T effector memory cells (T_{EM}) [12]. All these sub-populations present different functions such as proliferation mainly in T_{SCM} and cytotoxicity mainly in T_{EM} , and are important for successful anti-viral immunotherapy [13]. According to the recently reported T cell linear developmental model, T_N directly differentiates into memory T cells, differentiating first into T_{SCM} , then T_{CM} , and T_{EM} . Finally, these memory T cells can develop into terminal effector T cells, T_{EFF} which die rapidly after cytotoxicity [14]. The previous competing model named the “Off-On-Off model”, where T_{EFF} were aimed either to die or to enter into the T_{EM} compartment, still co-exists. The recently described T_{SCM} memory subset has similar features to stem cells, possessing high self-renewal ability, proliferative capacities estimated 10 to 100 fold higher in comparison to T_{CM} and T_N , and strong potential to generate other T cell compartments [12,15]. Indeed, it is thought to play a prominent role in successful T cell therapy. T_{SCM} has been shown to support a long life-span *in vivo* and sustained efficacy of infused T cells for anti-virus or anti-tumor cellular immunotherapy [13].

Thus, it seems relevant to identify T-cell subset distribution among VSTs after IFN- γ based immunomagnetic selection. IFN- γ selected VSTs sub-populations were first studied in ADV-specific T cells by Feuchtinger *et al.*, in 2008 [16]. Using an individual staining, the authors concluded to an intermediate effector phenotype. In 2010, the same group identified in CMV-specific T cells that T_{CM} ($CD45RO^+CD62L^-$) and T_{EM} ($CD45RO^+CD62L^-$) were the main subsets of the $CD3^+$ T cell compartment (containing 65 ± 31 % IFN- γ^+), while T_N ($CD45RO^-CD62L^-$) cells represented less than 10% in both $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells after selection [7]. Another study performed on IFN- γ selected EBV-specific T cells showed that the T_{CM} ($CCR7^+CD45RA^-$) was the most important sub-population observed after selection among $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, whereas after a 2-week expansion, the T_{EM} ($CCR7^-CD45RA^-$) and T_{EFF} ($CCR7^-CD45RA^+$) sub-populations were predominant [17]. More recently, our group, using another stimulating antigen, identified T_{EM} as the main sub-population among

CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD8⁺IFN- γ ⁺ EBV-specific T cells and described for the first time, the presence of the T_{SCM} sub-population [18]. After a 10-day cell culture, T-cell sub-populations retained a similar profile to that before expansion with a slight decrease in T_N and an increase in T_{SCM}.

In this study, our aim was to identify the different T-cell subsets among IFN- γ -selected VSTs. Considering T_{SCM} importance in cellular immunotherapy, we were interested in identifying this sub-population. Moreover, as functional controls of virus-specific IFN- γ ⁺ T cells are performed after *in vitro* IL-2-expansion, we investigated whether the T-cell sub-population profile was maintained during expansion.

2. MATERIALS & METHODS

2.1 Virus-specific T cells production and expansion

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from healthy donor peripheral blood by Lymphoprep density gradient centrifugation (Abcys, Paris, France) or from leukapheresis collections after informed consent. Recovered PBMCs were stimulated for 6 hours with synthesized antigens: PepTivator-ADV5 Hexon or PepTivator-CMVpp65 (Miltenyi Biotec). These cells were subsequently processed using the IFN- γ based immunomagnetic technology as previously described [18, 20]. Finally the VSTs were obtained. Then after immediate phenotypic analysis, the remaining VSTs were cultured for 2 to 4 weeks in RPMI-1640 supplemented with 10% human AB serum and 100 IU/mL of interleukin (IL)-2 (Pepro-Tech, TEBU, Paris, France) in a culture flask. Irradiated autologous feeder cells from the negative fraction were added at day 0 and day 7 at a ratio of 100:1 and 10:1, respectively. Cultures were fed with fresh culture medium every 2 days.

2.2 Virus-specific T-cell Sub-population analysis

VSTs in healthy donors (CMV-1, CMV-2, ADV-1 and ADV-2), freshly selected VSTs (n=2 for CMV and n=5 for ADV) and expanded ADV-specific T cells (n=4) after specific antigenic restimulation, were stained by LIVE/DEAD AQUA fluorescent-reactive dye (Life Technologies, Saint Aubin, France), ECD-anti-CD4

(Beckman Coulter), APC-Alexa Fluor 700 anti-CD8 (Beckman Coulter), APC-Alexa Fluor 750 anti-CD3 (Beckman Coulter), V450-anti-CD45RA (BD Biosciences), PE-Cy7-anti-CD197 (CCR7) (BD Biosciences), PE-Cy5-anti-CD95 (Biolegend, San Diego, CA, USA) and PE-anti-IFN- γ (Miltenyi Biotec) antibodies. For expanded cells, extracellular staining was performed first, followed by cell fixation and permeabilization then intracellular IFN- γ cytokine staining. Viable T cells were identified as CD3⁺ and LIVE/DEAD AQUA⁻. Among these cells, virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells were identified as CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD3⁺CD8⁺IFN- γ ⁺. Then CCR7, CD45RA were used to identify four groups of these VSTs: T naive-like cells (T_{N-like}) were defined as CD45RA⁺CCR7⁺; T central memory cells (T_{CM}) as CD45RA⁻CCR7⁺; T effector memory cells (T_{EM}) as CD45RA⁻CCR7⁻ and T effector cells (T_{EFF}) as CD45RA⁺CCR7⁻. Finally, CD95 staining was used to discriminate between T naive cells (T_N): CD45RA⁺CCR7⁺CD95⁻ and T memory stem cells (T_{SCM}): CD45RA⁺CCR7⁺CD95⁺ (Figure 1). These analyses were performed by flow cytometry with acquisition of 500,000 events per sample on a Navios cytometer (Beckman Coulter). Kaluza software (v1.2; Beckman Coulter) was used for analysis.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Frequency of VSTs in circulating lymphocytes

ADV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell frequency was determined in two healthy donors after stimulation with the Peptivator-ADV5 Hexon peptide pool before immunomagnetic selection: ADV-1 (0.04% and 0.08%, respectively) and ADV-2 (0.17% and 0.05%, respectively). This frequency is consistent with previously reported results with cytokine detection assay (Miltenyi Biotec) among healthy donors using the same stimulation antigen. Zandvliet observed a frequency of 0.01-0.12% and 0.00-0.51% for ADV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells respectively in six donors [19]. Our group previously reported a frequency of 0.04-0.58% for ADV-specific CD4⁺ T cells and 0.02-0.72% for ADV-specific CD8⁺ T cells in ten healthy donors [20].

CMV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell frequency was determined in seven different

healthy donors after stimulation with the Peptivator-CMV pp65 peptide pool. A frequency of 0.03-0.43% for CMV-specific CD4⁺ T cells and 0.006-0.57% for CMV-specific CD8⁺ T cells was observed. Using the same stimulation antigen in 60 healthy donors, Nager *et al*, reported a similar frequency of CMV-specific CD4⁺ T cells with a median of 0.15% (range : 0.06-0.61%) but a higher frequency of CMV-specific CD8⁺ T cells with a median of 0.31% (range: 0.14-1.06%)[21]. Although detection was performed by intra-cellular staining assay, the difference may result from individual variation.

The distribution of these four subsets: T_{N-like} (CD45RA⁺CCR7⁺), T_{CM}, T_{EM} and T_{EFF} was shown for CMV- and ADV-specific CD3⁺ T cells, respectively (Figure 2a). The T_{N-like} compartment represents nearly a quarter of virus-specific CD3⁺ T cells regardless of the antigen used, except for ADV-2 where it is the main sub-population (41.54%). The T_{CM} compartment ranges from 5.78% to 18.48%. The T_{EM} compartment represents nearly 30% of virus-specific CD3⁺ T cells regardless of the antigen used, except for CMV-2 where it is the main sub-population (46.67%). Finally, T_{EFF} ranges from 13.85% to 31.25% in CMV- and ADV- donors. Thus, all the four subsets mentioned above could be identified with a relatively homogeneous distribution. Presence of T_{EFF} can be related to previous viral-antigen stimulation [22]. For two donors, a relevant number of events was acquired in the CD45RA⁺CCR7⁺ T cell gate, making it possible to discriminate between T_N and T_{SCM} sub-populations based on CD95 expression. The T_{SCM} sub-population represented 24.9% of ADV- and 17.5% of CMV-specific CD3⁺ T cells (ADV-2 and CMV-2). To our knowledge, this is the first report quantifying this critical compartment among VSTs in healthy donors.

3.2 Impact of IFN- γ based immunomagnetic isolation on the distribution of VSTs subsets

After isolation, a similar modification of T-cell subset distribution was observed in both ADV- and CMV- specific T cells. All four CD3⁺ T-cell compartments were still present. However, T_{EM} underwent marked enrichment after isolation up to 82%. The T_{EFF} sub-population was the second dominant subset with a similar proportion as that

observed before isolation in healthy donors (range: 12 to 20%). Conversely, a dramatic proportional decrease in less differentiated T cells ($T_{N\text{-like}}$ and T_{CM}) occurred (Figure 2a). As recently reported, the less differentiated T cells ($T_{N\text{-like}}$ and T_{CM}) secrete less IFN- γ compared to the more differentiated T cells (T_{EM} and T_{EFF}) [23]. Furthermore, this IFN- γ based immunomagnetic selection system sorts preferentially highly IFN- γ secreting cells. One explanation could be that although less differentiated T cells secrete IFN- γ and can be identified by flow cytometry, secretion intensity may be too low to enable effective immunomagnetic selection.

3.3 Compartmentalization of virus-specific CD4+ and CD8+ T cells

After isolation, thanks to the enrichment in VSTs, sub-population analysis could be performed on virus-specific CD4+ and CD8+ T cells. Acquisition of a relevant number of cells in the CD45RA⁺CCR7⁺ T cell gate allowed for identification of the T_{SCM} sub-population among the $T_{N\text{-like}}$.

In ADV-specific T cells (n=5), we confirmed that T_{EM} was the major compartment in both CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD8⁺IFN- γ ⁺ T cells, with a mean of 93.31±4.48% and 70.94±19.25%, respectively. T_{EFF} represented a mean of 26.94±9.46% of CD8⁺IFN- γ ⁺ compared to a mean of 3.67±3.81 % of CD4⁺IFN- γ ⁺ (Figure 2b). Interestingly, no T_{SCM} were detected in CD4⁺IFN- γ ⁺ T cells, while anti-ADV immune response relies mainly upon CD4+ T cells [24].

Although naive, memory and effector phenotypes have been identified in CD4+ T cells, association to a specific function is less obvious than for CD8+T cells [25]. Indeed, depending on the cytokine environment and the type of antigenic challenge, CD4+ T cells differentiate into either T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} or Treg. It has been recently reported that T_{H17} , but not T_{H1} , share a stem-cell-like molecular signature with T_{SCM} [26]. However, only T_{H1} cells secrete high levels of IFN- γ and are isolated by the MACS device. Otherwise, T_N cells were identified in CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD8⁺IFN- γ ⁺ T cells. Although this population retained a naive phenotype, it may no longer consist in real T_N cells as it was identified among IFN- γ secreting cells that encountered the antigen. Hence, this population acquired memory functions moving into a transition

stage [27]. This compartment should be called $T_{N-IFN-\gamma^+}$.

In CMV-specific T cells (n=2), although we confirmed that T_{EM} was the major compartment in $CD4^+IFN-\gamma^+$ T cells (CMV-1: 94.07%; CMV-2: 93.13%), this was no longer the case for $CD8^+IFN-\gamma^+$ T cells, where T_{EM} was decreased to the benefit of T_{EFF} (CMV-1: 40.57%; CMV-2: 57.11%). Unlike ADV-specific T cells, T_{SCM} was detected in both $CD4^+$ and $CD8^+IFN-\gamma^+$ T cells and noticeably in high levels in the $CD8^+IFN-\gamma^+$ T cells of CMV-1 (11.39%). Indeed, T_{SCM} frequency of 0.45% and 0.60% in $CD4^+IFN-\gamma^+$ and $CD8^+IFN-\gamma^+$ T cells, respectively, was previously reported in IFN- γ selected EBV-specific T cells [18]. Finally, it seems that for latent viruses like EBV and CMV with a relatively high frequency of VSTs, IFN- γ secretion intensity of $CD4^+T_{SCM}$ cells could be high enough to promote good capture by immunomagnetic beads resulting in the presence of T_{SCM} in both EBV- and CMV-specific $CD4^+IFN-\gamma^+$ T cells.

3.4 Impact of cell culture on compartmentalization of ADV-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells

After expansion, the extinction of T_N in both ADV-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, as well as that of T_{SCM} in $CD8^+$ T cells, was observed. Surprisingly, emergence of a small T_{SCM} sub-population in $CD4^+IFN-\gamma^+$ T cells occurred. According to the linear developmental model, this population probably comes from the $T_{N-IFN\gamma^+}$ compartment [14]. Using IL-2 for expansion promotes T cell differentiation, leading the less differentiated cells to move into more differentiated stages. Conversely, an IL-7 and IL-15 cocktail was shown to maintain self-renewal of less differentiated T cells [25, 28].

In both $CD4^+IFN-\gamma^+$ and $CD8^+IFN-\gamma^+$ T cells, the T_{EM} was the predominant compartment with a mean of $99.30 \pm 0.52\%$ and $98.43 \pm 2.90\%$, respectively. In contrast with this remarkable increase in T_{EM} in $CD8^+IFN-\gamma^+$ T cells (65.53% vs 98.43%), a dramatic decrease in T_{EFF} in $CD8^+IFN-\gamma^+$ T cells (32.31% vs 0.93%) was observed (Figure 2c). *In vivo* contraction of T_{EFF} by apoptosis after pathogen elimination is estimated at approximately 95% [29]. The remaining 5% forms the memory T-cell

population according to the Off-On-Off model [14]. During *in vitro* expansion, in the absence of viral antigen, the decrease in T_{EFF} could result from such a contraction into T_{EM} . Finally, expansion leads to a different T-cell sub-population profile from that after selection, with exclusive T_{EM} representation, which may introduce a bias; functional assays performed on expanded cells may not reflect exactly the capacity of VSTs after selection. However, the clinical experience of infusion of EBV-specific T cells marked with the retroviral vector GINa in 26 patients highlighted *in vivo* persistence of gene-marked cells that could be detected in peripheral blood for as long as 105 months after CTL infusion [3]. The long persistence of infused EBV-specific T cells may rely on the self-renewability of the CD62L⁺ less differentiated memory subset which is still weakly identified after a 4-week culture with IL-2.

4. CONCLUSION:

In this study, we demonstrated the presence of all T-cell subsets in IFN- γ selected virus-specific CD3⁺ T cells, especially the T_{SCM} sub-population *in vivo*, while it was only weakly selected by the IFN- γ based immunomagnetic device. This was probably because of the low intensity of IFN- γ secretion mainly against viruses generating a mild T cell response such as ADV. However, even when slightly represented, T_{SCM} could be sufficient, though the minimum number of these stem cells required to enable persistence of anti-viral immunity *in vivo* in immunocompromised patients until onset of immune reconstitution is not yet known. T_{EM} was always the major T-cell subset after isolation and especially after expansion both in ADV- and CMV-specific T cells. The presence of T_{EM} is important in establishing a cytotoxic effect after VSTs infusion. Monitoring the fate of infused VSTs during clinical trials will provide information on the critical number of each subset required for sustained efficacy.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the *Programme Hospitalier de Recherche Clinique* and the *Direction de la Recherche Clinique* from Nancy Hospital, *l'Agence de la Biomédecine* and *Centpoursang la vie association*. We wish to thank Dr Delphine Sauce (INSERM U1135-UPC UMRS CR7, Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Paris, France) for her advice and helpful discussions.

Conflict of Interest

The authors have no commercial, proprietary or financial interest in the products or companies described in this article.

References

1. D'Aveni M, Aïssi-Rothé L, Venard V, Salmon A, Falenga A, Decot V, et al. The clinical value of concomitant Epstein Barr virus (EBV)-DNA load and specific immune reconstitution monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol*. 2011.24(4):224–32.
2. Feuchtinger T, Richard C, Pfeiffer M, Neuhäuser F, Lücke J, Handgretinger R, et al. Adenoviral infections after transplantation of positive selected stem cells from haploidentical donors in children: an update. *Klin Padiatr*. 2005.217(6):339–44.
3. Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, Hale GA, Rousseau A, Smith CA, 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):925–35.
4. Heslop HE, Leen AM. T-cell therapy for viral infections. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013.2013:342–7.
5. Moosmann A, Bigalke I, Tischler J, Schirrmann L, Kasten J, Tippmer S, et al. Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood*. 2010.115(14):2960–70.
6. Icheva V, Kayser S, Wolff D, Tuve S, Kyzirakos C, Bethge W, et al. Adoptive transfer of epstein-barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific t cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2013.31(1):39–48.
7. Feuchtinger T, Opher K, Bethge WA, Topp MS, Schuster FR, Weissinger EM, et al. Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood*. 2010.116(20):4360–7.
8. Feuchtinger T, Matthes-Martin S, Richard C, Lion T, Fuhrer M, Hamprecht K, 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.
9. Cruz CR, Hanley PJ, Liu H, Torrano V, Lin Y-F, Arce JA, et al. Adverse events following infusion of T cells for adoptive immunotherapy: a 10-year experience. *Cytotherapy*. 2010 .12(6):743–9.
10. Melenhorst JJ, Leen AM, Bollard CM, Quigley MF, Price DA, Rooney CM, et al. Allogeneic virus-specific T cells with HLA alloreactivity do not produce GVHD in human subjects. *Blood*. 2010.116(22):4700–2.

11. Qasim W, Gilmour K, Zhan H, Derniame S, McNicol AM, Ip W, et al. Interferon- γ capture T cell therapy for persistent Adenoviraemia following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2013.161(3):449–52.
12. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 2011.17(10):1290–7.
13. Gattinoni L, Restifo NP. Moving T memory stem cells to the clinic. *Blood*. 2013.121(4):567–8.
14. Restifo NP, Gattinoni L. Lineage relationship of effector and memory T cells. *Curr Opin Immunol*. 2013.25(5):556–63.
15. Lugli E, Gattinoni L, Roberto A, Mavilio D, Price DA, Restifo NP, et al. Identification, isolation and in vitro expansion of human and nonhuman primate T stem cell memory cells. *Nat Protoc*. 2013.8(1):33–42.
16. Feuchtinger T, Richard C, Joachim S, Scheible MH, Schumm M, Hamprecht K, et al. Clinical grade generation of hexon-specific T cells for adoptive T-cell transfer as a treatment of adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *J Immunother*. 2008.31(2):199–206.
17. Han S, Huang Y, Liang Y, Ho Y, Wang Y, Chang L-J. Phenotype and functional evaluation of ex vivo generated antigen-specific immune effector cells with potential for therapeutic applications. *J Hematol Oncol*. 2009.2:34.
18. Wang Y, Aïssi-Rothe L, Virion JM, De Carvalho Bittencourt M, Ulas N, Audonnet S, et al. Combination of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1, 3 and lytic antigen BZLF1 peptide pools allows fast and efficient stimulation of Epstein-Barr virus-specific T cells for adoptive immunotherapy. *Cytotherapy*. 2014. 16(1):122–34.
19. Zandvliet ML, Falkenburg JHF, van Liempt E, Veltrop-Duits LA, Lankester AC, Kalpoe JS, et al. Combined CD8+ and CD4+ adenovirus hexon-specific T cells associated with viral clearance after stem cell transplantation as treatment for adenovirus infection. *Haematologica*. 2010;95(11):1943–51.
20. Aïssi-Rothé L, Decot V, Venard V, Jeulin H, Salmon A, Clement L, et al. Rapid generation of full clinical-grade human antiadenovirus cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother*. 2010.33(4):414–24.
21. Naeger DM, Martin JN, Sinclair E, Hunt PW, Bangsberg DR, Hecht F, et al. Cytomegalovirus-specific T cells persist at very high levels during long-term antiretroviral treatment of HIV disease. *PLoS ONE*. 2010.5(1): 86-88.

22. Sathaliyawala T, Kubota M, Yudanin N, Turner D, Camp P, Thome JJC, et al. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity*. 2013.38(1):187–97.
23. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer*. 2012.12(10):671–84.
24. Guérin-El Khourouj V, Dalle J-H, Pédrón B, Yakouben K, Bensoussan D, Cordeiro DJ, et al. Quantitative and qualitative CD4 T cell immune responses related to adenovirus DNAemia in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011.17(4):476–85.
25. Lugli E, Dominguez MH, Gattinoni L, Chattopadhyay PK, Bolton DL, Song K, et al. Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory. *J Clin Invest*. 2013.123(2):594–9.
26. Luckey CJ, Weaver CT. Stem-cell-like qualities of immune memory; CD4+ T cells join the party. *Cell Stem Cell*. 2012.10(2):107–8.
27. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M and Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol*. 2013. 43: 2797–2809.
28. Cieri N, Camisa B, Cocchiarella F, Forcato M, Oliveira G, Provati E, et al. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood*. 2013.121(4):573–84.
29. Obar JJ, Lefrançois L. Memory CD8+ T cell differentiation. *Ann N Y Acad Sci*. 2010.1183:251–66.

Figure legends

Figure 1. Analysis strategy of T cell subsets.

Data shown are gated on viable T lymphocytes, identified as LIVE/DEAD AQUA fluorescent-reactive dye negative and CD3 positive cells, after elimination of non-singlet cells. CD4⁺ and CD8⁺ T cells were also identified. Afterwards, IFN γ ⁺ VSTs were gated either on CD3⁺, CD4⁺, or CD8⁺ T cells. Finally different T-cell subsets were identified according to their expression of CD45RA, CCR7 and CD95 among these gated virus-specific CD3, CD4 and CD8 T cells. Naive T cells (T_N) were defined as CD45RA⁺CCR7⁺CD95⁻, T memory stem cells (T_{SCM}) as CD45RA⁺CCR7⁺CD95⁺, central memory T cells (T_{CM}) as CD45RA⁻CCR7⁺, effector memory T cells (T_{EM}) as CD45RA⁻CCR7⁻ and effector T cells (T_{EFF}) as CD45RA⁺CCR7⁻.

Figure 2. Virus-specific T cell subset distributions

(a) Virus-specific CD3⁺ T cell subset distributions before and after isolation. Before selection, CMV-specific T cells (CMV-1 and CMV-2) were analyzed in two donors, and ADV-specific T cells (ADV-1 and ADV-2) in other two. The four T-cell compartments: T_{N-like}, T_{CM}, T_{EM}, T_{EFF} were present in variable proportions in CMV-specific T cells and ADV-specific T cells. After isolation, ADV-specific T cells were analyzed in five donors. The four T-cell compartments were still present. Enrichment in T_{EM} was observed, in association with a decrease in less differentiated sub-populations such as T_{N-like} and T_{CM} in these VSTs. **(b)** Distribution of ADV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell sub-populations before expansion. Before expansion (n=5), except for undetectable ADV-specific CD4⁺ T_{SCM}, all the T-cell subsets were present. T_{EM} was always the major compartment with more than 90% in CD4⁺IFN- γ ⁺ or CD8⁺IFN- γ ⁺. **(c)** Distribution of ADV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell sub-populations after expansion. After expansion for 2-4 weeks (n=4), extinction of T_{N-IFN γ ⁺} and emergence of T_{SCM} in CD4⁺IFN- γ ⁺ were observed, whereas T_{N-IFN γ ⁺} and T_{SCM} were undetectable in CD8⁺IFN- γ ⁺. A decrease in T_{EFF} was noted in CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD8⁺IFN- γ ⁺.

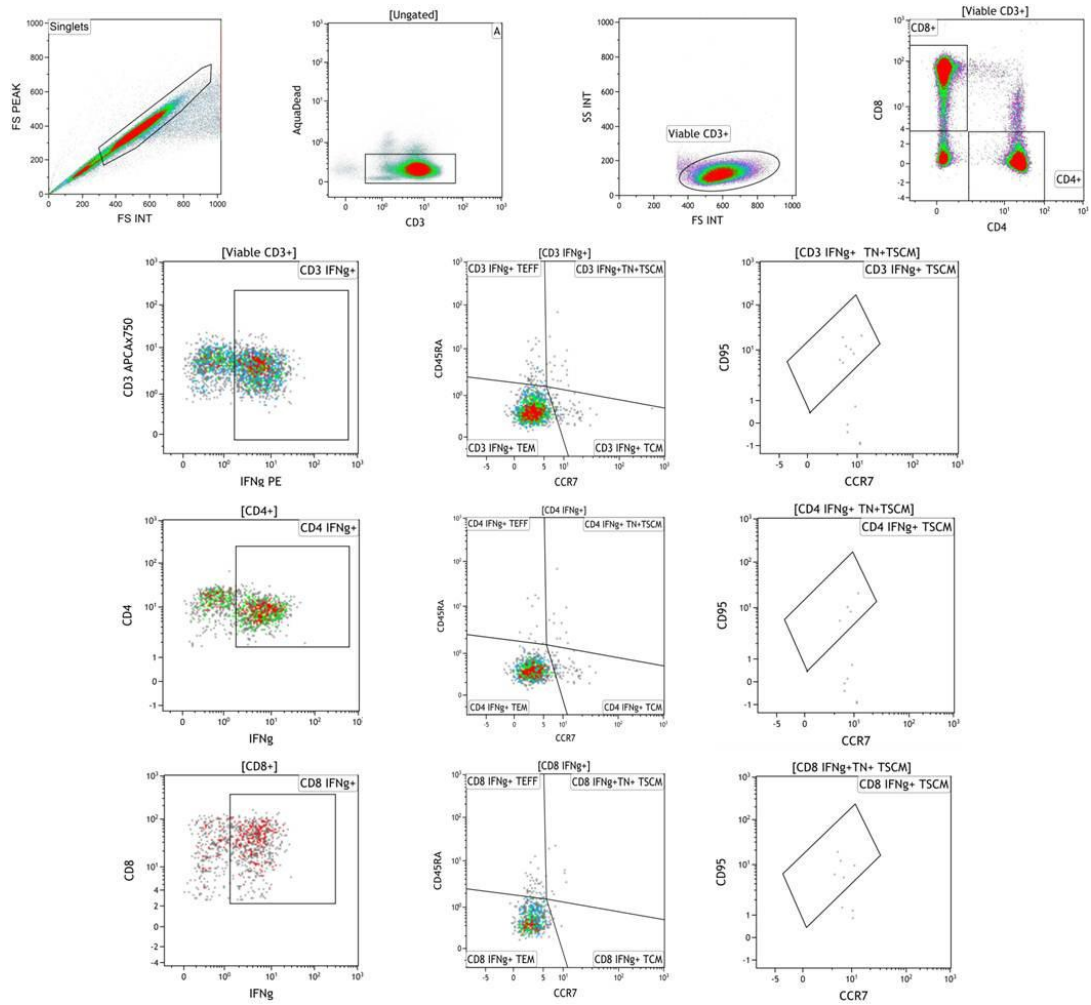


Figure1

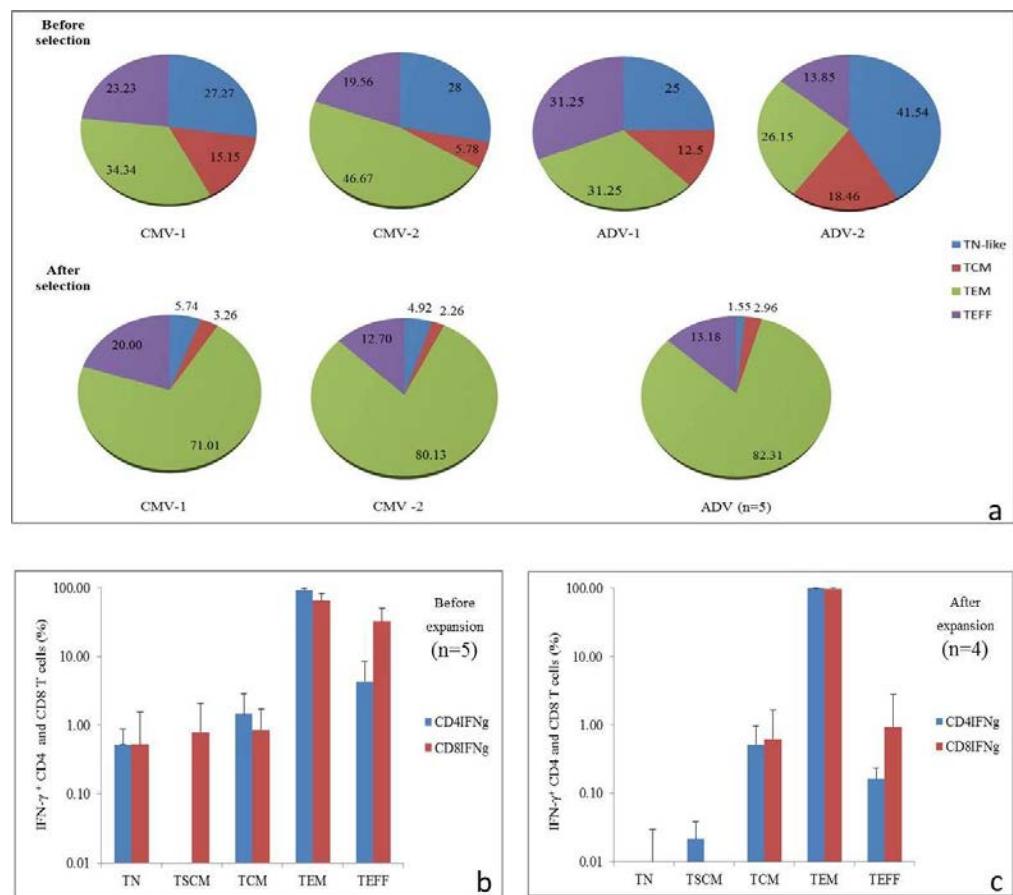


Figure 2

Partie 3: *Generation of bi-specific
Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) against
Epstein-Barr virus and Adenovirus for
adoptive immunotherapy*

Génération de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) bispécifiques anti-adénovirus (ADV) et anti-Epstein-Barr-virus (EBV)

Article en préparation:

1. Introduction

Notre équipe après avoir mis au point une technique d'immunosélection rapide et de grade clinique des CTL anti-ADV (Aïssi-Rothé *et al.*, 2010) et des CTL anti-EBV (Wang *et al.*, 2014) a souhaité développer la production de CTL bispécifiques anti-ADV et anti-EBV (CTL-ADV/EBV), avec les mêmes antigènes peptidiques de stimulation utilisés pour l'obtention de CTL mono-spécifiques: le Peptivator ADV5 Hexon (PepT-ADV5, Miltenyi Biotec) et le pool de peptides EBV (PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1). La production de CTL-ADV/EBV bispécifiques permettrait d'envisager de traiter après allogreffe de CSH des infections ADV ou EBV ou les deux simultanément. Outre l'avantage en terme de coût de production, injecter des CTL bispécifiques permet de limiter les risques de réactions alloréactives comparé à deux injections de CTL mono-spécifiques. Cependant, nous devons au préalable nous assurer que les CTL bispécifiques CTL-ADV/EBV présentent une efficacité contre chaque virus similaire à celle des CTL mono-spécifiques ADV ou EBV et qu'il n'existe pas de compétition entre les deux antigènes de stimulation utilisés au dépend de l'activité anti-ADV ou anti-EBV. C'est l'objet de ce travail.

2. Matériels et Méthodes

Les cellules mononucléées (CMN) (200×10^6) provenant de trois donneurs sains présentant une réponse cellulaire spécifique vis à vis de l'ADV et de l'EBV confirmée au préalable, ont été stimulées par le PepT-ADV5 Hexon et le PepMix+PepT-EBNA1/BZLF1 pendant, respectivement, 6 et 9 heures. Les CTL spécifiques de ces deux virus ont ensuite été sélectionnés par technique immunomagnétique *via* le kit de sélection Cytokine Capture System (Miltenyi Biotec).

Une fois les CTL bispécifiques obtenus, une analyse phénotypique par cytométrie en flux a été effectuée. Les cellules restantes ont ensuite été mises en culture selon le protocole précédemment décrit (Wang *et al.*, 2014).

Les méthodes utilisées étant pour la plupart similaires à celles présentées dans l'article 1, nous nous attacherons à ne présenter ici que les tests de prolifération, de cytotoxicité et d'alloréactivité. En effet, à la différence de l'article 1, ce sont des techniques froides qui ont été utilisées.

Test de prolifération ou Test de Transformation Lymphocytaire (TTL) :

Le test de prolifération ou test de transformation lymphocytaire, est un test permettant de s'assurer de la spécificité des cellules sélectionnées, par mise en évidence d'une nette augmentation de la prolifération des CTL en présence de leur antigène, comparativement à la prolifération des CMN vis-à-vis du même antigène et à la prolifération des CTL vis-à-vis d'antigènes non pertinents.

Pour cela, les CMN du donneur et les CTL isolés, sont incubés 4 jours (37°C, 5% CO₂) à la concentration de 1 x 10⁵ cellules/puits dans une plaque de 96 puits à fonds plats, en présence de l'antigène cible ou d'un antigène non pertinent. Des contrôles négatifs (absence d'antigène (témoin négatif), de BrdU (Background), de cellules (Blanc)) et positifs (remplacement de l'antigène par les mitogènes PMA/Ionomycine (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, Sigma-Aldrich, L'Isle D'Abeau Chesnes, France/Ionomycine, EMD Biosciences, San Diego, USA) ou PHA) sont réalisés en parallèle.

Les tests de proliférations lymphocytaires sont effectués avec le kit de Recherche : DELFIA® Cell Prolifération kit (PerkinElmer, USA). Cette technique d'immunofluorescence est basée sur l'incorporation d'un analogue de la pyrimidine, le 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), dans les brins d'ADN nouvellement synthétisés au cours de la prolifération des cellules. Le BrdU est ainsi incorporé à une concentration de 10µM/puits durant 18h (37°C, 5% CO₂). La plaque subit ensuite une centrifugation à 300g pendant 10min. Le surnageant est éliminé par retournement, et la plaque est séchée durant 2 heures à température ambiante.

Le BrdU est détecté en utilisant un anticorps monoclonal marqué à l'euporinium (Anti-BrdU-Eu). Pour permettre cette détection, les cellules sont fixées et leur ADN est dénaturé en utilisant une solution de fixation à 100µL/puits (Fix Solution). La plaque est ensuite laissée à température ambiante 30 minutes avant de retirer le surnageant des puits par retournement. Après un séchage d'une heure, l'anticorps anti-BrdU couplé à l'Euporinium est ajouté à hauteur de 100µL/puits (0,5µg/mL) pendant 1 heure à température ambiante. Les anticorps non liés sont éliminés par 6 lavages successifs avec 300µL de solution de lavage. Après une étape de séchage, 200µL/puits de DELFIA Inducer (Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay Inducer) sont ajoutés pendant 15 minutes à l'obscurité et sous agitation. Les ions euporinium sont alors libérés dans la solution et forment un chélate hautement fluorescent avec les composants du DELFIA Inducer.

La fluorescence mesurée en coup par minute (cpm) est proportionnelle à la synthèse d'ADN des cellules de chaque puits. La lecture des plaques est réalisée sur le VictorTMX4 (PerkinElmer, USA).

Test d'alloréactivité ou Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) :

Bien que le principe du test d'alloréactivité soit identique au test TTL précédemment décrit, l'objectif en est différent. En effet, ici, il s'agira de mettre en évidence une éventuelle alloréactivité des CTL sélectionnés en détectant ou non, une prolifération de ceux-ci en présence d'antigènes allogéniques. Pour cela des CMN, issues de donneurs autres que le donneur de CTL, sont irradiées à 25 Gy et auront pour vocation d'être des antigènes de stimulation. Pendant 6 jours (37°C, 5% CO²), ces CMN sont mises en co-culture à la concentration de 1 x 10⁵ cellules/puits dans 100 µl, avec les CMN du donneur de CTL avant sélection, ou avec les CTL après expansion, à la concentration de 1 x 10⁵ cellules/puits dans 100 µl. Après incubation et avant ajout du BrdU, les cellules sont transférées sur une plaque à fonds plats. Les étapes de révélation et de lecture de la plaque sont identiques à celles décrites pour le test TTL.

Test de cytotoxicité :

- Production des cellules cibles autologues et allogéniques :

Les cellules cibles utilisées dans le test de cytotoxicité sont des Blastes PHA comme décrit dans l'article 1, pré-incubés ou non (NP) avec différents antigènes pendant 16h.

- Le kit DELFIA® Cell cytotoxicity permet de mesurer la cytotoxicité cellulaire. Il s'agit d'une alternative non-radioactive au test conventionnel avec le chrome 51 (^{51}Cr). Deux types de cellules sont utilisés au cours de ce test : les cellules cibles et les cellules effectrices (CTL). L'activité cytotoxique des CTL est testée contre les cellules cibles qui sont préalablement chargées avec un ester acétoxyméthyle de BATDA (1 μL de DELFIA BATDA reagent pour 1×10^6 cellules cibles). Le ligand pénètre rapidement dans la membrane cellulaire durant le temps d'incubation de 20min (37°C, 5% CO_2). Dans la cellule, les liaisons ester sont hydrolysées pour former un ligand hydrophile (TDA), qui ne passe plus à travers la membrane cellulaire.

Quatre étapes de lavage des cellules cibles sont ensuite effectuées à 400g pendant 5min avec un milieu composé de 2mM de sulfinpyrazone dissout par du DMSO. Les cellules sont alors distribuées sur une plaque à fonds V. Chaque puits contient 100 μL de cellules cibles (de concentration 1×10^5 cellules/mL), et le volume nécessaire de cellules effectrices (les CTL après amplification) est variable selon les rapports cellules effectrices/cellules cibles suivants : 40 :1, 20 :1, 10 :1, et 5 :1.

Après 2 heures d'incubation (37°C, 5% CO_2) nécessaires au contact des cellules cibles avec les cellules effectrices, la plaque est centrifugée à 500g pendant 5min. Suite à cette centrifugation, 20 μL de surnageant sont transférés sur une plaque de lecture à fonds plats. Deux cents microlitres de solution Europium sont ajoutés au surnageant et incubés pendant 15 minutes à l'obscurité sous agitation. Lorsque les cellules cibles sont lysées par une cellule effectrice, le TDA est libéré hors de la cellule dans le surnageant et forme un chélate stable hautement fluorescent avec l'Europium. A l'inverse, si les cellules sont intactes, le TDA restera dans la cellule et ne pourra se chélater avec l'Europium. Le signal de fluorescence mesuré en coups par minute (cpm) est donc directement corrélé à la quantité de cellules lysées. La lecture est effectuée par Victor™X4 (PerkinElmer, USA).

La lyse spécifique des cellules cibles par les cellules effectrices est exprimée selon la formule suivante :

$$\% \text{ de lyse spécifique} = (\text{relargage expérimental} - \text{relargage spontané}) / (\text{relargage total} - \text{relargage spontané}) \times 100$$

Le relargage expérimental correspond à la fluorescence émise par les cellules cibles en présence des cellules effectrices, exprimée en nombre moyen de cpm.

Le relargage spontané (RS) correspond à la fluorescence émise spontanément par les cellules cibles lorsqu'elles sont cultivées uniquement en présence de SAB, exprimée en nombre moyen de cpm.

Le relargage total (RT) correspond à la fluorescence maximale émise par les cellules cibles en présence de 100µL de Triton 1%, exprimée en nombre moyen de cpm.

Comparaison entre les CTL bispécifiques et mono-spécifiques :

Afin de pouvoir comparer les résultats, les pourcentages de lymphocytes T anti-ADV, anti-EBV ainsi que les lymphocytes T anti-ADV/anti-EBV ont été rapportés au même nombre de cellules nucléées totales : avant et après sélection, ce nombre de référence est de 1×10^6 CNT.

3. Résultats

✧ *Fréquence des lymphocytes T spécifiques vis-à-vis de l'ADV et de l'EBV:*

La difficulté principale que nous ayons rencontrée a été la sélection de donneurs présentant une réponse IFN- γ suffisante, à la fois pour l'ADV, et pour l'EBV. Les CMN du sang total ont été stimulées avec le PepT-ADV5 ou le PepMix + PepT-EBNA1/-BZLF1, respectivement pendant 6h et 9h. Les résultats obtenus par Elispot-IFN- γ ont permis de sélectionner les donneurs présentant les meilleures réponses immunitaires vis-à-vis de l'ADV et l'EBV.

La réponse immunitaire cellulaire vis-à-vis de l'ADV a été en moyenne de 161 ± 91 SFCs/ 10^6 CMN (la moyenne observée sur 43 donneurs sains étant de: 135 ± 141 SFCs/ 10^6 CMN) (Aissi Rothé *et al.*, 2010). La réponse immunitaire cellulaire

observée vis-à-vis de l'EBV a été en moyenne de 406 ± 176 SFCs/ 10^6 CMN (la moyenne observée sur 43 donneurs sains étant de : 380 ± 465 SFCs/ 10^6 CMN) (Wang *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'analyse par cytométrie en flux montre que le nombre de lymphocytes T CD3IFN- γ^+ après stimulation par le PepT-ADV5 et le PepMix + PepT-EBNA1/-BZLF1 est en moyenne, respectivement, de $448 \pm 118/10^6$ cellules et $258 \pm 162/10^6$ cellules (Tableau XIII). Les résultats des tests Elispot sont supérieurs à ceux obtenus en cytométrie en flux pour la réponse immunitaire EBV et inférieurs à ceux obtenus en cytométrie en flux pour la réponse immunitaire ADV.

Tableau XIII. Fréquence des lymphocytes T spécifiques anti-ADV et anti-EBV chez les 3 donneurs sains évaluée par la cytométrie en flux et par technique Elispot (**tous les résultats sont rapportés à 1×10^6 CNT**).

		CNT (10^6)	CD4 (%)	CD4 ⁺ IFN- γ^+ (%)	CD4 ⁺ IFN- γ^+	CD8 (%)	CD8 ⁺ IFN- γ^+ (%)	CD8 ⁺ IFN- γ^+	CD3 ⁺ IFN- γ^+	Elispot (SFCs/ 10^6 cells)
ADV	1	1	40,22	0,09	361,98	6,16	0,17	104,72	467	184
	2	1	43,95	0,05	219,75	20,20	0,05	101,00	321	60
	3	1	45,90	0,08	380,93	22,66	0,07	174,47	555	238
EBV	1	1	52,65	0,02	105,30	6,33	0,22	139,26	245	527
	2	1	42,93	0,03	128,79	18,32	0,01	18,32	147	203
	3	1	46,00	0,05	216,24	22,72	0,07	165,88	382	487
ADV /EBV	1	1	51,08	0,27	1399,0	6,73	0,90	606,30	2006	
	2	1	47,73	0,06	295,9	16,08	0,12	194,6	491	
	3	1	44,37	0,09	417,1	23,09	0,33	768,8	1186	
Mean	ADV								448	161
	EBV								258	406
	ADV/EBV								1227	

✧ **Comparaison phénotypique entre les CTL mono-spécifiques et les CTL bispécifiques:**

Deux cents millions de CMN fraîches issues du sang total de trois donneurs ont été stimulées par l'antigène ADV ou EBV pour la production de CTL mono-spécifiques (CTL-ADV et CTL-EBV). Par ailleurs, 200 millions de CMN ont été stimulées par l'association de l'antigène ADV et EBV pour la production de CTL bispécifiques. Les temps de stimulation par l'antigène ont été de 6 heures et 9 heures, respectivement pour

l'ADV et l'EBV. Un enrichissement moyen de $54,27 \pm 21,53$ % en lymphocytes T $CD4^+IFN-\gamma^+$ et de $40,02 \pm 26,84$ % lymphocytes T $CD8^+IFN-\gamma^+$ a été obtenu pour les 9 CTL produits (3 CTL-ADV, 3 CTL-EBV, et 3 CTL bispécifiques).

Nous nous attacherons, ici, à présenter uniquement les résultats obtenus pour les CTL bispécifiques. En moyenne $0,14 \pm 0,11$ % des lymphocytes T CD4 et $0,45 \pm 0,40$ % des lymphocytes T CD8 étaient respectivement $CD4^+IFN-\gamma^+$ et $CD8^+IFN-\gamma^+$ avant sélection. Un nombre moyen de $0,56 \pm 0,50 \times 10^6$ cellules a été obtenu après isolement sur aimant midiMACS (Miltenyi Biotec). Après sélection, une pureté moyenne de $60,62 \pm 20,25$ % de $CD4^+IFN-\gamma^+$ et de $60,72 \pm 20,55$ % de $CD8^+IFN-\gamma^+$ a été observée (Tableau XIV).

Tableau XIV. Résultats de production de CTL bispécifiques anti-ADV et anti-EBV.

Essai N°	Avant sélection					Après sélection				
	CNT (10^6)	CD4 (%)	$CD4^+$ $IFN-\gamma^+$ (%)	CD8 (%)	$CD8^+$ $IFN-\gamma^+$ (%)	CNT (10^6)	CD4 (%)	$CD4^+$ $IFN-\gamma^+$ (%)	CD8 (%)	$CD8^+$ $IFN-\gamma^+$ (%)
1	110,40	51,08	0,27	6,73	0,90	0,30	8,91	77,71	6,39	75,35
2	83,20	47,73	0,06	16,08	0,12	0,24	4,69	65,91	3,04	37,23
3	152,80	44,37	0,09	23,09	0,33	1,13	14,55	38,25	12,25	69,59
Moyenne	115,47	47,73	0,14	15,30	0,45	0,56	9,38	60,62	7,23	60,72
Ecart type	35,08	3,35	0,11	8,21	0,40	0,50	4,95	20,25	4,66	20,55

Le nombre de CTL antiviraux rapporté à 1×10^6 CNT résultant de la somme des CTL mono-spécifiques d'une part ou des CTL bispécifiques d'autre part semble montrer, que la quantité totale de CTL ayant des propriétés anti-ADV et anti-EBV avant et après sélection varie d'un donneur à l'autre. Parmi les lymphocytes T $CD8^+$, avant et après sélection, la quantité de CTL antiviraux issue des CTL bispécifiques est systématiquement supérieure ou au moins égale, à la quantité des CTL antiviraux issue de la somme des CTL mono-spécifiques (Figure 17). Parmi les lymphocytes T $CD4^+$, le même phénomène se retrouve avec les donneurs 1 et 2 mais n'est pas vérifié avec le donneur 3.

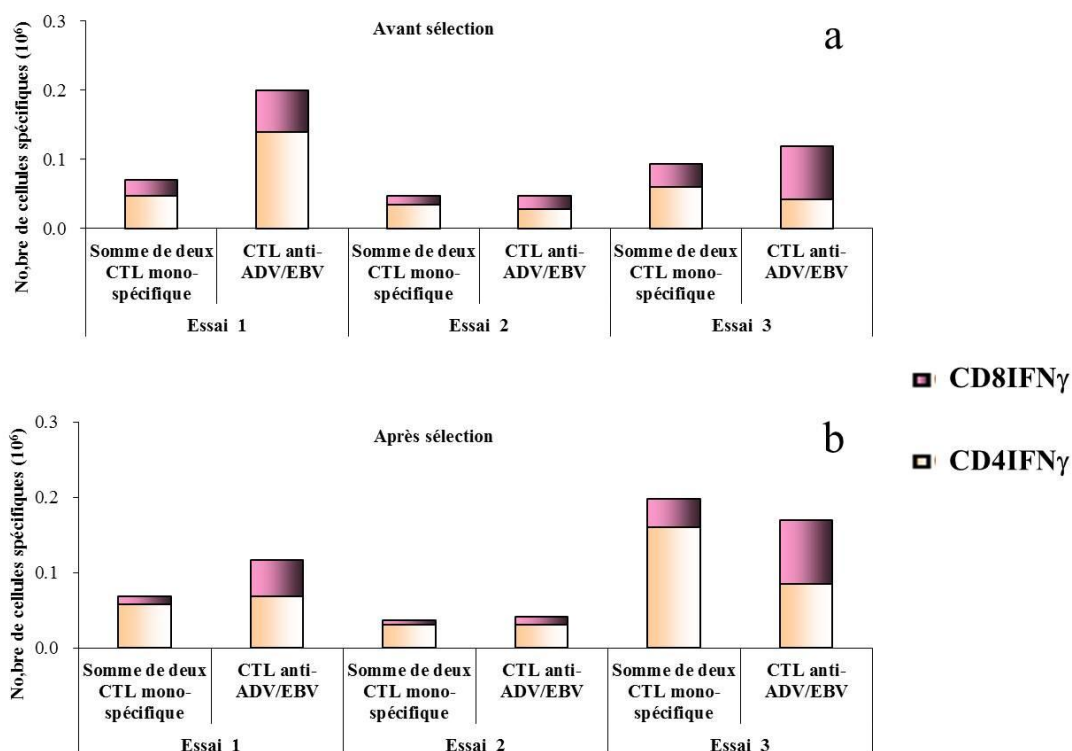


Figure 17. Comparaison des valeurs absolues des VSTs en mono-spécifique et en bispécifique. *a* : La comparaison du nombre de cellules spécifiques avant sélection; *b* : La comparaison du nombre de cellules spécifiques après sélection.

On observe que les donneurs présentant une forte réponse immunitaire vis-à-vis des 2 virus (donneur 1 et 3, Tableau XIII) présentent, avant sélection, une quantité de CTL antiviraux plus importante en CTL bispécifiques qu'en CTL mono-spécifiques additionnés. Cependant, cette constatation n'est pas vérifiée après sélection.

Par ailleurs, le donneur 2 qui possède une faible immunité vis-à-vis des 2 virus, présente avant sélection et après sélection, une quantité équivalente de CTL antiviraux correspondant à l'addition des CTL mono-spécifiques ou aux CTL bispécifiques.

✧ **Comparaison de l'expansion et de la spécificité antigénique:**

L'ensemble des CTL produits, à la fois mono-spécifiques et bispécifiques, présente une expansion d'un facteur médian de **52,5** (de 6 à 242). Après une deuxième stimulation antigénique nous avons observé par analyse des cytokines intra-cellulaires (ICC), que l'ensemble des CTL, qu'ils soient bispécifiques ou mono-spécifiques, sécrétait de

l'IFN- γ ce qui traduit la conservation de leur spécificité antigénique. Une expansion des lymphocytes T CD3⁺IFN- γ ⁺ d'un facteur médian de **295** (de 58 à 8350) a été observée (Tableau XV).

Tableau XV. Facteur d'expansion (Le pourcentage de CD3 IFN- γ a été calculé sur le nombre de CNT).

Spécificité antigénique	Essai	Avant expansion					Après expansion			Facteur d'expansion	
		CNT (avant sélection) (10 ⁶)	CNT (après sélection) (10 ⁶)	Pourcentage des CNT isolées (%)	CD3 ⁺ IFN- γ ⁺ (10 ⁶)	CD3 ⁺ IFN- γ ⁺ (%) (calculé)	CNT (10 ⁶)	CD3 ⁺ IFN- γ ⁺ (10 ⁶)	CD3 ⁺ IFN- γ ⁺ (%) (calculé)	CNT	CD3 ⁺ IFN- γ ⁺
ADV	1	130,4	0,6	0,46	0,03	5,0	19,5	6,57	33,66	32,53	219
	2	122,4	0,48	0,39	0,01	2,1	52,8	20,57	38,96	110,00	2057
	3	155,2	0,4	0,26	0,04	10,0	21,0	11,8	56,19	52,50	295
EBV	1	124	0,76	0,61	0,01	1,3	4,6	1,29	28,29	6,00	129
	2	118,08	0,27	0,23	0,002	0,7	62,4	16,7	26,76	231,11	8350
	3	158,4	0,3	0,19	0,02	6,7	20,8	9,51	45,72	69,33	475,5
ADV/EBV	1	110,4	0,3	0,27	0,04	13,3	8,9	2,33	26,24	29,60	58,25
	2	83,2	0,24	0,29	0,010	4,2	58,0	11,85	20,43	241,67	1185
	3	152,8	1,13	0,74	0,2	17,7	44,4	18,97	42,73	39,29	94,85
	Médiane	124	0,4	0,29	0,02	5	21	11,8	33	52,5	295

Par ailleurs des lymphocytes T CD4⁺ IFN- γ ⁺ et T CD8⁺ IFN- γ ⁺ ont été détectés dans tous les CTL.

En comparant les facteurs d'expansion des lymphocytes T CD4 et T CD8 spécifiques de l'ADV parmi les CTL mono-spécifiques et les CTL bispécifiques, il a été observé une moindre expansion des lymphocytes T CD4⁺IFN- γ ⁺ bispécifiques par rapport à celle des lymphocytes T CD4⁺IFN- γ ⁺ mono-spécifiques mais une expansion comparable des CD8⁺IFN- γ ⁺ (Tableau XVI).

Pour les CTLs spécifiques de l'EBV, la disparité d'expansion observée entre les 3 donneurs ne permet pas de dégager une tendance.

Tableau XVI. Comparaison de la capacité d'expansion des lymphocytes CD4⁺IFN- γ ⁺ et CD8⁺IFN- γ ⁺ bi et mono-spécifiques (exprimé en facteur d'expansion : ratio par rapport à après sélection).

	Essai	CNT	CD4 ⁺	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺	CD8 ⁺	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺
CTL-ADV	1	32,5	214,1	181,3	68,6	253,5
	2	110,0	1001,2	1552,0	269,0	1067,7
	3	52,5	283,7	292,5	107,3	159,7
CTL-EBV	1	6,0	13,7	3,5	24,5	255,4
	2	231,1	1195,7	3700,1	3046,6	37649,6
	3	69,3	39,0	20,5	1415,5	1726,4
CTL-ADV/EBV	1	29,6	40,0	7,0	247,7	163,6
	2	241,7	762,0	520,3	2199,1	4660,2
	3	39,3	31,6	41,7	156,2	122,3
	ADV 1	29,6	34,3	7,5	1251,9	94,8
	ADV2	241,7	1363,1	492,8	2333,5	1395,7
	ADV3	39,3	59,5	38,5	528,9	169,4
	EBV1	29,6	255,7	15,3	141,4	1033,6
	EBV2	241,7	2236,5	1368,6	2983,7	27025,4
	EBV3	39,3	145,3	9,1	724,7	330,6

La spécificité des CTL mono-spécifiques a été confirmée par Elispot IFN- γ (Figure 18). En effet, après expansion et stimulation antigénique une réponse moyenne de 53115 ± 32533 SFCs/ 10^6 cellules pour les CTL-ADV et de 331643 ± 187947 SFCs/ 10^6 cellules pour les CTL-EBV, a été observée. La réponse IFN- γ des CTL mono-spécifiques après stimulation antigénique est augmentée d'un facteur moyen de 322 ± 85 pour les CTL-ADV et 1169 ± 1215 pour les CTL-EBV, comparée aux CMN avant sélection. Cette réponse a été confirmée en ICC avec une moyenne de 33100 ± 27183 CD3IFN- γ / 10^6 cellules pour les CTL-ADV et 36423 ± 8041 CD3IFN- γ / 10^6 cellules pour les CTL-EBV (Tableau XVII).

Tableau XVII. Comparaison de spécificité antigénique en ICC et en Elispot IFN- γ .

		ICC (CD3IFN- γ /10 ⁶ cellules)	Elispot IFN- γ (SFCs/10 ⁶ Cellules)
CTL-ADV	Essai1	3144	77166
	Essai2	39960	16098
	Essai3	56196	66081
CTL-EBV	Essai1	31437	142857
	Essai2	32133	518738
	Essai3	45699	333334
CTL-ADV/EBV	Essai 1 ADV	2451	225958
	Essai 1 EBV	25187	196868
	Essai 2 ADV	7770	50390
	Essai 2 EBV	19214	203021
	Essai 3 ADV	17719	60570
	Essai 3 EBV	16316	126583

Les CTL bispécifiques montrent également une augmentation de la réponse IFN- γ après stimulation antigénique par rapport aux CMN avant sélection. En effet, la réponse à la stimulation par le PepT-ADV et le PepMix+PepT-EBNA1/-BZLF1 ont été respectivement de 112306 $\pm$ 98557 et 175491 $\pm$ 42467 SFCs/10⁶ cellules en Elispot IFN- γ ce qui équivaut à une augmentation d'un facteur moyen de 774 $\pm$ 490 pour les CTL-ADV et 544 $\pm$ 398 pour les CTL-EBV par rapport aux CMN avant sélection. Cette réponse spécifique a été aussi évaluée par ICC et montre que la fréquence des CD3IFN- γ spécifiques anti-ADV et anti-EBV est en moyenne de 9313 $\pm$ 7750 et 20239 $\pm$ 4523 sur 1x10⁶ cellules (Tableau XVII).

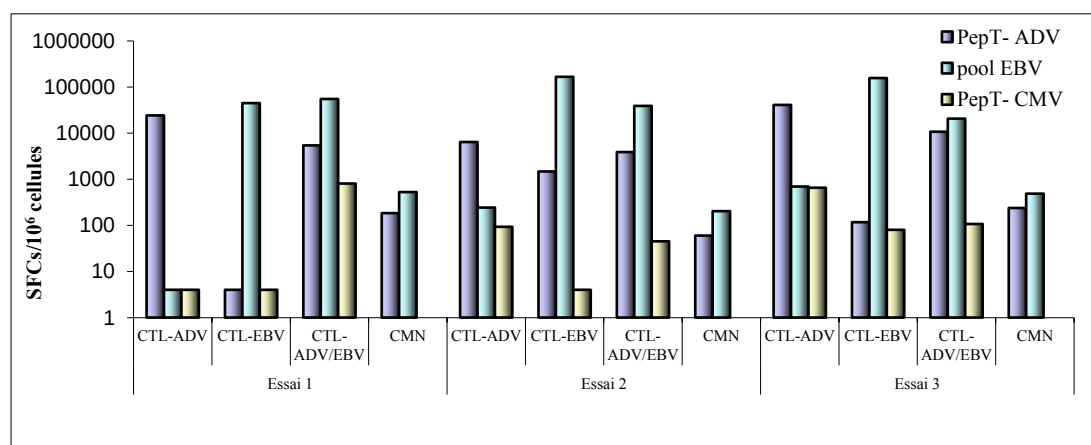


Figure 18. Comparaison de la réponse IFN- γ après stimulation antigénique pour les CTL mono-spécifiques et bispécifiques après expansion et les CMN avant sélection.

✧ *Comparaison de la capacité proliférative en présence de l'antigène spécifique:*

La quantité de BrdU incorporée a été mesurée pour permettre une évaluation de la prolifération des CTL bi et mono-spécifiques après expansion puis stimulation antigénique *in vitro*.

Qu'ils soient bispécifiques ou mono-spécifiques, les CTL ont montré une forte capacité proliférative en présence d'antigènes spécifiques (Figure 19). Par ailleurs, la réponse des CTL vis-à-vis d'un antigène non relevant (PepT-CMV) est négligeable.

La prolifération vis-à-vis de l'ADV des CTL bispécifiques est similaire à celle observée avec les CTL mono-spécifiques, à l'exception du donneur 3. Cependant, avec l'aide du tableau XVII, on s'aperçoit que parmi les 1×10^5 CNT présents dans les puits du test de prolifération, le nombre de CD3IFN- γ est de 3310 ± 2718 pour les CTL anti-ADV mono-spécifiques et de 931 ± 775 pour les CTL bispécifiques. Cette différence de fréquence de cellules spécifiques peut expliquer la différence de réponse proliférative observée, notamment pour le donneur 3.

Une diminution de la réponse proliférative vis-à-vis de l'EBV pour les CTL bispécifiques a été observée comparée à celle observée avec les CTL monospécifiques (CTL-EBV). Cependant, on constate à nouveau que dans les puits, le nombre de CD3IFN- γ est de 3642 ± 804 pour les CTL anti-EBV mono-spécifiques et de 2024 ± 452 pour les CTL bispécifiques.

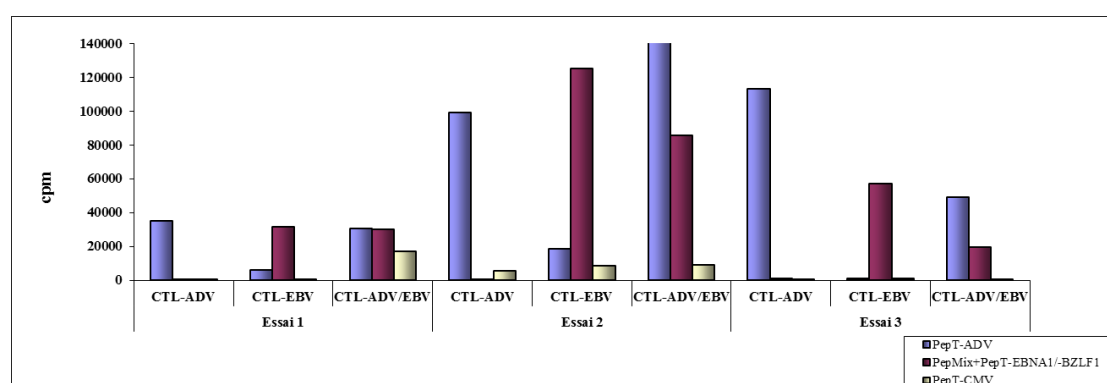


Figure 19. Réponse proliférative des CTL vis-à-vis des antigènes spécifiques et d'un antigène non relevant.

✧ *Comparaison de la cytotoxicité des CTL bispécifiques et mono-spécifiques :*

La capacité à lyser les cellules cibles *in vitro* par les CTL mono et bispécifiques a été mesurée par l'essai de cytotoxicité DELFIA.

Au rapport cellules effectrices/cellules cibles de 40/1, il a été mis en évidence que les CTL mono-spécifiques anti-ADV présentaient une capacité de lyse moyenne de $31 \pm 4,0\%$ contre les blastes chargés par PepT-ADV (Figure 20). En comparaison, une lyse moyenne plus faible de $21,3 \pm 5,1\%$ a été observée avec les CTL bispécifiques vis-à-vis de blastes chargés avec le PepT-ADV. Cependant, avec l'aide du tableau XVII, on s'aperçoit qu'au rapport 40/1, le nombre de CD3IFN- γ dans les puits est de 132400 ± 108720 pour les CTL anti-ADV mono-spécifiques alors qu'il est de 37252 ± 31000 pour les CTL bispécifiques. Cette différence en fréquence de cellules effectrices peut expliquer la différence de cytotoxicité observée.

Dans les mêmes conditions, une lyse moyenne de $59,3 \pm 22,5\%$ et de $48,7 \pm 27,2\%$ contre les blastes chargés par PepMix+PepT-EBNA1/BZLF1 a été observée avec respectivement les CTL-EBV mono-spécifiques et les CTL bispécifiques (Figure 20). A nouveau, avec l'aide du tableau XVI, au rapport 40/1, le nombre de CD3IFN- γ est de 145692 ± 32164 dans les CTL-EBV mono-spécifiques et de 80956 ± 18092 dans les CTL bispécifiques. Une lyse moindre pour les CTL bispécifiques peut s'expliquer par le plus faible nombre de CD3IFN- γ dans les CTL bispécifiques que dans les CTL mono-spécifiques.

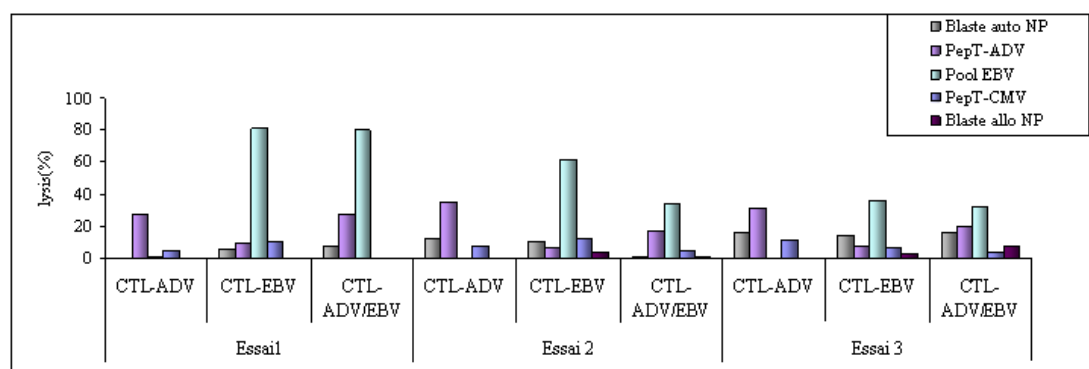


Figure 20. Cytotoxicité des CTL mono-spécifiques et bispécifiques à un rapport de 40:1 après expansion *in vitro*.

Une lyse spécifique contre les blastes PHA présentant le PepT-ADV ou le pool EBV a été observée pour les CTL mono-spécifiques (CTL-ADV et CTL-EBV), ainsi que pour les CTL bispécifiques (CTL-ADV/EBV). En revanche, une lyse faible, inférieure à 10%, a été obtenue contre les blastes chargés avec un antigène non relevant et les blastes allogéniques pour tous les CTL qu'ils soient mono-spécifiques ou bispécifiques. *NP (Blastes non chargés)*.

✧ ***Comparaison de l'alloréactivité résiduelle entre les CTL bispécifiques et les CTL mono-spécifiques :***

L'alloréactivité des CTL a été évaluée avec le test de prolifération DELFIA décrit précédemment. Les CTL et les CMN avant sélection ont été mis en co-culture avec des CMN irradiées issues de trois donneurs différents pendant 4 jours.

Suite à cet essai, il a été mis en évidence que l'ensemble des CTL, qu'ils soient bi ou mono-spécifiques, présente une réponse proliférative allogénique moindre que celle obtenue avec les CMN non sélectionnées (Figure 21). De plus les CTL bi et mono-spécifiques présentent une prolifération allogénique similaire.

Par ailleurs, la proportion de cellules spécifiques ($CD3IFN-\gamma^+$) a été évaluée par cytométrie en flux après technique ICC et il en est ressorti que les CTL après expansion présentent une pureté de $74,33 \pm 9,24\%$ pour les CTL-ADV; $75 \pm 2\%$ pour les CTL-EBV et de $56,33 \pm 12,22\%$ pour les CTL-ADV/EBV sur tous les lymphocytes T CD3. En d'autres termes, les CTL qu'ils soient bi ou mono-spécifiques, présentent un nombre comparable de cellules non spécifiques pouvant être responsables de la réponse allogénique résiduelle.

Ces résultats sont confirmés par la faible cytotoxicité observée vis-à-vis des blastes allogéniques non chargés (Figure 20).

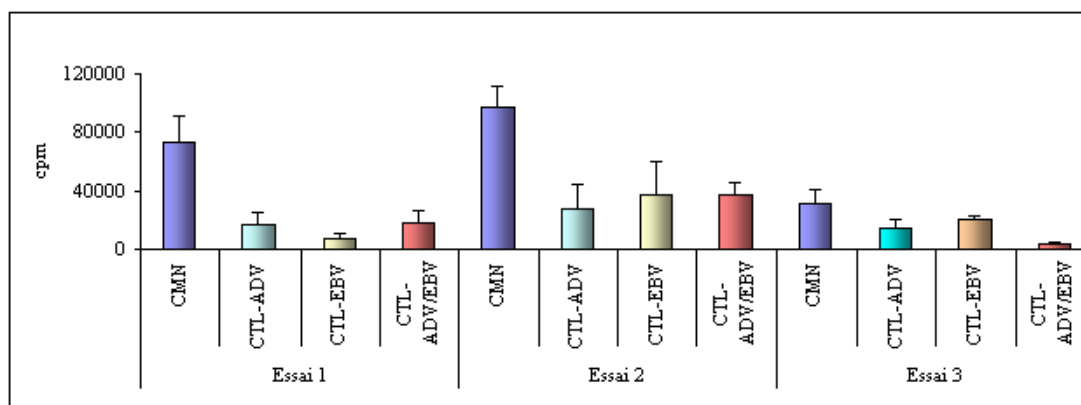


Figure 21. Test d'alloréactivité. Une évaluation de la prolifération alloréactive des 9 CTL après expansion et des CMN avant sélection a été réalisée en présence de CMNs irradiées issues de trois de donneurs HLA différents. Une diminution de la prolifération alloréactive a été observée pour les CTL comparée à celle des CMN.

4. Discussion

Il n'est pas rare chez des patients profondément immunodéprimés après allogreffe de CSH d'être en présence simultanément de plusieurs agents infectieux. Parmi les plus fréquents, on peut mentionner l'EBV, l'ADV et le CMV. Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à la sélection de CTL bispécifiques ADV/EBV. En effet, la production des CTL anti-ADV et anti-EBV séparément pose quelques problèmes : d'une part l'augmentation du nombre de lymphocytes T alloréactifs réinjectés augmentant le risque de survenue d'une GvHD et d'autre part un problème de coût : les techniques de séparation immunomagnétique étant très coûteuses.

Si l'alternative des CTL bispécifiques est séduisante en permettant de résoudre ces problèmes, certaines questions restent posées. D'une part, la compétition antigénique a souvent été évoquée (Kedl *et al.*, 2000; Leen *et al.*, 2006). Ce point semble écarté avec l'utilisation de pools de peptides (Khanna *et al.*, 2011; Papadopoulou *et al.*, 2014). Dans notre étude nous nous sommes concentrés sur des virus engendrant des réponses immunitaires faibles ou modérées, comparée à celle engendrée par le CMV. D'autre part, aucune étude jusqu'ici n'a comparé sur un même prélèvement les propriétés fonctionnelles

des CTL mono-spécifiques et bispécifiques afin de vérifier que la qualité des CTL injectés en bispécifiques est équivalente à celle des CTL mono-spécifiques.

Notre étude se propose de réaliser cette comparaison sur 3 productions réalisées à partir de 3 donneurs sains présentant une bonne réponse immunitaire vis-à-vis de l'ADV et de l'EBV.

1- Les limites de la technique des CTL bispécifiques

- La stimulation avec deux antigènes simultanément: compétition ou non ?

Le problème de la compétition antigénique avait été évoqué par Leen avec des antigènes de CMV générant une forte réponse immunitaire (Leen *et al.*, 2006; Leen *et al.*, 2009). De plus, le type d'antigènes utilisés, comme des antigènes protéiques nécessitant un processing, pouvait être responsable de ce phénomène de compétition. Plus récemment, les travaux réalisés sur les CTL multipathogènes utilisant des pools de peptides comme antigène de stimulation ont souligné l'absence de compétition (Gerdemann *et al.*, 2012; Papadopoulou *et al.*, 2014). Nous avons pu observer dans notre expérience qu'avant sélection le nombre de CD3 IFN- γ spécifiques était systématiquement supérieur après stimulation avec les deux pools de peptides d'ADV et d'EBV simultanément comparé à la somme des deux stimulations séparées. Ce résultat est en faveur d'une absence de compétition antigénique entre les deux antigènes utilisés dans ce travail. Cela ne préjuge pas de ce qui peut se passer lorsqu'on utilise un antigène générant une réponse immunitaire importante comme le CMV.

- Nous avons observé que les donneurs présentant une forte réponse immunitaire vis-à-vis des 2 virus présentent, avant sélection, une quantité de CTL antiviraux plus importante en CTL bispécifiques qu'en CTL mono-spécifiques additionnés. Cependant, cette constatation n'est pas vérifiée après sélection. C'est le contraire qui est rapporté pour un donneur de faible réponse immunitaire. Cette constatation est peut-être la conséquence du système de sélection basé sur la sécrétion d'IFN- γ qui ne peut retenir efficacement que des populations de faible fréquence. La stimulation par 2 antigènes augmentant en haut de colonne la quantité de cellules d'intérêt a probablement pour conséquence de diminuer les performances de la sélection, les événements IFN- γ^+ étant plus fréquents.

2- Comparaison des propriétés anti-ADV des CTL bispécifiques avec les CTL-ADV mono-spécifiques.

On observe un facteur d'expansion des lymphocytes T $CD4^+IFN-\gamma^+$ bispécifiques par rapport à celle des lymphocytes T $CD4^+IFN-\gamma^+$ mono-spécifiques, alors que cette expansion est comparable pour les lymphocytes T $CD8^+IFN-\gamma^+$. Paradoxalement, le nombre de cellules T spécifiques évaluées par ICC ou par Elispot $IFN-\gamma$ est parfois plus important après expansion dans les CTL bispécifiques que dans les CTL monospécifiques probablement du fait d'un nombre de cellules spécifiques après sélection souvent plus élevé. Toutefois, l'analyse par Elispot $IFN-\gamma$ montre un facteur moyen d'expansion de 322 ± 85 pour les CTL-ADV mono-spécifiques, comparé aux CMN avant sélection et de 774 ± 490 pour les CTL-ADV bispécifiques.

Sur le plan de la capacité proliférative et de la cytotoxicité, les résultats semblent inférieurs avec les CTL bispécifiques comparés à ceux des CTL mono-spécifiques. Cependant, le nombre de $CD3 IFN-\gamma$ spécifiques de l'antigène présent dans les puits de ces tests est plus faible pour les CTL bispécifiques, ce qui peut être à l'origine de ces différences. Ainsi, on peut supposer que pour un nombre de $CD3IFN-\gamma$ spécifique égal, on n'observerait plus de différence notable entre les propriétés des CTL mono-spécifiques anti-ADV et bispécifiques. Enfin, une alloréactivité résiduelle similaire est observée avec les CTL mono- et bispécifiques.

3- Comparaison des propriétés anti-EBV des CTL bispécifiques avec les CTL-EBV mono-spécifiques.

Concernant les contrôles qualité fonctionnels, le même phénomène que précédemment décrit avec les CTL anti-ADV est observé avec les CTL anti-EBV. En effet, la capacité proliférative et la cytotoxicité vis à vis de l'EBV des CTL bi-spécifiques semblent plus faibles que celles des CTL anti-EBV mono-spécifiques. Cependant, si l'on s'intéresse au nombre de $CD3IFN-\gamma$ effectivement présents dans les puits de ces tests, on s'aperçoit qu'ils sont bien moins nombreux dans les CTL bispécifiques. Ce nombre plus faible peut expliquer les résultats en apparence diminués par rapport aux CTL monospécifiques. Enfin, à nouveau, une alloréactivité résiduelle similaire est observée avec les CTL mono- et bispécifiques.

En conclusion, on n'observe pas de différence de capacités fonctionnelles entre les CTL mono-spécifiques et les CTL bispécifiques anti-ADV et anti-EBV produits par la technique immunomagnétique en utilisant des pools de peptides synthétiques comme antigène de stimulation. Les CTL bispécifiques présentent une spécificité antigénique, une efficacité et une absence de toxicité. En conséquence, dans un souci de réduction des coûts de production, il est envisageable de produire des CTL bispécifiques anti-ADV et -EBV. Toutefois, pour les donneurs présentant une immunité très importante vis-à-vis des deux virus, l'enrichissement risque d'être altéré et moins performant qu'avec deux productions monospécifiques séparées, le Cytokine Capture System étant dédié aux populations de faible fréquence. Cependant, cela ne semble pas avoir d'impact sur les contrôles fonctionnels.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Les cellules spécifiques anti-virales (VSTs) qui ont démontré leur efficacité clinique, constituent un traitement prometteur des infections virales après allogreffes de cellules souches hématopoïétiques.

Les VSTs peuvent être obtenues par culture cellulaire, par technique immunomagnétique ou par une technique combinée utilisant les deux procédés. Elles peuvent être préparées de façon extemporanée ou subir, après sélection, une étape d'expansion en présence de cytokines avant d'être réinjectées au patient.

La préparation de VSTs doit répondre aux normes GMP mais également obtenir le meilleur ratio bénéfice/coût. De plus, le produit d'immunothérapie doit contenir un nombre suffisant de cellules capables de reconstituer une immunité sur le long terme, le temps que le patient reconstitue une immunité fonctionnelle à partir des cellules souches du greffon.

1. Application clinique des VSTs

- *Nécessité de réactifs de grade clinique*

➤ Antigènes de stimulation :

La production de VSTs anti-EBV nécessite l'utilisation d'antigènes de stimulation répondant aux normes GMP. Au début de nos recherches trois pools de peptides de grades cliniques, correspondant à des protéines latentes ou lytiques de l'EBV, étaient disponibles et commercialisés par la société Miltenyi Biotec. Cependant, ces peptides présentaient de faibles capacités de stimulation et ne permettaient pas d'obtenir une sélection optimale de VSTs. Ainsi, nous avons décidé d'associer, aux deux pools de peptides correspondant aux protéines EBNA1 et BZLF1, l'antigène PepMix décrit dans l'**article 1**. La majorité des peptides des protéines EBNA3A, 3B et 3C qui composaient cet antigène étaient présents dans le mélange de peptides utilisé en clinique par l'équipe allemande de Kolb (Moosmann *et al.*, 2010). L'antigène de stimulation que nous avons utilisé et validé comme engendrant la meilleure sécrétion d'IFN- γ est l'association PepMix+PepT-EBNA1/BZLF1.

Récemment, un pool de peptides EBV appelé *PepTivator® EBV Consensus* a

été développé par la société Miltenyi Biotec. Notre équipe a comparé ce nouvel antigène avec celui que nous utilisons jusqu'à présent et que nous avons validé pour la production de VSTs anti-EBV. Une réponse IFN- γ vis-à-vis du PepTivator® EBV Consensus équivalente voir supérieure à celle de la combinaison de peptides EBV validée, a été observée (Figure 22).

L'utilisation d'antigènes synthétiques permet de diminuer les risques génétiques et infectieux pouvant être rencontrés au cours des productions de VSTs utilisant des antigènes génétiquement modifiés ou des LCL. De plus, l'utilisation d'antigènes synthétiques permet une activation lymphocytaire rapide, que ce soit les lymphocytes CD4+ comme les lymphocytes CD8+, les peptides pouvant être recoupés *in vivo* par des peptidases afin d'intégrer le sillon des molécules HLA de classe I (Maecker *et al.*, 2001).

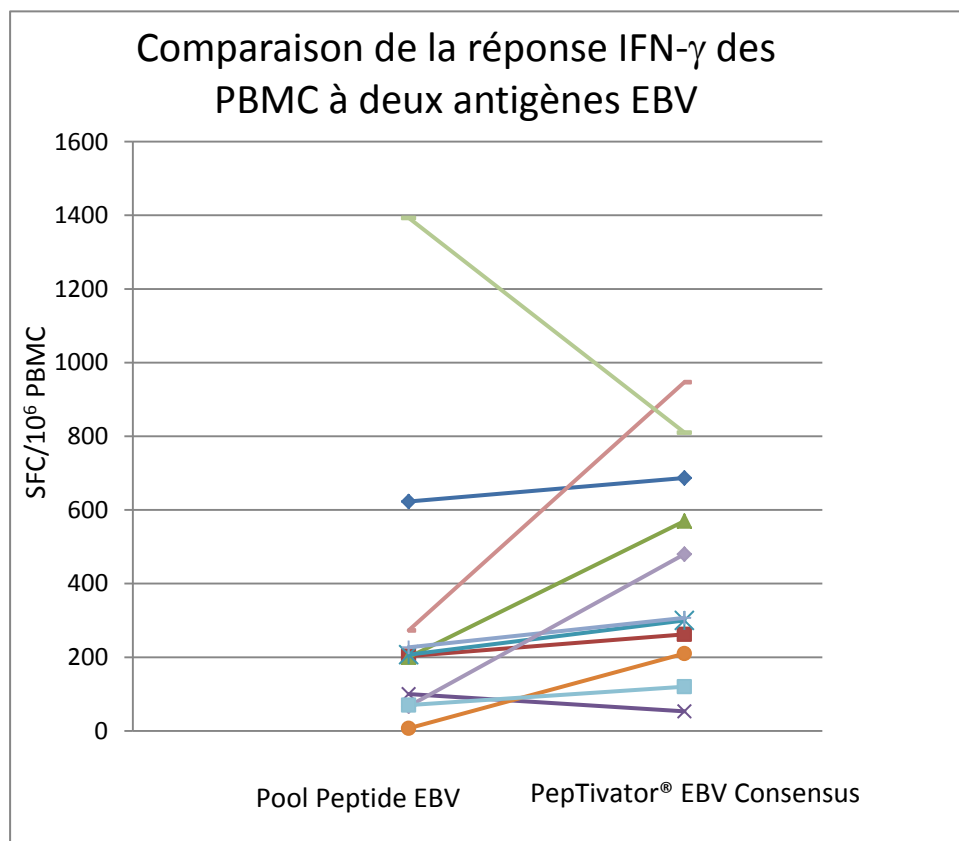


Figure 22. Comparaison de la réponse IFN- γ après stimulation antigénique par ces deux pools de Peptides par technique Elispot IFN- γ chez donneurs saints.

➤ Le Milieu utilisé au cours de la production :

Jusqu'à présent le milieu RPMI+10% SAB était utilisé à l'UTCT pour la production des VSTs. Cependant, les modifications récentes des réglementations Européennes de la thérapie cellulaire ayant entraîné l'attribution du statut de médicament aux VSTs et non plus de préparations de Thérapie cellulaire, ont modifié la donne. En effet, c'est tout l'aspect qualité de production qui est remis en cause, obligeant les établissements concernés à subir de nombreuses modifications afin de se conformer aux Bonnes Pratiques de Fabrication pharmaceutiques. Si le sérum humain AB utilisé par l'UTCT et produit par l'Etablissement Français du Sang (EFS), pouvait réglementairement persister dans la composition du milieu de stimulation des VSTs, nous avons été confrontés à un arrêt complet de la production de SAB de grade clinique en France. Il est alors devenu indispensable de disposer d'un milieu de production des VSTs GMP, produit de manière industrielle. Nous avons alors comparé le milieu de culture cellulaire récemment commercialisé par Miltenyi Biotec, le TexMACS, au RPMI+10% SAB selon les conditions suivantes : RPMI + 10% SAB; TexMACS + 10% SAB et TexMACS seul, pour à terme substituer le TexMACS au RPMI et au SAB.

Dans ce but, les CMNs de trois donneurs ont été stimulés par un pool de peptides spécifiques du CMV, le PeptiVator CMV-pp65, pendant 6 heures et selon les trois conditions précédemment énoncées. Les CTL anti-CMV ont ensuite été sélectionnés par technique immunomagnétique. La stimulation par le CMV a été choisie ici car elle engendre un nombre élevé de cellules spécifiques. Or, nous avons comparé les 3 milieux sur un même prélèvement pour chacun des 3 donneurs et avons de ce fait réalisé les sélections sur de petites quantités de cellules.

Une comparaison de la pureté des VSTs après sélection mais aussi de leur efficacité, toxicité, spécificité *in vitro* après expansion a permis de mettre en évidence que l'utilisation du TexMACS ne modifiait pas la qualité de la production des VSTs que ce soit d'un point de vue qualitatif ou quantitatif.

L'efficacité a été évaluée *in vitro* par le biais test de cytotoxicité (Figure 23).

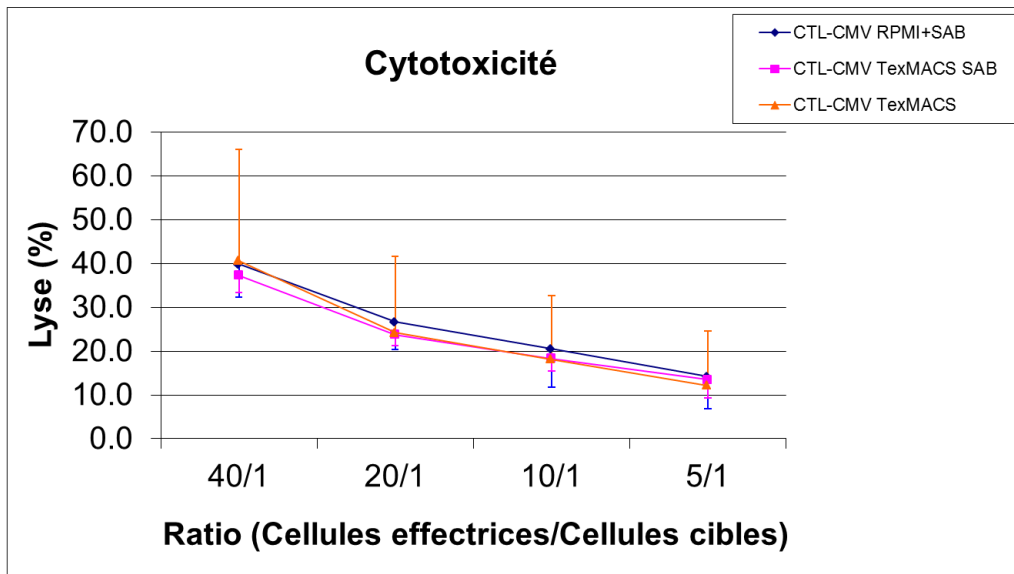


Figure 23. Comparaison de cytotoxicité pour les CTLs produits avec les différents milieux de culture.

Dans la conclusion de notre **article 1**, nous déplorons de devoir utiliser un pool de peptides qui n'était pas GMP et espérons que nos résultats encourageraient les industriels à produire un tel antigène de grade clinique. Nous sommes rassurés de constater que cet antigène est en développement et qu'il donne des résultats particulièrement satisfaisants. Nous sommes maintenant en mesure de produire des CTL anti-EBV de grade clinique sous réserve de l'obtention d'une autorisation de protocole clinique par l'ANSM.

- ***Méthode de production conforme à la réglementation européenne***

Bien qu'utilisée en première intention par certaines équipes, notamment celle de Huston (USA) qui a recours à ses propres antigènes de stimulation (LCL pour l'EBV, vecteur ADV modifié par CMV (Ad5f35pp65) ou encore des plasmides intégrant des gènes viraux), la technique de sélection par culture cellulaire reste peu utilisée en France en raison des risques et contraintes qu'elle entraîne. En effet, malgré les progrès techniques réalisés ces dernières années avec notamment le développement de bioréacteurs comme le G-REX et l'optimisation cytokinique permettant une réduction de la durée du procédé, la sélection par culture cellulaire

reste une technique longue et difficile à mettre en œuvre que ce soit par le temps qu'elle nécessite et qui entraîne inévitablement une augmentation du risque de contamination ou par la difficulté à qualifier ce procédé. Par ailleurs, l'apparition en 2004 d'une technique de sélection immunomagnétique de VSTs basée sur la sécrétion d'IFN- γ a donné naissance à une alternative de sélection à la technique de culture cellulaire. Mise en place par l'équipe de Feuchtinger, elle a prouvé son efficacité pour la production de VSTs anti-ADV (2006, 2013), anti-CMV (2010) et anti-EBV (2010, 2012). Cette technique rapide, sûre et de grade clinique, a été préférée à la culture cellulaire par notre équipe pour la production de CTLs antiviraux.

Récemment, la société Miltenyi Biotec a développé et mis sur le marché une nouvelle génération de CliniMACS : le CliniMACS Prodigy. Cet automate doté d'un système clos permet non seulement de réaliser l'étape de sélection immunomagnétique mais aussi celles ayant lieu en amont de la sélection : la stimulation antigénique, les lavages et les deux marquages cellulaires par les anticorps (anticorps bivalent anti CD45 / anti-IFN- γ et anticorps anti-IFN- γ couplé à une bille immunomagnétique). Ce système clos et automatique réduit les risques de contamination au cours de la production de VSTs et augmente la reproductibilité. Ce type d'automate nous permettrait d'améliorer la qualité de notre production car malgré notre expérience acquise au fil du temps sur la production de VSTs, par la mise en place d'un protocole clinique et par les multiples essais réalisés avant son instauration, la reproductibilité n'a pas toujours été optimale.

Par la modification du cadre réglementaire encadrant les Médicaments de Thérapie Innovante, qui désormais demandent une production conforme aux Bonnes Pratiques Pharmaceutiques, le processus de production des CTLs se doit d'être fiable simple et dépourvu de risques biologiques.

- ***Les conditions de mise en œuvre de la sélection immunomagnétique***

Afin d'avoir une production suffisante, il faut que le donneur présente une réponse

cellulaire spécifique. L'équipe de Feuchtinger rapporte un critère pour le choix du donneur, pour la production de CTL anti-ADV, CMV ou EBV, qui est une fréquence de CTL spécifiques du virus donné supérieure à 0,01% (Feuchtinger *et al.*, 2008; 2010 et 2012). Cependant, si la fréquence des CTL antiviraux chez le donneur paraît être un critère important, il est nécessaire de prendre également en considération l'intensité de la sécrétion d'IFN- γ . En effet, lorsque cette intensité est faible, la détection par cytométrie en flux est possible mais le système immunomagnétique n'est pas suffisamment performant pour sélectionner ces cellules. Nous avons pu observer que les cellules sécrétant avec une faible intensité l'IFN γ et présentant en cytométrie en flux une intensité moyenne de fluorescence faible n'étaient pas sélectionnées par le système et se retrouvaient dans la fraction négative (Figure 24).

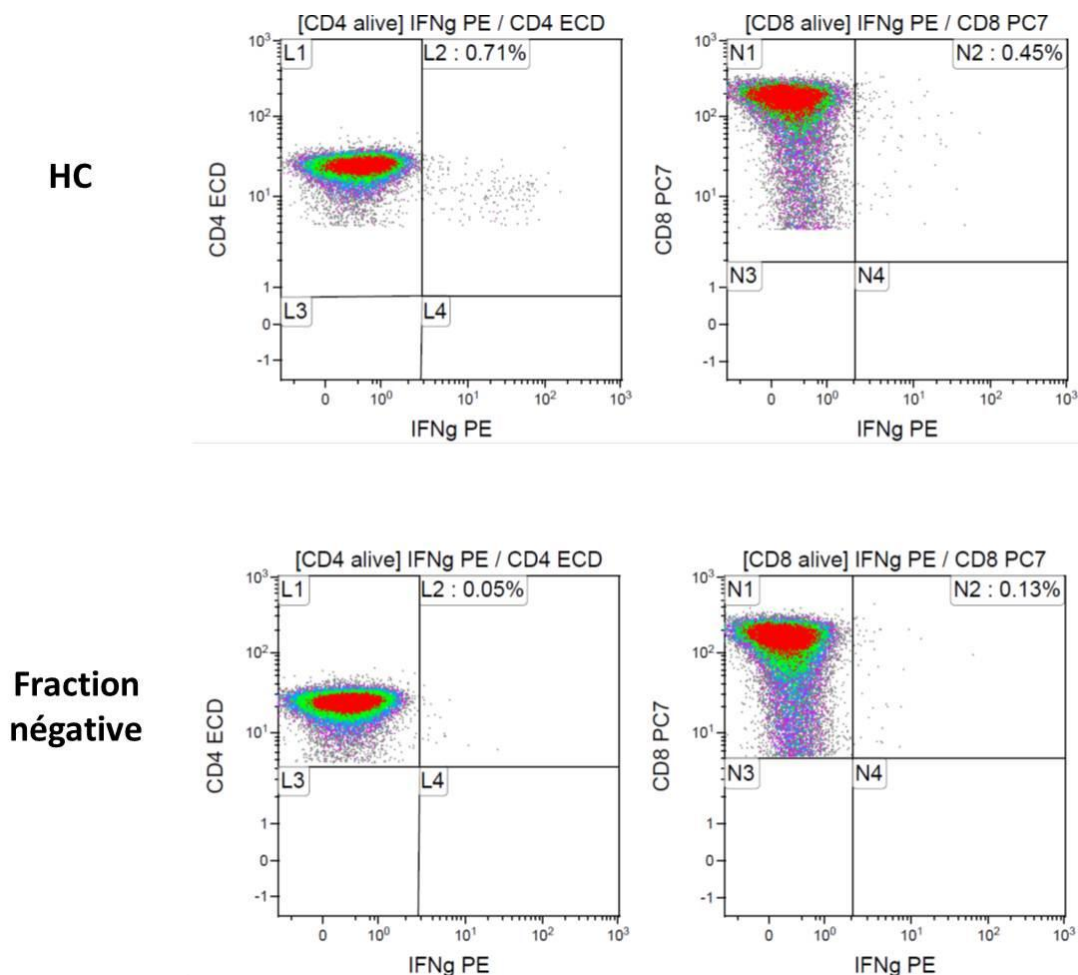


Figure 24. Les cellules sécrétant IFN- γ en faible intensité ne sont pas sélectionnées par le système immunomagnétique.

En contrôlant la réponse immunitaire du donneur par Elispot IFN- γ , les réglages du

lecteur Bioreader étant réalisés afin de ne compter que les spots de taille suffisante, nous quantifions ainsi les cellules spécifiques sécrétant l'IFN- γ avec une bonne intensité. C'est ainsi que dans le cadre d'une manipulation clinique, nous avons observé une fréquence de 0,109% de CTL anti-ADV (CD3IFN- γ) du donneur sur les CD3 alors qu'une fréquence de 31 SFC/10⁶PBMC a été obtenue en Elispot. La sélection immunomagnétique a échoué ne permettant pas un enrichissement suffisant en cellules spécifiques (Figure 25).

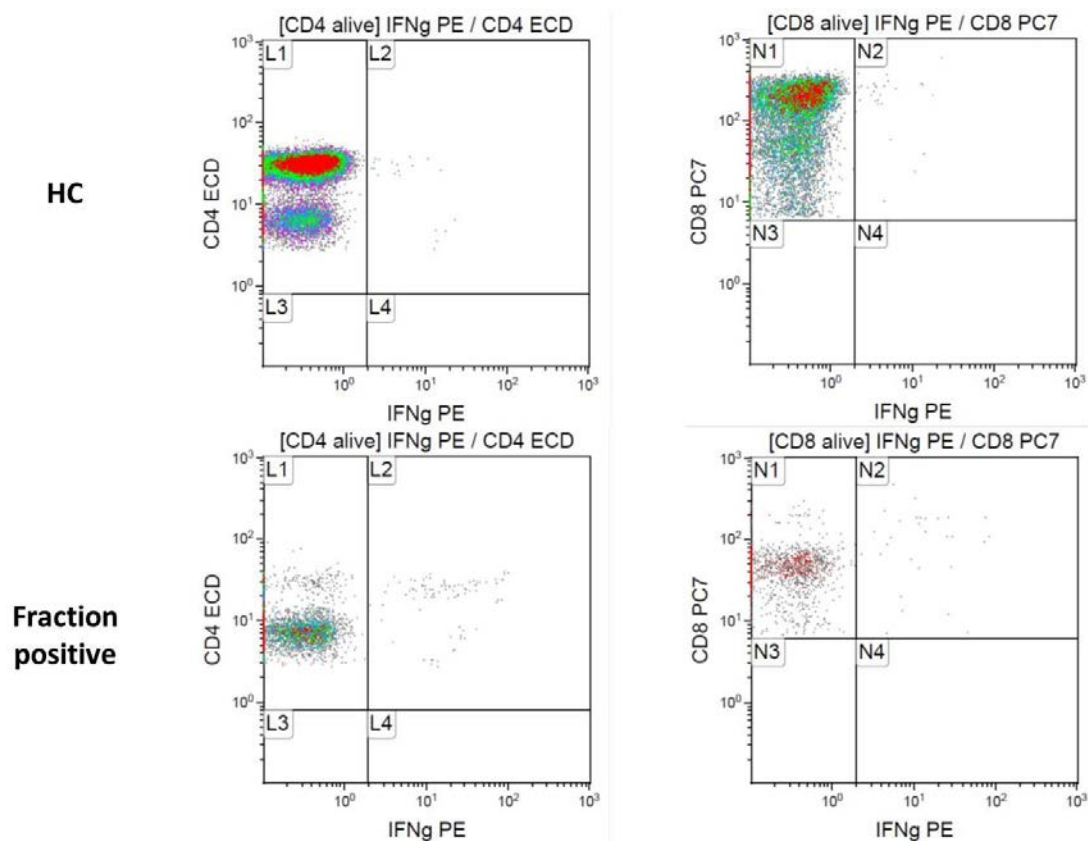


Figure 25. Exemple de donneur présentant une sécrétion d'IFN- γ de faible intensité en réponse à la stimulation par l'antigène : enrichissement insuffisant dans la fraction positive.

Nous avons pu montrer que les lymphocytes T les plus différenciés étaient ceux qui sécrétaient l'IFN- γ avec la plus grande intensité et qui étaient majoritairement sélectionnés par le système immunomagnétique. Il est probable que lorsque les populations différenciées sont en trop faible nombre, l'intensité de sécrétion d'IFN- γ est alors insuffisante pour permettre une sélection correcte.

En conséquence, la prise en compte de la fréquence des CTL antiviraux chez le

donneur doit être assortie d'une estimation de l'intensité moyenne de sécrétion d'IFN- γ soit par l'évaluation de l'Intensité moyenne de fluorescence en cytométrie en flux, soit par la réalisation d'un test Elispot IFN- γ .

2. Les Sous-populations lymphocytaires T

La composition des VSTs en chaque sous-population de lymphocytes T présentant une fonctionnalité, une durée de vie, des capacités d'auto-renouvellement et d'alloréactivité particulières, est devenue un paramètre essentiel à caractériser afin d'appréhender au mieux l'efficacité de l'immunothérapie adoptive. En effet, le compartiment cellulaire T est un compartiment extrêmement hétérogène où le degré de différenciation des cellules induira des propriétés plus ou moins fortes de cytotoxicité et d'auto-renouvellement.

Ainsi, les lymphocytes T les plus indifférenciés présentent de fortes capacités d'auto-renouvellement corrélées à leur capacité à produire de l'IL-2 et sont dépourvues de propriétés de cytotoxicité immédiate dues à une faible capacité de sécrétion d'IFN- γ . Ces populations faiblement différenciées qui comprennent les sous-populations T_N , T_{SCM} et T_{CM} assurent, *via* leur propriété proliférative et leur longue demi-vie, la reconstitution immunitaire antivirale sur le long terme chez le patient. De plus, il est à noter qu'une de ces sous-populations a été décrite comme jouant un rôle primordial dans le domaine de l'immunothérapie cellulaire antivirale et anticancéreuse : les T_{SCM} . En effet, cette sous-population par son caractère de cellule souche est capable de donner naissance à l'ensemble des sous-populations T et en conséquence est à l'origine de la reconstitution immunitaire sur le long terme.

Comme nous l'avons décrit dans la première partie, l'immunothérapie cellulaire adoptive idéale consisterait à favoriser l'effet GvL ou anti-infectieux sans générer de GvHD. Plusieurs auteurs se sont intéressés au rôle des cellules indifférenciées CD45RA⁺ dans la génération de la GvHD. Une étude fondamentale menée par l'équipe de Herr en 2010 a montré que les lymphocytes T responsables de l'effet GvL et de l'effet GvHD sont dérivés des cellules T CD45RA⁺ (Disler E *et al.*, 2010). Cette

étude a consisté à identifier par cytométrie en flux les 4 sous-populations composant les lymphocytes T CD4 et T CD8 à l'aide des marqueurs CD45RA, CD45RO, CD62L et CCR7. Ces cellules ont été mises en co-culture avec des K562 transfectés avec différents allèles du système HLA et des Blastes issus de leucémies aiguës myéloïdes. La prolifération alloréactive a été détectée par la sécrétion de cytokine IFN- γ . Le nombre de cellules effectrices allogéniques vis-à-vis du système HLA était en médiane 7,2 et 16,6 fois plus faible respectivement pour les populations T CD8 CD45RA- et T CD4 CD45RA- comparativement à l'ensemble des lymphocytes T CD4 et CD8. En conséquence, éliminer des greffons les populations T CD45RA+ pouvait s'avérer intéressant dans le but de minimiser le risque de survenue de GvHD. Par ailleurs, cette même équipe a effectué une déplétion de grade clinique de lymphocytes T CD45RA+ par le système CliniMACS en utilisant un anticorps anti-CD45RA couplé à une bille immunomagnétique. Six déplétions ont été réalisées avec plus de 99.9% des cellules CD3 CD45RA+ qui ont été éliminées de l'échantillon cellulaire. Une médiane de 47,1% (39,8–59,6%) de cellules CD3 CD45RA- isolées a été observée. La comparaison de l'échantillon déplété vis-à-vis de l'échantillon non déplété montre un *ratio* plus important de CD4/CD8 dans l'échantillon CD45RA- par rapport à l'échantillon contenant des cellules CD45RA+. Les cellules de la fraction positive sont majoritairement les lymphocytes T mémoires effecteurs et centraux. La même sécrétion d'IFN- γ vis-à-vis des antigènes synthétiques spécifiques du CMV, de l'EBV, de *Candida albicans* et d'*Aspergillus fumigatus* a été observée montrant l'absence de perte de spécificité anti-virale secondaire à la déplétion en cellules CD45RA+. Par ailleurs, il a été noté une diminution du nombre de lymphocytes T CD8 alloréactifs au sein de l'échantillon dépourvu de cellules CD45RA+. En revanche, cette observation n'a pas été mise en évidence pour les lymphocytes T CD4. Cette constatation est probablement liée aux réactivités croisées avec les infections virales (Teschner *et al.*, 2014). Une autre étude de Bleakley a confirmé cette possibilité d'immunothérapie par une déplétion de lymphocytes T CD45RA+ en gardant les lymphocytes spécifiques contre les pathogènes (Bleakley *et al.*, 2014).

Toutefois, ces protocoles de déplétion de lymphocytes T CD45RA⁺ entraînent à la fois la déplétion des lymphocytes T naïfs et aussi des T_{SCM}. Or, le rôle des T_{SCM} dans le déclenchement de la GvHD n'est pas encore parfaitement identifié. Cieri *et al*, après avoir démontré que les T_{SCM} étaient capables de déclencher une xeno-GvHD après injection chez la souris, ont analysé les lymphocytes circulants chez 10 patients un mois après allogreffe de CSH (Cieri *et al.*, 2012 ; Cieri *et al.*, 2013). Parmi les T CD8⁺, une accumulation significative des T_{SCM} a été décrite comparée à des témoins sains. Les auteurs ont montré une corrélation entre le nombre de T_{SCM} et l'incidence et la sévérité de la GvHD. Le taux de T_{SCM} s'est même révélé prédictif de la survenue ultérieure d'une GvHD. Les patients avec des taux élevés de T_{SCM} ont nécessité des doses d'immunosuppresseurs significativement plus élevées. Enfin, lorsque les GvHD ont été résolues, les taux de T_{SCM} ont été réduits de manière très importante. Bien que ces observations portent sur un petit échantillon, elles plaident en faveur d'un effet alloréactif important des T_{SCM}.

Cette étude tend à montrer que ce sont les populations les plus indifférenciées qui seraient à l'origine de l'effet GvHD alors que ce sont ces mêmes cellules qui, par leur forte capacité d'auto-renouvellement, permettront de reconstituer une défense immunitaire sur le long terme chez le patient. Toutefois, au sein des VSTs, on peut se poser la question de la nécessité du caractère durable de l'immunité cellulaire transmise. En effet, cette immunité adoptive est cruciale pendant la période d'immunosuppression du receveur. Cependant, le patient est amené à reconstituer une immunité à partir des cellules souches du greffon. En conséquence, les VSTs injectés doivent permettre de couvrir cette période d'immunodépression, le temps qu'une immunité durable se reconstitue chez le receveur. Sur la base de ces hypothèses, on peut déduire que les VSTs produits par technique immunomagnétique : -qui conduit à une suspension cellulaire concentrée en cellules les plus différenciées, alors que les sous populations T les moins différenciées sont très peu représentées - répondent aux objectifs : reconstitution d'une immunité temporaire et faible risque de générer une GVHD. Toutefois, la quantité de VSTs obtenus par cette technique étant très faible, leur efficacité repose sur leur formidable capacité d'expansion. Or l'on sait que la

meilleure capacité d'expansion est détenue par la sous-population T_{SCM}. Est-il alors envisageable que le très faible nombre de T_{SCM} contenu dans les VSTs suffise pour observer une telle expansion *in vivo* ? La poursuite des études préliminaires réalisées sur les sous populations T, notamment corrélées à une efficacité clinique apportera des éléments de réponse à cette question.

3. Accessibilité des VSTs

-VSTs de tierce partie :

En cas de greffe de CSH issues de sang de cordon ou issues de donneurs ne présentant pas une immunité cellulaire vis-à-vis du pathogène incriminé, la production de VSTs nécessitera le recours à un donneur différent de celui des CSH. Les CMN issues d'une tierce partie permettent d'obtenir une production satisfaisante de VSTs et de lymphocytes T mémoires.

-VSTs issues de CSH décongelées :

La possibilité d'obtenir des VSTs à partir de CSH décongelées faciliterait l'organisation de la production et l'absence de convocation des donneurs permettrait un gain de temps notable. Cependant le risque majeur avec l'obtention de VSTs à partir de CSH décongelées est de diminuer la viabilité cellulaire qui est déjà amoindrie par l'utilisation du système CliniMACS qui tend à concentrer les cellules mortes. En effet, nous avons observé que les VSTs produites avec des CSP décongelées présentaient une moins bonne pureté et viabilité que celles issues de CSP fraîches. Par ailleurs, il est important de noter que la réponse immunitaire cellulaire spécifique varie au cours de la vie d'un individu et qu'elle peut donc être à un faible niveau au moment de la congélation des CSH. De plus, il n'est pas exclu que la congélation altère des réponses immunitaires spécifiques, notamment les plus faibles comme celles liées à l'Adénovirus.

-VSTs issues de banque

Actuellement il y a trois banques de CTLs existantes : une banque de CTL-EBV en Ecosse (44 patients); une banque de CTL-EBV en France (11 patients) et une banque

de CTL tri-virus (ADV/CMV/EBV) aux USA (50 patients). Au total, 105 patients ont bénéficié d'une injection de VSTs issus de banque : 62 dans le cadre d'une infection à EBV, 25 pour une infection à CMV et 18 ayant une infection à ADV. Environ 70% des patients ont présenté une réponse à l'injection sans qu'aucun effet indésirable notable n'ait été observé.

L'une des difficultés majeures de la mise en place d'une banque par une structure de type pharmaceutique produisant des Médicaments de Thérapie Innovante réside dans le fait qu'elle doit être capable de répondre aux demandes en produisant et en stockant un nombre suffisant de VSTs. Dans cette optique, il est nécessaire que les cellules soient au préalable amplifiées *in vitro* avant d'être cryoconservées. Cependant, ceci les soumet à un risque potentiel de contamination microbiologique mais également de modification phénotypique. En effet, nous avons pu observer par l'analyse en cytométrie en flux des sous-populations qu'une expansion *in vitro* en présence d'IL-2 et une décongélation entraînent une disparition des sous-populations T_N et T_{SCM} au sein de l'échantillon cellulaire. Outre le risque de contamination, le temps de production et d'amplification génèrent des coûts non négligeables, que ce soit par la consommation de réactifs ou par la nécessité d'employer un personnel qualifié. Une diminution du temps d'obtention de VSTs est donc nécessaire pour obtenir un rapport bénéfice/coût optimal. De plus, la mise en place d'une banque de VSTs nécessiterait l'évaluation du contexte HLA de la population afin de produire des VSTs couvrant, dans l'idéal, les HLA prédominants.

Vickers *et al* ont montré que 15 donneurs bien sélectionnés pouvaient couvrir 57% de la population des patients. Ce taux montait à 85% avec 25 donneurs. Cependant, accroître au-delà le panel de donneurs ne permettaient plus d'augmenter les chances de compatibilité (Vickers *et al.*, 2014).

Il est envisageable que la production future de VSTs se tourne vers l'isolement des cellules spécifiques par technique immunomagnétique après stimulation antigénique *via* des peptides synthétiques avant d'être amplifiées *in vitro* en présence d'un cocktail cytokinique adapté (d'après l'équipe de Leen, IL-4+IL-7) afin d'obtenir un nombre de cellules efficaces et spécifiques suffisant avant réinjection. Toutefois,

certaines équipes préconisent la culture seule sans étape préalable de sélection immunopagnétique.

4. Amélioration des performances des VSTs

Dans l'optique de couvrir le maximum d'infections virales après allogreffe de CSH il est souhaitable de produire des lymphocytes T multifonctionnels.

➤ *Cellules ciblant plusieurs pathogènes.*

L'équipe de Leen a montré l'efficacité de VSTs bispécifiques (ADV/EBV) et tri-spécifiques (ADV/EBV/CMV) dans le cadre d'infections virales chez des patients immunodéprimés. Cette même équipe a récemment traité 11 patients avec des VSTs dirigés contre cinq pathogènes : EBV, CMV, Adv, BK, HHV6. Les VSTs ont été produits par culture cellulaire en présence d'IL-4 et IL-7 après stimulation antigénique *via* des antigènes de synthèse.

Dans la perspective de développer des CTLs multi-virus, nous avons montré la faisabilité de la production de CTLs à la fois anti-ADV et anti-EBV. Cette unique production permet non seulement une réduction des coûts mais permet aussi la possibilité de traiter deux infections opportunistes en même temps. Par ailleurs, une injection unique de CTLs bispécifiques permettrait de réduire l'alloréactivité des VSTs par rapport à deux injections de CTLs monospécifiques.

➤ *Les VSTs résistants aux immunosuppresseurs.*

Bien que la vulnérabilité des CTL anti-infectieux aux différents immunosuppresseurs n'ait pas été décrite, il est raisonnable de penser que ces derniers limitent la persistance et l'efficacité des CTL administrés *in vivo*. Quelques équipes se sont penchées sur le transfert d'un gène de résistance aux immunosuppresseurs de la famille des inhibiteurs de la Calcineurine dans les CTL anti-infectieux (Brewin *et al.*, 2009 ; De Angelis *et al.*, 2009). Récemment cette équipe a mis au point la production de CTL-EBV résistants à Calcineurine avec la technique immunomagnétique basée sur la sécrétion d' IFN- γ (Ricciardelli *et al.*, 2013).

BIBLIOGRAPHIE

Adhikary, D., Behrends, U., Moosmann, A., Witter, K., Bornkamm, G.W., and Mautner, J. (2006). Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J. Exp. Med.* *203*, 995–1006.

Ahmed, R., Bevan, M.J., Reiner, S.L., and Fearon, D.T. (2009). The precursors of memory: models and controversies. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 662–668.

Aïssi-Rothé, L., Decot, V., Venard, V., Jeulin, H., Salmon, A., Clement, L., Kennel, A., Mathieu, C., Dalle, J.H., Rauser, G., et al. (2010). Rapid generation of full clinical-grade human antiadenovirus cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy. *J. Immunother.* *33*, 414–424.

Al, A., and L, S. (1993). Pathogenesis of GVHD: role of herpes viruses. *Bone Marrow Transplant* *11*, 349–355.

Alpdogan, O., Eng, J.M., Muriglan, S.J., Willis, L.M., Hubbard, V.M., Tjoe, K.H., Terwey, T.H., Kochman, A., and van den Brink, M.R.M. (2005). Interleukin-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* *105*, 865–873.

Amir, A.L., D’Orsogna, L.J.A., Roelen, D.L., van Loenen, M.M., Hagedoorn, R.S., de Boer, R., van der Hoorn, M.A.W.G., Kester, M.G.D., Doxiadis, I.I.N., Falkenburg, J.H.F., et al. (2010). Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T cells is common. *Blood* *115*, 3146–3157.

Amrolia, P.J., Muccioli-Casadei, G., Huls, H., Adams, S., Durett, A., Gee, A., Yvon, E., Weiss, H., Cobbold, M., Gaspar, H.B., et al. (2006). Adoptive immunotherapy with allodepleted donor T-cells improves immune reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. *Blood* *108*, 1797–1808.

Anasetti, C., Logan, B.R., Lee, S.J., Waller, E.K., Weisdorf, D.J., Wingard, J.R., Cutler, C.S., Westervelt, P., Woolfrey, A., Couban, S., et al. (2012). Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N. Engl. J. Med.* *367*, 1487–1496.

André-Schmutz, I., Le Deist, F., Hacein-Bey, S., Hamel, Y., Vitetta, E., Schindler, J., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2002a). Donor T lymphocyte infusion following ex vivo depletion of donor anti-host reactivity by a specific anti-interleukin-2 receptor P55 chain immunotoxin. *Transplant. Proc.* *34*, 2927–2928.

André-Schmutz, I., Le Deist, F., Hacein-Bey-Abina, S., Vitetta, E., Schindler, J., Chedeville, G., Vilmer, E., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2002b). Immune reconstitution without graft-versus-host disease after haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 study. *Lancet* *360*, 130–137.

De Angelis, B., Dotti, G., Quintarelli, C., Huye, L.E., Zhang, L., Zhang, M., Pane, F., Heslop, H.E., Brenner, M.K., Rooney, C.M., et al. (2009). Generation of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes resistant to the immunosuppressive drug tacrolimus (FK506). *Blood* *114*, 4784–4791.

Annels, N.E., Kalpoe, J.S., Bredius, R.G.M., Claas, E.C., Kroes, A.C.M., Hislop, A.D., van Baarle, D., Egeler, R.M., van Tol, M.J.D., and Lankester, A.C. (2006). Management of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation after allogeneic stem cell transplantation by simultaneous analysis of EBV DNA load and EBV-specific T cell reconstitution. *Clin. Infect. Dis.* 42, 1743–1748.

Appay, V., van Lier, R.A.W., Sallusto, F., and Roederer, M. (2008). Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 73, 975–983.

Arav-Boger, R., Echavarria, M., Forman, M., Charache, P., and Persaud, D. (2000). Clearance of adenoviral hepatitis with ribavirin therapy in a pediatric liver transplant recipient. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19, 1097–1100.

Aris, R.M., Maia, D.M., Neuringer, I.P., Gott, K., Kiley, S., Gertis, K., and Handy, J. (1996). Post-transplantation lymphoproliferative disorder in the Epstein-Barr virus-naïve lung transplant recipient. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, 1712–1717.

Aversa, F., Tabilio, A., Terenzi, A., Velardi, A., Falzetti, F., Giannoni, C., Iacucci, R., Zei, T., Martelli, M.P., and Gambelunghe, C. (1994). Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical “three-loci” incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood* 84, 3948–3955.

Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., and Séguin, C. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310, 207–211.

Baldanti, F., Grossi, P., Furione, M., Simoncini, L., Sarasini, A., Comoli, P., Maccario, R., Fiocchi, R., and Gerna, G. (2000). High levels of Epstein-Barr virus DNA in blood of solid-organ transplant recipients and their value in predicting posttransplant lymphoproliferative disorders. *J. Clin. Microbiol.* 38, 613–619.

Bao, L., Cowan, M.J., Dunham, K., Horn, B., McGuirk, J., Gilman, A., and Lucas, K.G. (2012). Adoptive immunotherapy with CMV-specific cytotoxic T lymphocytes for stem cell transplant patients with refractory CMV infections. *J. Immunother.* 35, 293–298.

Barker, J.N., Doubrovina, E., Sauter, C., Jaroscak, J.J., Perales, M.A., Doubrovin, M., Prockop, S.E., Koehne, G., and O’Reilly, R.J. (2010). Successful treatment of EBV-associated posttransplantation lymphoma after cord blood transplantation using third-party EBV-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 116, 5045–5049.

Barnes, D.W., and Loutit, J.F. (1957). Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II. *Br. J. Haematol.* 3, 241–252.

Baron, F., and Storb, R. (2012). Mesenchymal Stromal Cells: A New Tool against Graft-versus-Host Disease? *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 18, 822–840.

Baron, F., Storb, R., and Little, M.-T. (2003). Hematopoietic cell transplantation: five decades of progress. *Arch. Med. Res.* 34, 528–544.

Baron, F., Lechanteur, C., Willems, E., Bruck, F., Baudoux, E., Seidel, L., Vanbellinghen, J.-F., Haffraoui, K., Lejeune, M., Gothot, A., et al. (2010). Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 16, 838–847.

Bemark, M., Holmqvist, J., Abrahamsson, J., and Mellgren, K. (2012). Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation – revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes. *Clinical & Experimental Immunology* 167, 15–25.

Blair, G.E., and Blair-Zajdel, M.E. (2004). Evasion of the immune system by adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 273, 3–28.

Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M., and Ringdén, O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363, 1439–1441.

Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M.E., Remberger, M., et al. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371, 1579–1586.

Bleakley, M., and Riddell, S.R. (2004). Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat. Rev. Cancer* 4, 371–380.

Bleakley, M., Heimfeld, S., Jones, L.A., Turtle, C., Krause, D., Riddell, S.R., and Shlomchik, W. (2014). Engineering human peripheral blood stem cell grafts that are depleted of naïve T cells and retain functional pathogen-specific memory T cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 20, 705–716.

Blyth, E., Clancy, L., Simms, R., Ma, C.K.K., Burgess, J., Deo, S., Byth, K., Dubosq, M.-C., Shaw, P.J., Micklethwaite, K.P., et al. (2013). Donor-derived CMV-specific T cells reduce the requirement for CMV-directed pharmacotherapy after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 121, 3745–3758.

Von Bonin, M., Stölzel, F., Goedecke, A., Richter, K., Wuschek, N., Hölig, K., Platzbecker, U., Illmer, T., Schaich, M., Schetelig, J., et al. (2009). Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant.* 43, 245–251.

Bordigoni, P., Carret, A.S., Venard, V., Witz, F., and Le Faou, A. (2001). Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 32, 1290–1297.

Borza, C.M., and Hutt-Fletcher, L.M. (2002). Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat. Med.* 8, 594–599.

Bradley, R.R., Lynch, D.M., Iampietro, M.J., Borducchi, E.N., and Barouch, D.H. (2012). Adenovirus serotype 5 neutralizing antibodies target both hexon and fiber following vaccination and natural infection. *J. Virol.* 86, 625–629.

Bretagne, S., Vidaud, M., Kuentz, M., Cordonnier, C., Henni, T., Vinci, G., Goossens, M., and Vernant, J.P. (1987). Mixed blood chimerism in T cell-depleted bone marrow transplant recipients: evaluation using DNA polymorphisms. *Blood* 70, 1692–1695.

Brewin, J., Mancao, C., Straathof, K., Karlsson, H., Samarasinghe, S., Amrolia, P.J., and Pule, M. (2009). Generation of EBV-specific cytotoxic T cells that are resistant to calcineurin inhibitors for the treatment of posttransplantation lymphoproliferative disease. *Blood* 114, 4792–4803.

Brunstein, C.G., Miller, J.S., Cao, Q., McKenna, D.H., Hippen, K.L., Curtsinger, J., Defor, T., Levine, B.L., June, C.H., Rubinstein, P., et al. (2011). Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 117, 1061–1070.

Brusic, A., and Wu, C.J. (2012). Enhancing graft-versus-leukemia after transplant: the rise of anti-cancer vaccines. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17, 635–655.

Callan, M.F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G.S., Wilson, J.D., O’Callaghan, C.A., Steven, N., McMichael, A.J., and Rickinson, A.B. (1998). Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J. Exp. Med.* 187, 1395–1402.

Cantoni, N., Hirsch, H.H., Khanna, N., Gerull, S., Buser, A., Bucher, C., Halter, J., Heim, D., Tichelli, A., Gratwohl, A., et al. (2010). Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 16, 1309–1314.

Casucci, M., Bondanza, A., Falcone, L., Provasi, E., Magnani, Z., and Bonini, C. (2012). Genetic engineering of T cells for the immunotherapy of haematological malignancies. *Tissue Antigens* 79, 4–14.

Cavazzana-Calvo, M., Bensussan, D., Jabado, N., Haddad, E., Yvon, E., Moskwa, M., Tachet des Combes, A., Buisson, M., Morand, P., Virion, J.M., et al. (1998). Prevention of EBV-induced B-lymphoproliferative disorder by ex vivo marrow B-cell depletion in HLA-phenotypical or non-identical T-depleted bone marrow transplantation. *Br. J. Haematol.* 103, 543–551.

Cavazzana-Calvo, M., André-Schmutz, I., Dal Cortivo, L., Neven, B., Hacein-Bey-Abina, S., and Fischer, A. (2009). Immune reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation: obstacles and anticipated progress. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 544–548.

Cesarman, E., Inghirami, G., Chadburn, A., and Knowles, D.M. (1993). High levels of p53 protein expression do not correlate with p53 gene mutations in anaplastic large cell lymphoma. *Am. J. Pathol.* 143, 845–856.

Chakrabarti, S., Collingham, K.E., Fegan, C.D., and Milligan, D.W. (1999). Fulminant adenovirus hepatitis following unrelated bone marrow transplantation: failure of intravenous ribavirin therapy. *Bone Marrow Transplant.* 23, 1209–1211.

Chakrabarti, S., Collingham, K.E., Fegan, C.D., Pillay, D., and Milligan, D.W. (2000). Adenovirus infections following haematopoietic cell transplantation: is there a role for adoptive immunotherapy? *Bone Marrow Transplant.* 26, 305–307.

Chakrabarti, S., Milligan, D.W., Pillay, D., Mackinnon, S., Holder, K., Kaur, N., McDonald, D., Fegan, C.D., Waldmann, H., Hale, G., et al. (2003). Reconstitution of the Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocyte response following T-cell-depleted myeloablative and nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 102, 839–842.

Chatziandreou, I., Gilmour, K.C., McNicol, A.-M., Costabile, M., Sinclair, J., Cubitt, D., Campbell, J.D.M., Kinnon, C., Qasim, W., and Gaspar, H.B. (2007). Capture and generation of adenovirus specific T cells for adoptive immunotherapy. *Br. J. Haematol.* 136, 117–126.

Cheuk, D.K. (2013). Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *World J Transplant* 3, 99–112.

Chijioke, O., Azzi, T., Nadal, D., and Münz, C. (2013). Innate immune responses against Epstein Barr virus infection. *J. Leukoc. Biol.* 94, 1185–1190.

Childs, R., Sanchez, C., Engler, H., Preuss, J., Rosenfeld, S., Dunbar, C., van Rhee, F., Plante, M., Phang, S., and Barrett, A.J. (1998). High incidence of adeno- and polyomavirus-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow allotransplantation for hematological malignancy following T cell depletion and cyclosporine. *Bone Marrow Transplant.* 22, 889–893.

Cieri, N., Camisa, B., Cocchiarella, F., Forcato, M., Oliveira, G., Provati, E., Bondanza, A., Bordignon, C., Peccatori, J., Ciceri, F., et al. (2013). IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood* 121, 573–584.

Clave, E., Agbalika, F., Bajzik, V., Peffault de Latour, R., Trillard, M., Rabian, C., Scieux, C., Devergie, A., Socié, G., Ribaud, P., et al. (2004). Epstein-Barr virus (EBV) reactivation in allogeneic stem-cell transplantation: relationship between viral load, EBV-specific T-cell reconstitution and rituximab therapy. *Transplantation* 77, 76–84.

Cobbold, M., Khan, N., Pourgheysari, B., Tauro, S., McDonald, D., Osman, H., Assenmacher, M., Billingham, L., Steward, C., Crawley, C., et al. (2005). Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J. Exp. Med.* 202, 379–386.

Cohen, J.I. (1991). Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease associated with acquired immunodeficiency. *Medicine (Baltimore)* 70, 137–160.

Comoli, P. (2009). Arming CTLs against immunosuppressors. *Blood* 114, 4759–4760.

Comoli, P., Labirio, M., Basso, S., Baldanti, F., Grossi, P., Furione, M., Viganò, M., Fiocchi, R., Rossi, G., Ginevri, F., et al. (2002). 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.

Comoli, P., Pedrazzoli, P., Maccario, R., Basso, S., Carminati, O., Labirio, M., Schiavo, R., Secondino, S., Frasson, C., Perotti, C., et al. (2005). Cell therapy of stage IV nasopharyngeal carcinoma with autologous Epstein-Barr virus-targeted cytotoxic T lymphocytes. *J. Clin. Oncol.* 23, 8942–8949.

Comoli, P., Basso, S., Labirio, M., Baldanti, F., Maccario, R., and Locatelli, F. (2008). T cell therapy of Epstein-Barr virus and adenovirus infections after hemopoietic stem cell transplant. *Blood Cells Mol. Dis.* 40, 68–70.

Cruz, C.R., Hanley, P.J., Liu, H., Torrano, V., Lin, Y.-F., Arce, J.A., Gottschalk, S., Savoldo, B., Dotti, G., Louis, C.U., et al. (2010). Adverse events following infusion of T cells for adoptive immunotherapy: a 10-year experience. *Cytotherapy* 12, 743–749.

Curtis, R.E., Travis, L.B., Rowlings, P.A., Socié, G., Kingma, D.W., Banks, P.M., Jaffe, E.S., Sale, G.E., Horowitz, M.M., Witherspoon, R.P., et al. (1999). Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood* 94, 2208–2216.

Cutler, C., Giri, S., Jeyapalan, S., Paniagua, D., Viswanathan, A., and Antin, J.H. (2001). Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *J. Clin. Oncol.* 19, 3685–3691.

D'Aveni, M., Aïssi-Rothé, L., Venard, V., Salmon, A., Falenga, A., Decot, V., Virion, J.M., Wang, Y., Clement, L., Latger-Cannard, V., et al. (2011). The clinical value of concomitant Epstein Barr virus (EBV)-DNA load and specific immune reconstitution monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl. Immunol.* 24, 224–232.

Van Den Brink, M., Leen, A.M., Baird, K., Merchant, M., Mackall, C., and Bollard, C.M. (2013). Enhancing immune reconstitution: from bench to bedside. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 19, S79–S83.

Dermime, S., Mavroudis, D., Jiang, Y.Z., Hensel, N., Molldrem, J., and Barrett, A.J. (1997). Immune escape from a graft-versus-leukemia effect may play a role in the relapse of myeloid leukemias following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 19, 989–999.

Distler, E., Bloetz, A., Albrecht, J., Asdufan, S., Hohberger, A., Frey, M., Schnürer, E., Thomas, S., Theobald, M., Hartwig, U.F., et al. (2011). Alloreactive and leukemia-reactive T cells are preferentially derived from naive precursors in healthy donors: implications for immunotherapy with memory T cells. *Haematologica* 96, 1024–1032.

Donohue, J., Homge, M., and Kernan, N.A. (1993). Characterization of cells emerging at the time of graft failure after bone marrow transplantation from an unrelated marrow donor. *Blood* 82, 1023–1029.

Dobrovina, E., Oflaz-Sozmen, B., Prockop, S.E., Kernan, N.A., Abramson, S., Teruya-Feldstein, J., Hedvat, C., Chou, J.F., Heller, G., Barker, J.N., et al. (2012). Adoptive immunotherapy with unselected or EBV-specific T cells for biopsy-proven EBV+ lymphomas after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 119, 2644–2656.

Douek, D.C., Vescio, R.A., Betts, M.R., Brenchley, J.M., Hill, B.J., Zhang, L., Berenson, J.R., Collins, R.H., and Koup, R.A. (2000). Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* 355, 1875–1881.

Echavarría, M. (2008). Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 704–715.

Einsele, H., Rauser, G., Grigoleit, U., Hebart, H., Sinzger, C., Riegler, S., and Jahn, G. (2002a). Induction of CMV-specific T-cell lines using Ag-presenting cells pulsed with CMV protein or peptide. *Cytotherapy* 4, 49–54.

Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Löffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H.-G., Kanz, L., et al. (2002b). Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99, 3916–3922.

Epstein, M.A., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1964). VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet* 1, 702–703.

Van Esser, J.W.J., Niesters, H.G.M., van der Holt, B., Meijer, E., Osterhaus, A.D.M.E., Gratama, J.W., Verdonck, L.F., Löwenberg, B., and Cornelissen, J.J. (2002). Prevention of Epstein-Barr virus-lymphoproliferative disease by molecular monitoring and preemptive rituximab in high-risk patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 99, 4364–4369.

Van Esser, J.W., Niesters, H.G., Thijsen, S.F., Meijer, E., Osterhaus, A.D., Wolthers, K.C., Boucher, C.A., Gratama, J.W., Budel, L.M., van der Holt, B., et al. (2001a). Molecular quantification of viral load in plasma allows for fast and accurate prediction of response to therapy of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 113, 814–821.

Van Esser, J.W., van der Holt, B., Meijer, E., Niesters, H.G., Trensche, R., Thijsen, S.F., van Loon, A.M., Frasson, F., Bacigalupo, A., Schaefer, U.W., et al. (2001b). Epstein-Barr virus (EBV) reactivation is a frequent event after allogeneic stem cell transplantation (SCT) and quantitatively predicts EBV-lymphoproliferative disease following T-cell-depleted SCT. *Blood* 98, 972–978.

Fang, B., Song, Y.P., Liao, L.M., Han, Q., and Zhao, R.C. (2006). Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus-host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 38, 389–390.

Fefer, A. (2003). Graft-Vs.-Tumor Responses. In Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation, K.G.B. MD, S.J.F. MD, and F.R.A. MD, eds. (Blackwell Publishing Ltd), pp. 369–379.

Ferrara, J.L., and Deeg, H.J. (1991). Graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* 324, 667–674.

Ferrara, J.L.M., and Reddy, P. (2006). Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin. Hematol.* 43, 3–10.

Ferrara, J.L., Levine, J.E., Reddy, P., and Holler, E. (2009). Graft-versus-host disease. *The Lancet* 373, 1550–1561.

Feuchtinger, T., Lang, P., Hamprecht, K., Schumm, M., Greil, J., Jahn, G., Niethammer, D., and Einsele, H. (2004). Isolation and expansion of human adenovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells according to IFN-gamma secretion for adjuvant immunotherapy. *Exp. Hematol.* 32, 282–289.

Feuchtinger, T., Richard, C., Pfeiffer, M., Neuhäuser, F., Lücke, J., Handgretinger, R., Greil, J., Bader, P., Klingebiel, T., Schlegel, P.-G., et al. (2005a). Adenoviral infections after transplantation of positive selected stem cells from haploidentical donors in children: an update. *Klin Padiatr* 217, 339–344.

Feuchtinger, T., Lücke, J., Hamprecht, K., Richard, C., Handgretinger, R., Schumm, M., Greil, J., Bock, T., Niethammer, D., and Lang, P. (2005b). Detection of adenovirus-specific T cells in children with adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 128, 503–509.

Feuchtinger, T., Matthes-Martin, S., Richard, C., Lion, T., Fuhrer, M., Hamprecht, K., Handgretinger, R., Peters, C., Schuster, F.R., Beck, R., et al. (2006). Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 134, 64–76.

Feuchtinger, T., Richard, C., Joachim, S., Scheible, M.H., Schumm, M., Hamprecht, K., Martin, D., Jahn, G., Handgretinger, R., and Lang, P. (2008). Clinical grade generation of hexon-specific T cells for adoptive T-cell transfer as a treatment of adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *J. Immunother.* 31, 199–206.

Feuchtinger, T., Opherk, K., Bethge, W.A., Topp, M.S., Schuster, F.R., Weissinger, E.M., Mohty, M., Or, R., Maschan, M., Schumm, M., et al. (2010). Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 116, 4360–4367.

Flamand, L., Gosselin, J., Stefanescu, I., Ablashi, D., and Menezes, J. (1995). Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. *Blood* 85, 1263–1271.

Freymouth. 2003. Adenoviridae. In: *Traité de virologie médicale*, edited by estem. Paris: De Boeck, p.247-266.

Fujita, Y., Leen, A.M., Sun, J., Nakazawa, Y., Yvon, E., Heslop, H.E., Brenner, M.K., and Rooney, C.M. (2008). Exploiting cytokine secretion to rapidly produce multivirus-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J. Immunother.* 31, 665–674.

Gale, R.P., Horowitz, M.M., Ash, R.C., Champlin, R.E., Goldman, J.M., Rimm, A.A., Ringdén, O., Stone, J.A., and Bortin, M.M. (1994). Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann. Intern. Med.* 120, 646–652.

Gallot, G., Vollant, S., Saïagh, S., Clémenceau, B., Vivien, R., Cerato, E., Bignon, J.-D., Ferrand, C., Jaccard, A., Vigouroux, S., et al. (2014). T-cell therapy using a bank of EBV-specific cytotoxic T cells: lessons from a phase I/II feasibility and safety study. *J. Immunother.* 37, 170–179.

Garnett, C.T., Pao, C.-I., and Gooding, L.R. (2007). Detection and quantitation of subgroup C adenovirus DNA in human tissue samples by real-time PCR. *Methods Mol. Med.* 130, 193–204.

Gattinoni, L., and Restifo, N.P. (2013). Moving T memory stem cells to the clinic. *Blood* 121, 567–568.

Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., Quigley, M.F., Almeida, J.R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., et al. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat. Med.* 17, 1290–1297.

Geddes, M., and Storek, J. (2007). Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 20, 329–348.

Gerdemann, U., Christin, A.S., Vera, J.F., Ramos, C.A., Fujita, Y., Liu, H., Dilloo, D., Heslop, H.E., Brenner, M.K., Rooney, C.M., et al. (2009). Nucleofection of DCs to generate Multivirus-specific T cells for prevention or treatment of viral infections in the immunocompromised host. *Mol. Ther.* 17, 1616–1625.

Gerdemann, U., Vera, J.F., Rooney, C.M., and Leen, A.M. (2011). Generation of multivirus-specific T cells to prevent/treat viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *J Vis Exp*.

Gerdemann, U., Keirnan, J.M., Katari, U.L., Yanagisawa, R., Christin, A.S., Huye, L.E., Perna, S.K., Ennamuri, S., Gottschalk, S., Brenner, M.K., et al. (2012). Rapidly generated multivirus-specific cytotoxic T lymphocytes for the prophylaxis and treatment of viral infections. *Mol. Ther.* 20, 1622–1632.

Gerdemann, U., Katari, U.L., Papadopoulou, A., Keirnan, J.M., Craddock, J.A., Liu, H., Martinez, C.A., Kennedy-Nasser, A., Leung, K.S., Gottschalk, S.M., et al. (2013). Safety and clinical efficacy of rapidly-generated trivirus-directed T cells as treatment for adenovirus, EBV, and CMV infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Mol. Ther.* 21, 2113–2121.

Geyeregger, R., Freimüller, C., Stevanovic, S., Stemberger, J., Mester, G., Dmytrus, J., Lion, T., Rammensee, H.-G., Fischer, G., Eiz-Vesper, B., et al. (2013). Short-term in-vitro expansion improves monitoring and allows affordable generation of virus-specific T-cells against several viruses for a broad clinical application. *PLoS ONE* 8, e59592.

Geyeregger, R., Freimüller, C., Stemberger, J., Artwohl, M., Witt, V., Lion, T., Fischer, G., Lawitschka, A., Ritter, J., Hummel, M., et al. (2014). First-in-man clinical results with good manufacturing practice (GMP)-compliant polypeptide-expanded adenovirus-specific T cells after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *J. Immunother.* 37, 245–249.

Ginsberg, H.S., and Prince, G.A. (1994). The molecular basis of adenovirus pathogenesis. *Infect Agents Dis* 3, 1–8.

Gottschalk, S., Ng, C.Y., Perez, M., Smith, C.A., Sample, C., Brenner, M.K., Heslop, H.E., and Rooney, C.M. (2001). An Epstein-Barr virus deletion mutant associated with fatal lymphoproliferative disease unresponsive to therapy with virus-specific CTLs. *Blood* 97, 835–843.

Gottschalk, S., Heslop, H.E., and Roon, C.M. (2002). Treatment of Epstein-Barr virus-associated malignancies with specific T cells. *Adv. Cancer Res.* 84, 175–201.

Green, A., Clarke, E., Hunt, L., Canterbury, A., Lankester, A., Hale, G., Waldmann, H., Goodman, S., Cornish, J.M., Marks, D.I., et al. (1999). Children with acute lymphoblastic leukemia who receive T-cell-depleted HLA mismatched marrow allografts from unrelated donors have an increased incidence of primary graft failure but a similar overall transplant outcome. *Blood* 94, 2236–2246.

Grivel, J.-C., Santoro, F., Chen, S., Fagá, G., Malnati, M.S., Ito, Y., Margolis, L., and Lusso, P. (2003). Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue ex vivo. *J. Virol.* 77, 8280–8289.

Guérin-El Khourouj, V., Dalle, J.-H., Pédrón, B., Yakouben, K., Bensoussan, D., Cordeiro, D.J., Peltier, L., Ouachée-Chardin, M., Baruchel, A., and Sterkers, G. (2011). Quantitative and qualitative CD4 T cell immune responses related to adenovirus DNAemia in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 17,

476–485.

Gustafsson, A., Levitsky, V., Zou, J.Z., Frisan, T., Dalianis, T., Ljungman, P., Ringden, O., Winiarski, J., Ernberg, I., and Masucci, M.G. (2000). Epstein-Barr virus (EBV) load in bone marrow transplant recipients at risk to develop posttransplant lymphoproliferative disease: prophylactic infusion of EBV-specific cytotoxic T cells. *Blood* 95, 807–814.

Den Haan, J.M., Sherman, N.E., Blokland, E., Huczko, E., Koning, F., Drijfhout, J.W., Skipper, J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Engelhard, V.H. (1995). Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science* 268, 1476–1480.

Hakim, F.T., Cepeda, R., Kaimei, S., Mackall, C.L., McAtee, N., Zujewski, J., Cowan, K., and Gress, R.E. (1997). Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. *Blood* 90, 3789–3798.

Hale, G.A., Heslop, H.E., Krance, R.A., Brenner, M.A., Jayawardene, D., Srivastava, D.K., and Patrick, C.C. (1999). Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 23, 277–282.

Han, S., Huang, Y., Liang, Y., Ho, Y., Wang, Y., and Chang, L.-J. (2009). Phenotype and functional evaluation of ex vivo generated antigen-specific immune effector cells with potential for therapeutic applications. *J Hematol Oncol* 2, 34.

Hanley, P.J., Cruz, C.R.Y., Savoldo, B., Leen, A.M., Stanojevic, M., Khalil, M., Decker, W., Molldrem, J.J., Liu, H., Gee, A.P., et al. (2009). Functionally active virus-specific T cells that target CMV, adenovirus, and EBV can be expanded from naive T-cell populations in cord blood and will target a range of viral epitopes. *Blood* 114, 1958–1967.

Hanley, P.J., Shaffer, D.R., Cruz, C.R.Y., Ku, S., Tzou, B., Liu, H., Demmler-Harrison, G., Heslop, H.E., Rooney, C.M., Gottschalk, S., et al. (2011). Expansion of T cells targeting multiple antigens of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and adenovirus to provide broad antiviral specificity after stem cell transplantation. *Cytotherapy* 13, 976–986.

Hanley, P.J., Lam, S., Shpall, E.J., and Bollard, C.M. (2012). Expanding cytotoxic T lymphocytes from umbilical cord blood that target cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and adenovirus. *J Vis Exp* e3627.

Haque, T., Wilkie, G.M., Taylor, C., Amlot, P.L., Murad, P., Iley, A., Dombagoda, D., Britton, K.M., Swerdlow, A.J., and Crawford, D.H. (2002). Treatment of Epstein-Barr-virus-positive post-transplantation lymphoproliferative disease with partly HLA-matched allogeneic cytotoxic T cells. *Lancet* 360, 436–442.

Haque, T., Wilkie, G.M., Jones, M.M., Higgins, C.D., Urquhart, G., Wingate, P., Burns, D., McAulay, K., Turner, M., Bellamy, C., et al. (2007). Allogeneic cytotoxic T-cell

therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* 110, 1123–1131.

Harris, A.C., Ferrara, J.L.M., and Levine, J.E. (2013). Advances in predicting acute GVHD. *Br. J. Haematol.* 160, 288–302.

Harrach, B., Benko, M., Both, G., et al. (2011). Adenoviridae—Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. In *Virus Taxonomy*. A. King, M. Adams, E. Carstens, and E. Lefkowitz, eds. (Elsevier, Oxford), pp 125–141.

Haynes, B.F., Markert, M.L., Sempowski, G.D., Patel, D.D., and Hale, L.P. (2000). The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 529–560.

Heemskerk, B., Veltrop-Duits, L.A., van Vreeswijk, T., ten Dam, M.M., Heidt, S., Toes, R.E.M., van Tol, M.J.D., and Schilham, M.W. (2003). Extensive cross-reactivity of CD4+ adenovirus-specific T cells: implications for immunotherapy and gene therapy. *J. Virol.* 77, 6562–6566.

Heemskerk, B., Lankester, A.C., van Vreeswijk, T., Beersma, M.F.C., Claas, E.C.J., Veltrop-Duits, L.A., Kroes, A.C.M., Vossen, J.M.J.J., Schilham, M.W., and van Tol, M.J.D. (2005). Immune reconstitution and clearance of human adenovirus viremia in pediatric stem-cell recipients. *J. Infect. Dis.* 191, 520–530.

Hendrickx, R., Stichling, N., Koelen, J., Kuryk, L., Lipiec, A., and Greber, U.F. (2014). Innate immunity to adenovirus. *Hum. Gene Ther.* 25, 265–284.

Henle, W., and Henle, G. (1970). Evidence for a relation of Epstein-Barr virus to Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Bibl Haematol* 706–713.

Henson, S.M., Riddell, N.E., and Akbar, A.N. (2012). Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 476–481.

Heslop, H.E., Brenner, M.K., and Rooney, C.M. (1994). Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 331, 679–680.

Heslop, H.E., Slobod, K.S., Pule, M.A., Hale, G.A., Rousseau, A., Smith, C.A., Bollard, C.M., Liu, H., Wu, M.-F., Rochester, R.J., et al. (2010). Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* 115, 925–935.

Hinrichs, C.S., Borman, Z.A., Cassard, L., Gattinoni, L., Spolski, R., Yu, Z., Sanchez-Perez, L., Muranski, P., Kern, S.J., Logun, C., et al. (2009). Adoptively transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8+ T cells mediate superior antitumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 17469–17474.

Hinrichs, C.S., Borman, Z.A., Gattinoni, L., Yu, Z., Burns, W.R., Huang, J., Klebanoff, C.A., Johnson, L.A., Kerkar, S.P., Yang, S., et al. (2011). Human effector CD8+ T cells

derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood* 117, 808–814.

Hislop, A.D., Taylor, G.S., Sauce, D., and Rickinson, A.B. (2007). Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 587–617.

Ho, V.T., and Soiffer, R.J. (2001). The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 98, 3192–3204.

Hoffman, J.A., Shah, A.J., Ross, L.A., and Kapoor, N. (2001). Adenoviral infections and a prospective trial of cidofovir in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 7, 388–394.

Hong, S.S., Habib, N.A., Franqueville, L., Jensen, S., and Boulanger, P.A. (2003). Identification of adenovirus (ad) penton base neutralizing epitopes by use of sera from patients who had received conditionally replicative ad (add1520) for treatment of liver tumors. *J. Virol.* 77, 10366–10375.

Horn, B., Bao, L., Dunham, K., Stamer, M., Adler, S., Cowan, M., and Lucas, K. (2009). Infusion of cytomegalovirus specific cytotoxic T lymphocytes from a sero-negative donor can facilitate resolution of infection and immune reconstitution. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28, 65–67.

Howard, D.S., Phillips II, G.L., Reece, D.E., Munn, R.K., Henslee-Downey, J., Pittard, M., Barker, M., and Pomeroy, C. (1999a). Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 29, 1494–1501.

Howard, D.S., Phillips II, G.L., Reece, D.E., Munn, R.K., Henslee-Downey, J., Pittard, M., Barker, M., and Pomeroy, C. (1999b). Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 29, 1494–1501.

Hromas, R., Cornetta, K., Srour, E., Blanke, C., and Broun, E.R. (1994). Donor leukocyte infusion as therapy of life-threatening adenoviral infections after T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood* 84, 1689–1690.

Di Ianni, M., Falzetti, F., Carotti, A., Terenzi, A., Del Papa, B., Perruccio, K., Ruggeri, L., Sportoletti, P., Rosati, E., Marconi, P., et al. (2011). Immunoselection and clinical use of T regulatory cells in HLA-haploidentical stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 24, 459–466.

Icheva, V., Kayser, S., Wolff, D., Tuve, S., Kyzirakos, C., Bethge, W., Greil, J., Albert, M.H., Schwinger, W., Nathrath, M., et al. (2013). Adoptive transfer of epstein-barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific t cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J. Clin. Oncol.* 31, 39–48.

Imashuku, S., Goto, T., Matsumura, T., Naya, M., Yamori, M., Hojo, M., Hibi, S., and Todo, S. (1997). Unsuccessful CTL transfusion in a case of post-BMT Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorder (EBV-LPD). *Bone Marrow Transplant.* *20*, 337–340.

Inoue, R., Matsuoka, T., Kondo, N., Nishimura, Y., and Matsushita, S. (1997). Identification of *Dermatophagoides farinae*-2-derived peptides and class II HLA molecules recognized by T cells from atopic individuals. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *114*, 354–360.

Jones, M.S., Harrach, B., Ganac, R.D., Gozum, M.M.A., Dela Cruz, W.P., Riedel, B., Pan, C., Delwart, E.L., and Schnurr, D.P. (2007). New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J. Virol.* *81*, 5978–5984.

Kanda, J., Chiou, L.-W., Szabolcs, P., Sempowski, G.D., Rizzieri, D.A., Long, G.D., Sullivan, K.M., Gasparetto, C., Chute, J.P., Morris, A., et al. (2012). Immune recovery in adult patients after myeloablative dual umbilical cord blood, matched sibling, and matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *18*, 1664–1676.e1.

Kanda, J., Ichinohe, T., Kato, S., Uchida, N., Terakura, S., Fukuda, T., Hidaka, M., Ueda, Y., Kondo, T., Taniguchi, S., et al. (2013). Unrelated cord blood transplantation vs related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction. *Leukemia* *27*, 286–294.

Kawakami, M., Nakata, J., Ohguro, N., Yoshihara, S., Inoue, T., Tatekawa, T., Ikegame, K., Oka, Y., Kawase, I., and Ogawa, H. (2005). A case of immune recovery vitritis induced by donor leukocyte infusion for the treatment of cytomegalovirus retinitis. *Eur. J. Haematol.* *75*, 352–354.

Kebriaei, P., Isola, L., Bahceci, E., Holland, K., Rowley, S., McGuirk, J., Devetten, M., Jansen, J., Herzig, R., Schuster, M., et al. (2009). Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *15*, 804–811.

Kedl, R.M., Rees, W.A., Hildeman, D.A., Schaefer, B., Mitchell, T., Kappler, J., and Marrack, P. (2000). T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* *192*, 1105–1113.

Kennedy, G., and Sugden, B. (2003). EBNA-1, a bifunctional transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 6901–6908.

Khanna, N., Stuehler, C., Conrad, B., Lurati, S., Krappmann, S., Einsele, H., Berges, C., and Topp, M.S. (2011). Generation of a multipathogen-specific T-cell product for adoptive immunotherapy based on activation-dependent expression of CD154. *Blood* *118*, 1121–1131.

Khanna, R., Burrows, S.R., Kurilla, M.G., Jacob, C.A., Misko, I.S., Sculley, T.B., Kieff,

E., and Moss, D.J. (1992). Localization of Epstein-Barr virus cytotoxic T cell epitopes using recombinant vaccinia: implications for vaccine development. *J. Exp. Med.* *176*, 169–176.

Khanna, R., Moss, D.J., and Burrows, S.R. (1999). Vaccine strategies against Epstein-Barr virus-associated diseases: lessons from studies on cytotoxic T-cell-mediated immune regulation. *Immunol. Rev.* *170*, 49–64.

Kim, N., Im, K.-I., Lim, J.-Y., Jeon, E.-J., Nam, Y.-S., Kim, E.-J., and Cho, S.-G. (2013). Mesenchymal stem cells for the treatment and prevention of graft-versus-host disease: experiments and practice. *Ann. Hematol.* *92*, 1295–1308.

Klebanoff, C.A., Gattinoni, L., and Restifo, N.P. (2012). Sorting through subsets: which T-cell populations mediate highly effective adoptive immunotherapy? *J. Immunother.* *35*, 651–660.

Koh, L.-P., Rizzieri, D.A., and Chao, N.J. (2007). Allogeneic hematopoietic stem cell transplant using mismatched/haploidentical donors. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *13*, 1249–1267.

Koreth, J., and Antin, J.H. (2008). Current and future approaches for control of graft-versus-host disease. *Expert Rev Hematol* *1*, 111.

Koyama, M., Hashimoto, D., Aoyama, K., Matsuoka, K., Karube, K., Niino, H., Harada, M., Tanimoto, M., Akashi, K., and Teshima, T. (2009). Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. *Blood* *113*, 2088–2095.

Kuehnle, I., Huls, M.H., Liu, Z., Semmelmann, M., Krance, R.A., Brenner, M.K., Rooney, C.M., and Heslop, H.E. (2000). CD20 monoclonal antibody (rituximab) for therapy of Epstein-Barr virus lymphoma after hemopoietic stem-cell transplantation. *Blood* *95*, 1502–1505.

Kuzmina, L.A., Petinati, N.A., Parovichnikova, E.N., Lubimova, L.S., Griбанова, E.O., Gaponova, T.V., Shipounova, I.N., Zhironkina, O.A., Bigildeev, A.E., Svinareva, D.A., et al. (2012). Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for the Prophylaxis of Acute Graft-versus-Host Disease-A Phase II Study. *Stem Cells Int* *2012*, 968213.

Landgren, O., Gilbert, E.S., Rizzo, J.D., Socié, G., Banks, P.M., Sobocinski, K.A., Horowitz, M.M., Jaffe, E.S., Kingma, D.W., Travis, L.B., et al. (2009). Risk factors for lymphoproliferative disorders after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* *113*, 4992–5001.

Lazarus, H.M., Koc, O.N., Devine, S.M., Curtin, P., Maziarz, R.T., Holland, H.K., Shpall, E.J., McCarthy, P., Atkinson, K., Cooper, B.W., et al. (2005). Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *11*, 389–398.

Leen, A.M., Sili, U., Vanin, E.F., Jewell, A.M., Xie, W., Vignali, D., Piedra, P.A., Brenner, M.K., and Rooney, C.M. (2004). Conserved CTL epitopes on the adenovirus hexon protein expand subgroup cross-reactive and subgroup-specific CD8⁺ T cells. *Blood* 104, 2432–2440.

Leen, A.M., Myers, G.D., Sili, U., Huls, M.H., Weiss, H., Leung, K.S., Carrum, G., Krance, R.A., Chang, C.-C., Molldrem, J.J., et al. (2006). Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat. Med.* 12, 1160–1166.

Leen, A.M., Christin, A., Myers, G.D., Liu, H., Cruz, C.R., Hanley, P.J., Kennedy-Nasser, A.A., Leung, K.S., Gee, A.P., Krance, R.A., et al. (2009). Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 114, 4283–4292.

Leen, A.M., Tripic, T., and Rooney, C.M. (2010). Challenges of T cell therapies for virus-associated diseases after hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Biol Ther* 10, 337–351.

Leen, A.M., Bollard, C.M., Mendizabal, A.M., Shpall, E.J., Szabolcs, P., Antin, J.H., Kapoor, N., Pai, S.-Y., Rowley, S.D., Kebriaei, P., et al. (2013). Multicenter study of banked third-party virus-specific T cells to treat severe viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 121, 5113–5123.

Legrand, F., Berrebi, D., Houhou, N., Freymuth, F., Faye, A., Duval, M., Mougnot, J.F., Peuchmaur, M., and Vilmer, E. (2001). Early diagnosis of adenovirus infection and treatment with cidofovir after bone marrow transplantation in children. *Bone Marrow Transplant* 27, 621–626.

Levine, J.E., Blazar, B.R., DeFor, T., Ferrara, J.L.M., and Weisdorf, D.J. (2008). Long-term follow-up of a phase I/II randomized, placebo-controlled trial of palifermin to prevent graft-versus-host disease (GVHD) after related donor allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT). *Biol. Blood Marrow Transplant* 14, 1017–1021.

Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G., and Masucci, M.G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375, 685–688.

Li, N., Thompson, S., Jiang, H., Lieberman, P.M., and Luo, C. (2010). Development of drugs for Epstein-Barr virus using high-throughput *in silico* virtual screening. *Expert Opinion on Drug Discovery* 5, 1189–1203.

Lindemans, C.A., Leen, A.M., and Boelens, J.J. (2010). How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood* 116, 5476–5485.

Long, H.M., Leese, A.M., Chagoury, O.L., Connerty, S.R., Quarcoopome, J., Quinn, L.L., Shannon-Lowe, C., and Rickinson, A.B. (2011). Cytotoxic CD4⁺ T cell responses to

EBV contrast with CD8 responses in breadth of lytic cycle antigen choice and in lytic cycle recognition. *J. Immunol.* *187*, 92–101.

Lotz, M., Tsoukas, C.D., Fong, S., Carson, D.A., and Vaughan, J.H. (1985). Regulation of Epstein-Barr virus infection by recombinant interferons. Selected sensitivity to interferon-gamma. *Eur. J. Immunol.* *15*, 520–525.

Lucas, K.G., Small, T.N., Heller, G., Dupont, B., and O'Reilly, R.J. (1996). The development of cellular immunity to Epstein-Barr virus after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* *87*, 2594–2603.

Lucas, K.G., Sun, Q., Burton, R.L., Tilden, A., Vaughan, W.P., Carabasi, M., Salzman, D., and Ship, A. (2000). A phase I-II trial to examine the toxicity of CMV- and EBV-specific cytotoxic T lymphocytes when used for prophylaxis against EBV and CMV disease in recipients of CD34-selected/T cell-depleted stem cell transplants. *Hum. Gene Ther.* *11*, 1453–1463.

Lucchini, G., Introna, M., Dander, E., Rovelli, A., Balduzzi, A., Bonanomi, S., Salvadè, A., Capelli, C., Belotti, D., Gaipa, G., et al. (2010). Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *16*, 1293–1301.

Lugli, E., Gattinoni, L., Roberto, A., Mavilio, D., Price, D.A., Restifo, N.P., and Roederer, M. (2013). Identification, isolation and in vitro expansion of human and nonhuman primate T stem cell memory cells. *Nat Protoc* *8*, 33–42.

Lugthart, G., Albon, S.J., Ricciardelli, I., Kester, M.G.D., Meij, P., Lankester, A.C., and Amrolia, P.J. (2012). Simultaneous generation of multivirus-specific and regulatory T cells for adoptive immunotherapy. *J. Immunother.* *35*, 42–53.

Mackinnon, S., Thomson, K., Verfuërth, S., Peggs, K., and Lowdell, M. (2008). Adoptive cellular therapy for cytomegalovirus infection following allogeneic stem cell transplantation using virus-specific T cells. *Blood Cells Mol. Dis.* *40*, 63–67.

MacSween, K.F., and Crawford, D.H. (2003). Epstein-Barr virus-recent advances. *Lancet Infect Dis* *3*, 131–140.

Maecker, H.T., Dunn, H.S., Suni, M.A., Khatamzas, E., Pitcher, C.J., Bunde, T., Persaud, N., Trigona, W., Fu, T.M., Sinclair, E., et al. (2001). Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *J. Immunol. Methods* *255*, 27–40.

Mahmud, S.A., Manlove, L.S., and Farrar, M.A. (2013). Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function. *JAKSTAT* *2*, e23154.

Mahnke, Y.D., Brodie, T.M., Sallusto, F., Roederer, M., and Lugli, E. (2013). The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.* *43*, 2797–2809.

Maraninchi, D., Gluckman, E., Blaise, D., Guyotat, D., Rio, B., Pico, J.L., Leblond, V., Michallet, M., Dreyfus, F., and Ifrah, N. (1987). Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet* 2, 175–178.

Marie-Cardine, A., Divay, F., Dutot, I., Green, A., Perdrix, A., Boyer, O., Contentin, N., Tilly, H., Tron, F., Vannier, J.-P., et al. (2008). Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Immunol.* 127, 14–25.

Markey, K.A., Banovic, T., Kuns, R.D., Olver, S.D., Don, A.L.J., Raffelt, N.C., Wilson, Y.A., Raggatt, L.J., Pettit, A.R., Bromberg, J.S., et al. (2009). Conventional dendritic cells are the critical donor APC presenting alloantigen after experimental bone marrow transplantation. *Blood* 113, 5644–5649.

Marshall, N.A., Howe, J.G., Formica, R., Krause, D., Wagner, J.E., Berliner, N., Crouch, J., Pilip, I., Cooper, D., Blazar, B.R., et al. (2000). Rapid reconstitution of Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 96, 2814–2821.

Martin, P.J., Rizzo, J.D., Wingard, J.R., Ballen, K., Curtin, P.T., Cutler, C., Litzow, M.R., Nieto, Y., Savani, B.N., Schriber, J.R., et al. (2012). First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 18, 1150–1163.

Masjosthusmann, K., Ehlert, K., Eing, B.R., Roth, J., Koehler, G., Juergens, H., Fruehwald, M., and Groll, A.H. (2009). Delay in B-lymphocyte recovery and function following rituximab for EBV-associated lymphoproliferative disease early post-allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 43, 679–684.

Mastaglio, S., Stanghellini, M.T.L., Bordignon, C., Bondanza, A., Ciceri, F., and Bonini, C. (2010). Progress and prospects: graft-versus-host disease. *Gene Ther.* 17, 1309–1317.

Mathé, G., Amiel, J.L., Schwarzenberg, L., Cattani, A., and Schneider, M. (1965). Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res.* 25, 1525–1531.

Matthes-Martin, S., Feuchtinger, T., Shaw, P.J., Engelhard, D., Hirsch, H.H., Cordonnier, C., Ljungman, P., and Fourth European Conference on Infections in Leukemia (2012). European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transpl Infect Dis* 14, 555–563.

Mautner, J., and Bornkamm, G.W. (2012). The role of virus-specific CD4+ T cells in the control of Epstein-Barr virus infection. *Eur. J. Cell Biol.* 91, 31–35.

McClune, B.L., and Weisdorf, D.J. (2010). Reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for older adults: is it the standard of care? *Curr. Opin. Hematol.* 17, 133–138.

Mehta, J., Singhal, S., Gee, A.P., Chiang, K.-Y., Godder, K., Rhee, F. van, DeRienzo, S., O'Neal, W., Lamb, L., and Henslee-Downey, P.J. (2004). Bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched family donors for acute leukemia: single-center experience of 201 patients. *Bone Marrow Transplant* 33, 389–396.

Meij, P., van Esser, J.W.J., Niesters, H.G.M., van Baarle, D., Miedema, F., Blake, N., Rickinson, A.B., Leiner, I., Pamer, E., Lowenberg, B., et al. (2003). Impaired recovery of Epstein-Barr virus (EBV)--specific CD8+ T lymphocytes after partially T-depleted allogeneic stem cell transplantation may identify patients at very high risk for progressive EBV reactivation and lymphoproliferative disease. *Blood* 101, 4290–4297.

Melenhorst, J.J., Leen, A.M., Bollard, C.M., Quigley, M.F., Price, D.A., Rooney, C.M., Brenner, M.K., Barrett, A.J., and Heslop, H.E. (2010). Allogeneic virus-specific T cells with HLA alloreactivity do not produce GVHD in human subjects. *Blood* 116, 4700–4702.

Michallet, M., Dhedin, N., and Michallet, A.S. (2001). [Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for hematological malignancies]. *Bull Cancer* 88, 908–926.

Micklethwaite, K., Hansen, A., Foster, A., Snape, E., Antonenas, V., Sartor, M., Shaw, P., Bradstock, K., and Gottlieb, D. (2007). Ex vivo expansion and prophylactic infusion of CMV-pp65 peptide-specific cytotoxic T-lymphocytes following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13, 707–714.

Micklethwaite, K.P., Clancy, L., Sandher, U., Hansen, A.M., Blyth, E., Antonenas, V., Sartor, M.M., Bradstock, K.F., and Gottlieb, D.J. (2008). Prophylactic infusion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes stimulated with Ad5f35pp65 gene-modified dendritic cells after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood* 112, 3974–3981.

Miller, W., Flynn, P., McCullough, J., Balfour, H.H., Goldman, A., Haake, R., McGlave, P., Ramsay, N., and Kersey, J. (1986). Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation: an association with acute graft-v-host disease. *Blood* 67, 1162–1167.

Molina, L., Chabannon, C., Viret, F., Moine, A., Leger, J., Nicolini, F., Hollard, D., and Sotto, J.J. (1995). Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized allogeneic peripheral blood stem cells for rescue graft failure after allogeneic bone marrow transplantation in two patients with acute myeloblastic leukemia in first complete remission. *Blood* 85, 1678–1679.

Molinier-Frenkel, V., Gahery-Segard, H., Mehtali, M., Le Boulair, C., Ribault, S., Boulanger, P., Tursz, T., Guillet, J.G., and Farace, F. (2000). Immune response to recombinant adenovirus in humans: capsid components from viral input are targets for vector-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 74, 7678–7682.

Molinier-Frenkel, V., Lengagne, R., Gaden, F., Hong, S.-S., Choppin, J., Gahery-Ségard, H., Boulanger, P., and Guillet, J.-G. (2002). Adenovirus hexon protein is a potent adjuvant for activation of a cellular immune response. *J. Virol.* 76, 127–135.

Moosmann, A., Khan, N., Cobbold, M., Zentz, C., Delecluse, H.-J., Hollweck, G., Hislop, A.D., Blake, N.W., Croom-Carter, D., Wollenberg, B., et al. (2002). B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells. *Blood* 100, 1755–1764.

Moosmann, A., Bigalke, I., Tischer, J., Schirrmann, L., Kasten, J., Tippmer, S., Leeping, M., Prevalsek, D., Jaeger, G., Ledderose, G., et al. (2010). Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood* 115, 2960–2970.

Morfin, F., Dupuis-Girod, S., Mundweiler, S., Falcon, D., Carrington, D., Sedlacek, P., Bierings, M., Cetkovsky, P., Kroes, A.C.M., van Tol, M.J.D., et al. (2005). In vitro susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent. *Antivir. Ther. (Lond.)* 10, 225–229.

Müller, I., Kordowich, S., Holzwarth, C., Isensee, G., Lang, P., Neunhoeffler, F., Dominici, M., Greil, J., and Handgretinger, R. (2008). Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol. Dis.* 40, 25–32.

Murray, R.J., Kurilla, M.G., Brooks, J.M., Thomas, W.A., Rowe, M., Kieff, E., and Rickinson, A.B. (1992). Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies. *J. Exp. Med.* 176, 157–168.

Myers, G.D., Bollard, C.M., Wu, M.-F., Weiss, H., Rooney, C.M., Heslop, H.E., and Leen, A.M. (2007). Reconstitution of adenovirus-specific cell-mediated immunity in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 39, 677–686.

Nadal, E., Fowler, A., Kanfer, E., Apperley, J., Goldman, J., and Dazzi, F. (2004). Adjuvant interleukin-2 therapy for patients refractory to donor lymphocyte infusions. *Exp. Hematol.* 32, 218–223.

Nagafuji, K., Aoki, K., Henzan, H., Kato, K., Miyamoto, T., Eto, T., Nagatoshi, Y., Ohba, T., Obama, K., Gondo, H., et al. (2004). Cidofovir for treating adenoviral hemorrhagic cystitis in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 34, 909–914.

Di Nardo, M., Li Pira, G., Amodeo, A., Cecchetti, C., Giorda, E., Ceccarelli, S., Brescia, L.P., Pirozzi, N., Rutella, S., Locatelli, F., et al. (2014). Adoptive immunotherapy with antigen-specific T cells during extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) for adenovirus-related respiratory failure in a child given haploidentical stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 61, 376–379.

Nazir, S.A., and Metcalf, J.P. (2005). Innate immune response to adenovirus. *J. Investig. Med.* 53, 292–304.

Ning, H., Yang, F., Jiang, M., Hu, L., Feng, K., Zhang, J., Yu, Z., Li, B., Xu, C., Li, Y.,

et al. (2008). The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia* 22, 593–599.

Öhrmalm, L., Lindblom, A., Omar, H., Norbeck, O., Gustafson, I., Lewensohn-Fuchs, I., Johansson, J.-E., Brune, M., Ljungman, P., and Broliden, K. (2011). Evaluation of a surveillance strategy for early detection of adenovirus by PCR of peripheral blood in hematopoietic SCT recipients: incidence and outcome. *Bone Marrow Transplant.* 46, 267–272.

Olive, M., Eisenlohr, L., Flomenberg, N., Hsu, S., and Flomenberg, P. (2002). The adenovirus capsid protein hexon contains a highly conserved human CD4⁺ T-cell epitope. *Hum. Gene Ther.* 13, 1167–1178.

Orazi, A., Hromas, R.A., Neiman, R.S., Greiner, T.C., Lee, C.H., Rubin, L., Haskins, S., Heerema, N.A., Gharpure, V., Abonour, R., et al. (1997). Posttransplantation lymphoproliferative disorders in bone marrow transplant recipients are aggressive diseases with a high incidence of adverse histologic and immunobiologic features. *Am. J. Clin. Pathol.* 107, 419–429.

O'Reilly, R.J., Small, T.N., Papadopoulos, E., Lucas, K., Lacerda, J., and Koulova, L. (1997). Biology and adoptive cell therapy of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in recipients of marrow allografts. *Immunol. Rev.* 157, 195–216.

O'Reilly, R.J., Small, T.N., Papadopoulos, E., Lucas, K., Lacerda, J., and Koulova, L. (1998). Adoptive immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders complicating marrow allografts. *Springer Semin. Immunopathol.* 20, 455–491.

Palaniyandi, S., Radhakrishnan, S.V., Karlsson, F.J., Stokes, K.Y., Kittan, N., Huber, E., and Hildebrandt, G.C. (2013). Murine cytomegalovirus immediate-early 1 gene expression correlates with increased GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation in recipients reactivating from latent infection. *PLoS ONE* 8, e61841.

Di Paolo, N.C., and Shayakhmetov, D.M. (2014). The analysis of innate immune response to adenovirus using antibody arrays. *Methods Mol. Biol.* 1089, 133–141.

Papadopoulos, E.B., Ladanyi, M., Emanuel, D., Mackinnon, S., Boulad, F., Carabasi, M.H., Castro-Malaspina, H., Childs, B.H., Gillio, A.P., and Small, T.N. (1994). Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* 330, 1185–1191.

Papadopoulou, A., Gerdemann, U., Katari, U.L., Tzannou, I., Liu, H., Martinez, C., Leung, K., Carrum, G., Gee, A.P., Vera, J.F., et al. (2014). Activity of broad-spectrum T cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. *Sci Transl Med* 6, 242ra83.

Paya, C.V., Fung, J.J., Nalesnik, M.A., Kieff, E., Green, M., Gores, G., Habermann, T.M.,

Wiesner, P.H., Swinnen, J.L., Woodle, E.S., et al. (1999). Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD Task Force and The Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting. *Transplantation* 68, 1517–1525.

Peggs, K., Verfuether, S., and Mackinnon, S. (2001). Induction of cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses using dendritic cells pulsed with CMV antigen: a novel culture system free of live CMV virions. *Blood* 97, 994–1000.

Peggs, K.S., Verfuether, S., Pizzey, A., Khan, N., Guiver, M., Moss, P.A., and Mackinnon, S. (2003). Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* 362, 1375–1377.

Peggs, K.S., Thomson, K., Samuel, E., Dyer, G., Armoogum, J., Chakraverty, R., Pang, K., Mackinnon, S., and Lowdell, M.W. (2011). Directly selected cytomegalovirus-reactive donor T cells confer rapid and safe systemic reconstitution of virus-specific immunity following stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 52, 49–57.

Perales, M.-A., Goldberg, J.D., Yuan, J., Koehne, G., Lechner, L., Papadopoulos, E.B., Young, J.W., Jakubowski, A.A., Zaidi, B., Gallardo, H., et al. (2012). Recombinant human interleukin-7 (CYT107) promotes T-cell recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 120, 4882–4891.

Perillo, A., Pierelli, L., Battaglia, A., Salerno, M.G., Rutella, S., Cortesi, E., Fattorossi, A., De Rosa, L., Ferraù, F., Lalle, M., et al. (2002). Administration of low-dose interleukin-2 plus G-CSF/EPO early after autologous PBSC transplantation: effects on immune recovery and NK activity in a prospective study in women with breast and ovarian cancer. *Bone Marrow Transplant.* 30, 571–578.

Polack, A., Hörtnagel, K., Pajic, A., Christoph, B., Baier, B., Falk, M., Mautner, J., Geltinger, C., Bornkamm, G.W., and Kempkes, B. (1996). c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 10411–10416.

Prasad, V.K., Lucas, K.G., Kleiner, G.I., Talano, J.A.M., Jacobsohn, D., Broadwater, G., Monroy, R., and Kurtzberg, J. (2011). Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (ProchymalTM) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 17, 534–541.

Pudney, V.A., Leese, A.M., Rickinson, A.B., and Hislop, A.D. (2005). CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J. Exp. Med.* 201, 349–360.

Qasim, W., Gilmour, K., Zhan, H., Derniame, S., McNicol, A.M., Ip, W., Hiwarkar, P., Veys, P., and Gaspar, H.B. (2013). Interferon- γ capture T cell therapy for persistent Adenoviraemia following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 161, 449–452.

Raphaël, M., Baran-Marszak, F., and Besson, C. (2005). Syndromes mononucléosiques et pathologies hématologiques liés au virus d'Epstein-Barr. *EMC - Hématologie* 2, 207–219.

Rauser, G., Einsele, H., Sinzger, C., Wernet, D., Kuntz, G., Assenmacher, M., Campbell, J.D.M., and Topp, M.S. (2004). Rapid generation of combined CMV-specific CD4+ and CD8+ T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood* 103, 3565–3572.

Regn, S., Raffegerst, S., Chen, X., Schendel, D., Kolb, H.J., and Roskrow, M. (2001). Ex vivo generation of cytotoxic T lymphocytes specific for one or two distinct viruses for the prophylaxis of patients receiving an allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant*. 27, 53–64.

Restifo, N.P., and Gattinoni, L. (2013). Lineage relationship of effector and memory T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 556–563.

Ricciardelli, I., Brewin, J., Lugthart, G., Albon, S.J., Pule, M., and Amrolia, P.J. (2013). Rapid generation of EBV-specific cytotoxic T lymphocytes resistant to calcineurin inhibitors for adoptive immunotherapy. *Am. J. Transplant.* 13, 3244–3252.

Rickinson, A.B. (2014). Co-infections, inflammation and oncogenesis: future directions for EBV research. *Semin. Cancer Biol.* 26, 99–115.

Rickinson A.B. and E. Kieff (2003). Epstein-Barr virus. J.C. Nicolas et M.C. Meyohas. *Virus Epstein-Barr. Traité de virologie médicale.* Edition ESTEM: 213-236.

Rm, D., and Mr, B. (2003). Graft-versus-host disease: emerging concepts in prevention and therapy. *Curr Hematol Rep* 2, 287–294.

Roddie, C., and Peggs, K.S. (2011). Donor lymphocyte infusion following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Biol Ther* 11, 473–487.

Roelvink, P.W., Lizonova, A., Lee, J.G., Li, Y., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Brough, D.E., Kovesdi, I., and Wickham, T.J. (1998). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* 72, 7909–7915.

Rooney, C.M., Loftin, S.K., Holladay, M.S., Brenner, M.K., Krance, R.A., and Heslop, H.E. (1995). Early identification of Epstein-Barr virus-associated post-transplantation lymphoproliferative disease. *Br. J. Haematol.* 89, 98–103.

Rooney, C.M., Smith, C.A., Ng, C.Y., Loftin, S.K., Sixbey, J.W., Gan, Y., Srivastava, D.K., Bowman, L.C., Krance, R.A., Brenner, M.K., et al. (1998a). Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92, 1549–1555.

Rooney, C.M., Smith, C.A., Ng, C.Y., Loftin, S.K., Sixbey, J.W., Gan, Y., Srivastava,

D.K., Bowman, L.C., Krance, R.A., Brenner, M.K., et al. (1998b). Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92, 1549–1555.

Rowe, D.T., Hall, L., Joab, I., and Laux, G. (1990). Identification of the Epstein-Barr virus terminal protein gene products in latently infected lymphocytes. *J. Virol.* 64, 2866–2875.

Sackstein, R. (2006). A revision of Billingham's tenets: the central role of lymphocyte migration in acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 12, 2–8.

Savoldo, B., Goss, J., Liu, Z., Huls, M.H., Doster, S., Gee, A.P., Brenner, M.K., Heslop, H.E., and Rooney, C.M. (2001). Generation of autologous Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 72, 1078–1086.

Schmitt, A., Tonn, T., Busch, D.H., Grigoleit, G.U., Einsele, H., Odendahl, M., Germeroth, L., Ringhoffer, M., Ringhoffer, S., Wiesneth, M., et al. (2011). Adoptive transfer and selective reconstitution of streptamer-selected cytomegalovirus-specific CD8⁺ T cells leads to virus clearance in patients after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transfusion* 51, 591–599.

Seggewiss, R., and Einsele, H. (2010a). Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* 115, 3861–3868.

Seggewiss, R., and Einsele, H. (2010b). Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* 115, 3861–3868.

Sester, M., Sester, U., Alarcon Salvador, S., Heine, G., Lipfert, S., Girndt, M., Gärtner, B., and Köhler, H. (2002). Age-related decrease in adenovirus-specific T cell responses. *J. Infect. Dis.* 185, 1379–1387.

Shlomchik, W.D., Couzens, M.S., Tang, C.B., McNiff, J., Robert, M.E., Liu, J., Shlomchik, M.J., and Emerson, S.G. (1999). Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285, 412–415.

Sili, U., Leen, A.M., Vera, J.F., Gee, A.P., Huls, H., Heslop, H.E., Bollard, C.M., and Rooney, C.M. (2012). Production of good manufacturing practice-grade cytotoxic T lymphocytes specific for Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and adenovirus to prevent or treat viral infections post-allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Cytotherapy* 14, 7–11.

Small, T.N., Keever, C.A., Weiner-Fedus, S., Heller, G., O'Reilly, R.J., and Flomenberg, N. (1990). B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood* 76, 1647–1656.

Smith, C.A., Woodruff, L.S., Kitchingman, G.R., and Rooney, C.M. (1996). Adenovirus-pulsed dendritic cells stimulate human virus-specific T-cell responses in vitro. *J. Virol.* *70*, 6733–6740.

Smith, J.G., Cassany, A., Gerace, L., Ralston, R., and Nemerow, G.R. (2008). Neutralizing antibody blocks adenovirus infection by arresting microtubule-dependent cytoplasmic transport. *J. Virol.* *82*, 6492–6500.

Solomon, S.R., Mielke, S., Savani, B.N., Montero, A., Wisch, L., Childs, R., Hensel, N., Schindler, J., Ghetie, V., Leitman, S.F., et al. (2005). Selective depletion of alloreactive donor lymphocytes: a novel method to reduce the severity of graft-versus-host disease in older patients undergoing matched sibling donor stem cell transplantation. *Blood* *106*, 1123–1129.

Sportès, C., Hakim, F.T., Memon, S.A., Zhang, H., Chua, K.S., Brown, M.R., Fleisher, T.A., Krumlauf, M.C., Babb, R.R., Chow, C.K., et al. (2008). Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naïve T cell subsets. *J. Exp. Med.* *205*, 1701–1714.

Stemberger, C., Neuenhahn, M., Gebhardt, F.E., Schiemann, M., Buchholz, V.R., and Busch, D.H. (2009). Stem cell-like plasticity of naïve and distinct memory CD8⁺ T cell subsets. *Semin. Immunol.* *21*, 62–68.

Steven, null (1997). Epstein-Barr virus latent infection in vivo. *Rev. Med. Virol.* *7*, 97–106.

Steven, N.M., Leese, A.M., Annels, N.E., Lee, S.P., and Rickinson, A.B. (1996). Epitope focusing in the primary cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus and its relationship to T cell memory. *J. Exp. Med.* *184*, 1801–1813.

Stevens, S.J., Pronk, I., and Middeldorp, J.M. (2001). Toward standardization of Epstein-Barr virus DNA load monitoring: unfractionated whole blood as preferred clinical specimen. *J. Clin. Microbiol.* *39*, 1211–1216.

Storek, J., Witherspoon, R.P., and Storb, R. (1997). Reconstitution of membrane IgD- (mIgD-) B cells after marrow transplantation lags behind the reconstitution of mIgD⁺ B cells. *Blood* *89*, 350–351.

Storek, J., Geddes, M., Khan, F., Huard, B., Helg, C., Chalandon, Y., Passweg, J., and Roosnek, E. (2008). Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin Immunopathol* *30*, 425–437.

Sun, Q., Pollok, K.E., Burton, R.L., Dai, L.J., Britt, W., Emanuel, D.J., and Lucas, K.G. (1999). Simultaneous ex vivo expansion of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes using B-lymphoblastoid cell lines expressing cytomegalovirus pp65. *Blood* *94*, 3242–3250.

Takemoto, Y., Takatsuka, H., Wada, H., Mori, A., Saheki, K., Okada, M., Tamura, S.,

Fujimori, Y., Okamoto, T., Kakishita, E., et al. (2000). Evaluation of CMV/human herpes virus-6 positivity in bronchoalveolar lavage fluids as early detection of acute GVHD following BMT: evidence of a significant relationship. *Bone Marrow Transplant.* 26, 77–81.

Tamaki, H., Beaulieu, B.L., Somasundaran, M., and Sullivan, J.L. (1995). Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus in children. *J. Infect. Dis.* 172, 739–746.

Tang, J., Olive, M., Champagne, K., Flomenberg, N., Eisenlohr, L., Hsu, S., and Flomenberg, P. (2004). Adenovirus hexon T-cell epitope is recognized by most adults and is restricted by HLA DP4, the most common class II allele. *Gene Ther.* 11, 1408–1415.

Tang, J., Olive, M., Pulmanusahakul, R., Schnell, M., Flomenberg, N., Eisenlohr, L., and Flomenberg, P. (2006). Human CD8⁺ cytotoxic T cell responses to adenovirus capsid proteins. *Virology* 350, 312–322.

Taniguchi, K., Yoshihara, S., Tamaki, H., Fujimoto, T., Ikegame, K., Kaida, K., Nakata, J., Inoue, T., Kato, R., Fujioka, T., et al. (2012). Incidence and treatment strategy for disseminated adenovirus disease after haploidentical stem cell transplantation. *Ann. Hematol.* 91, 1305–1312.

Taub, D.D., and Longo, D.L. (2005). Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol. Rev.* 205, 72–93.

Tebruegge, M., and Curtis, N. (2010). Adenovirus infection in the immunocompromised host. *Adv. Exp. Med. Biol.* 659, 153–174.

Thorley-Lawson, D.A. (2001). Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 75–82.

Thorley-Lawson, D.A., Hawkins, J.B., Tracy, S.I., and Shapiro, M. (2013). The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. *Curr Opin Virol* 3, 227–232.

Tiberghien, P., Ferrand, C., Lioure, B., Milpied, N., Angonin, R., Deconinck, E., Certoux, J.M., Robinet, E., Saas, P., Petracca, B., et al. (2001). Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood* 97, 63–72.

Tomblyn, M., Chiller, T., Einsele, H., Gress, R., Sepkowitz, K., Storek, J., Wingard, J.R., Young, J. -a. H., and Boeckh, M.J. (2009). Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Preface. *Bone Marrow Transplant.* 44, 453–455.

Toubert, A., and Charron, D. (2001). Immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: gaining experience without losing naivety. *Hum. Immunol.* 62, 500–503.

Tramsen, L., Koehl, U., Tonn, T., Latgé, J.-P., Schuster, F.R., Borkhardt, A., Uharek, L., Quaritsch, R., Beck, O., Seifried, E., et al. (2009). Clinical-scale generation of human anti-Aspergillus T cells for adoptive immunotherapy. *Bone Marrow Transplant.* *43*, 13–19.

Uhlin, M., Okas, M., Gertow, J., Uzunel, M., Brismar, T.B., and Mattsson, J. (2010). A novel haplo-identical adoptive CTL therapy as a treatment for EBV-associated lymphoma after stem cell transplantation. *Cancer Immunol. Immunother.* *59*, 473–477.

Uhlin, M., Gertow, J., Uzunel, M., Okas, M., Berglund, S., Watz, E., Brune, M., Ljungman, P., Maeurer, M., and Mattsson, J. (2012). Rapid salvage treatment with virus-specific T cells for therapy-resistant disease. *Clin. Infect. Dis.* *55*, 1064–1073.

Verdeguer, A., de Heredia, C.D., González, M., Martínez, A.M., Fernández-Navarro, J.M., Pérez-Hurtado, J.M., Badell, I., Gómez, P., González, M.E., Muñoz, A., et al. (2011). Observational prospective study of viral infections in children undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: a 3-year GETMON experience. *Bone Marrow Transplant.* *46*, 119–124.

Via, C.S., Shanley, J.D., and Shearer, G.M. (1990). Synergistic effect of murine cytomegalovirus on the induction of acute graft-vs-host disease involving MHC class I differences only. Analysis of in vitro T cell function. *J. Immunol.* *145*, 3283–3289.

Vickers, M.A., Wilkie, G.M., Robinson, N., Rivera, N., Haque, T., Crawford, D.H., Barry, J., Fraser, N., Turner, D.M., Robertson, V., et al. (2014). Establishment and operation of a Good Manufacturing Practice-compliant allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic cell bank for the treatment of EBV-associated lymphoproliferative disease. *Br. J. Haematol.*

Viswalingam, N.D. (1993). Adenovirus keratoconjunctivitis: an enigma. *Eye (Lond) 7 (Pt 3 Suppl)*, 5–7.

Walls, T., Shankar, A.G., and Shingadia, D. (2003). Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *Lancet Infect Dis* *3*, 79–86.

Walsh, M.P., Seto, J., Jones, M.S., Chodosh, J., Xu, W., and Seto, D. (2010). Computational analysis identifies human adenovirus type 55 as a re-emergent acute respiratory disease pathogen. *J. Clin. Microbiol.* *48*, 991–993.

Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas, E.D., and Riddell, S.R. (1995). 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.

Wang, L.-R., Dong, L.-J., Zhang, M.-J., and Lu, D.-P. (2008). Correlations of human herpesvirus 6B and CMV infection with acute GVHD in recipients of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* *42*, 673–677.

Wang, Y., Aïssi-Rothe, L., Virion, J.M., De Carvalho Bittencourt, M., Ulas, N., Audonnet, S., Salmon, A., Clement, L., Venard, V., Jeulin, H., et al. (2014). Combination of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1, 3 and lytic antigen BZLF1 peptide pools allows fast and efficient stimulation of Epstein-Barr virus-specific T cells for adoptive immunotherapy. *Cytotherapy* 16, 122–134.

Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301, 1374–1377.

Weiden, P.L., Sullivan, K.M., Flournoy, N., Storb, R., and Thomas, E.D. (1981). Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* 304, 1529–1533.

Weinberg, K., Blazar, B.R., Wagner, J.E., Agura, E., Hill, B.J., Smogorzewska, M., Koup, R.A., Betts, M.R., Collins, R.H., and Douek, D.C. (2001). Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 97, 1458–1466.

Weng, J.Y., Du, X., Geng, S.X., Peng, Y.W., Wang, Z., Lu, Z.S., Wu, S.J., Luo, C.W., Guo, R., Ling, W., et al. (2010). Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 45, 1732–1740.

Williams, H., McAulay, K., Macsween, K.F., Gallacher, N.J., Higgins, C.D., Harrison, N., Swerdlow, A.J., and Crawford, D.H. (2005). The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *Br. J. Haematol.* 129, 266–274.

Witt, V., Fritsch, G., Peters, C., Matthes-Martin, S., Ladenstein, R., and Gadner, H. (1998). Resolution of early cytomegalovirus (CMV) infection after leukocyte transfusion therapy from a CMV seropositive donor. *Bone Marrow Transplant.* 22, 289–292.

Wolff, D., Gerbitz, A., Ayuk, F., Kiani, A., Hildebrandt, G.C., Vogelsang, G.B., Elad, S., Lawitschka, A., Socie, G., Pavletic, S.Z., et al. (2010). Consensus conference on clinical practice in chronic graft-versus-host disease (GVHD): first-line and topical treatment of chronic GVHD. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 16, 1611–1628.

Wu, K.-H., Chan, C.-K., Tsai, C., Chang, Y.-H., Sieber, M., Chiu, T.-H., Ho, M., Peng, C.-T., Wu, H.-P., and Huang, J.-L. (2011). Effective treatment of severe steroid-resistant acute graft-versus-host disease with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Transplantation* 91, 1412–1416.

Wy Ip, W., and Qasim, W. (2013). Management of adenovirus in children after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Adv Hematol* 2013, 176418.

Young, L.S., and Rickinson, A.B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer* 4, 757–768.

Zandvliet, M.L., Falkenburg, J.H.F., van Liempt, E., Veltrop-Duits, L.A., Lankester, A.C., Kalpoe, J.S., Kester, M.G.D., van der Steen, D.M., van Tol, M.J., Willemze, R., et al.

(2010). Combined CD8⁺ and CD4⁺ adenovirus hexon-specific T cells associated with viral clearance after stem cell transplantation as treatment for adenovirus infection. *Haematologica* 95, 1943–1951.

Zandvliet, M.L., van Liempt, E., Jedema, I., Kruithof, S., Kester, M.G.D., Guchelaar, H.-J., Falkenburg, J.H.F., and Meij, P. (2011). Simultaneous isolation of CD8(+) and CD4(+) T cells specific for multiple viruses for broad antiviral immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *J. Immunother.* 34, 307–319.

Zhou, H., Guo, M., Bian, C., Sun, Z., Yang, Z., Zeng, Y., Ai, H., and Zhao, R.C. (2010). Efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of sclerodermatous chronic graft-versus-host disease: clinical report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 16, 403–412.

ANNEXES



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Transplant Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/trim



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

Maud D'Aveni^{a,b,1}, Lamia Aïssi-Rothé^{a,c,1}, Véronique Venard^d, Alexandra Salmon^b, Aude Falenga^a, Véronique Decot^{a,c}, Jean Marc Virion^e, Yingying Wang^{a,c}, Laurence Clement^b, Véronique Latger-Cannard^f, Cécile Tomowiak^b, Jean François Stoltz^{a,c}, Pierre Bordigoni^b, Danièle Bensoussan^{a,c,*}

^a CHU de Nancy, Unité de Thérapie cellulaire et Tissus, Vandoeuvre-lès-Nancy, F54511, France

^b CHU de Nancy, Unité de Transplantation Médullaire, Hôpital d'Enfants, Vandoeuvre-lès-Nancy, F54511, France

^c Nancy Université-UHP, CNRS UMR 7561 and FR 3209 CNRS-INSERM, Nancy, F-54000, France

^d CHU de Nancy, Laboratoire de Virologie, Vandoeuvre-lès-Nancy, F54511, France

^e CHU de Nancy, Service d'Epidémiologie et Statistique, Vandoeuvre-lès-Nancy, F54511, France

^f CHU de Nancy, Service d'Hématologie Biologique, Vandoeuvre-lès-Nancy, F54511, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2010

Received in revised form 18 March 2011

Accepted 21 March 2011

Keywords:

Epstein Barr virus

Specific immune reconstitution monitoring

Allogeneic hematopoietic

Stem cell transplantation

ABSTRACT

Background: Monitoring of EBV DNAemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is necessary, but not sufficient, to identify patients at risk of EBV-induced post-transplantation lymphoproliferative disorders (PTLD). Combining this with quantifying EBV-specific cellular immunity was shown to be helpful. In this study, we evaluated the value of IFN γ -Elispot assay in monitoring EBV DNAemia after HSCT. **Methods:** EBV-DNA load in whole blood was monitored at least weekly using real-time PCR in 40 recipients of HSCT. Quantitative and qualitative T-cell recoveries, including EBV-specific T-cell quantification by Elispot assay, were studied 60, 100, 180 and 360 days after HSCT.

Results: Among the 35 evaluable patients, 14 (35%) presented EBV DNAemia, only 2/14 (14%) needing pre-emptive treatment with rituximab. The greatest risk factor for EBV DNAemia was the presence of anti-thymocyte globulin (ATG) ($p = 0.005$). EBV-specific cellular immune recovery was monitored by IFN γ -Elispot assay. Using multivariate analysis, four factors were found to significantly influence IFN γ -Elispot results at defined times post-HSCT: EBV DNAemia, young age, global T-cell recovery and severe acute GVHD. In those cases where EBV DNAemia occurred and cleared spontaneously, Elispot results gave more than 1000 spot-forming cells (SFC)/ 10^6 PBMC.

Conclusion: Elispot assay may be usefully combined with EBV-DNA load monitoring to determine when a patient should receive pre-emptive treatment, or when the clinician should avoid Rituximab use which severely immunocompromises patients.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Epstein Barr virus is a ubiquitous human gamma herpes virus infecting oropharyngeal epithelium and B-cells. T lymphocytes control the proliferation of primary and latent EBV-infected cells. In hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), recipients are strongly T-cell immunocompromised which results in uncontrolled growth and transformation of infected B cells due to the expression of survival signals. The tumor known as post transplantation lympho-

proliferative disorder (PTLD) develops from donor B cells and expresses the same full spectrum of latent cycle antigens as *in vitro* lymphoblastoid cell lines (LCL).

Major risk factors for PTLD are [1]: *ex vivo* or *in vivo* T-cell depletion (antithymocyte globulin (ATG) and alemtuzumab) [2], severe acute graft *versus* host disease (aGVHD) and donor/recipient HLA mismatch (≥ 2) [3]. Other risk factors reported include age over 50 years at time of transplantation, a second transplantation [4] and a high CD34 cell count ($> 1.35 \times 10^6/\text{kg}$) [5]. PTLD incidence increases from 1.1% to 3.6 or 8% in the presence of 1, 2 or 3 risk factors, respectively [4]. One year post-HSCT, the only risk factor is chronic graft *versus* host disease (cGVHD). EBV-DNA load studied with semi-quantitative PCR [6] and more recently with quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) amplification [7] is defined as a criterion to start pre-emptive or antitumor therapy [8,9]. However, the sensitivity and specificity of

* Corresponding author at: Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, CHU de Nancy, Allée du MORVAN, 54511 Vandoeuvre-Les-Nancy, France. Tel.: +33 03 83 15 37 79, +33 03 83 15 48 69; fax: +33 03 83 15 37 56.

E-mail address: d.bensoussan@chu-nancy.fr (D. Bensoussan).

¹ The first two authors contributed equally to this work.

this qPCR related to the threshold number of copies defining positive predictive value and negative predictive value depend on patient-related risk factors [10,11]. Moreover, all the studies of EBV DNA load after HSCT were performed with different units and, to our knowledge, no universal threshold has been defined [12,13]. Although EBV-DNA load is essential for managing EBV infections, it does not discriminate between patients who recover EBV-specific immune response and who can control infection from those who do not and who therefore need immunotherapy [14]. In fact, peak incidence of PTLD occurs during the first 6 months after HSCT (1–3%). Then, the incidence decreases due to the increase in EBV-specific T-cells [15]. Therefore, we suggest that testing the capacity of recipient PBMC to react against donor LCL may help to identify PTLD risk.

Currently, the diagnosis of PTLD is presumed from the presence of risk factors, EBV DNAemia and clinical signs and is confirmed by histology. Therapies that impacted the immunobalance of infected B-cells and specific cytotoxic T-cells, including preventive treatment combining donor B-cell and T-cell depletions before HSCT [16] and curative treatment as donor lymphocyte infusion (DLI) [17], EBV-specific cytotoxic T-lymphocytes [18–20] and then monoclonal anti-CD20 antibody [21] were developed successfully. Because of their side effects, mostly on immune reconstitution, we thought that the strategy of quantifying EBV-specific cellular immunity, combined with early and close monitoring of EBV DNAemia [22–24], could help to target patients whose EBV-specific T-cells can control viral DNAemia from those whose cells cannot.

We report hereafter a retrospective study of EBV-specific T-cell reconstitution post-HSCT by Elispot assay using LCLs as antigen-presenting cells. We explored the feasibility and reliability of LCLs Elispot assay in a population of 40 patients and looked for factors correlating with Elispot results. The aim of this study was to assess the value of IFN γ -Elispot assay for monitoring EBV DNAemia after HSCT by identifying retrospectively those patients with high EBV-DNA load who developed a specific immune response sufficient to resolve the infection without any pre-emptive treatment. Associated risk factors were taken into account.

2. Materials and methods

2.1. Patients and transplant characteristics (Table 1)

The cohort consisted of 40 consecutive patients (13 children and 27 adults) who underwent an allogeneic HSCT at the Nancy-Brabois Hospital between January and December 2006. The median age was 30 years (range 0–64). Most patients were transplanted for acute leukemia. The conditioning regimen was of reduced intensity for 26 patients and myeloablative for 14 patients. Graft versus host disease prophylaxis consisted of combined immunosuppressive therapies. No graft was *ex vivo* T-cell depleted. Antithymocyte globulin (ATG) was given in the conditioning regimen of 29 patients.

2.2. Monitoring of EBV DNAemia

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

2.2.1. Quantitative real-time PCR

Briefly, DNA was extracted from 200 μ L of EDTA-treated whole blood with the QIAamp blood kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The real-time assay was routinely performed as described by Gärtner et al. [13] on a Light Cycler® 2.0 Real-Time PCR System (Roche, Meylan, France), using the MIX reaction 5 $\times$ from Light Cycler Fast Start DNA Master Plus (Roche, Meylan, France). qPCR amplified a EBV VCA gene region sequence using the primers: P23-LO 5'TGG CGT TGG GGT CGT

Table 1
Patient characteristics.

Patients	Characteristics	Number
Total		40
Sex	Male	20
	Female	20
Median age		30 years
Diagnosis	AML	18
	ALL	8
	Lymphoma	5
	Myelodysplasia	2
	Aplastic anemia	1
	Congenital immunodeficiency	1
	Hemoglobinopathy	1
	Chronic myeloid leukemia	1
	Chronic lymphocytic leukemia	1
	Other	2
Risk	High	18
	Low	22
Conditioning regimen	Myeloablative	14
ATG	Thymoglobulin	5
	Fresenius $\geq$ 40 mg/kg	18
	Fresenius < 40 mg/kg	6
	No ATG	11
GVHD prophylaxis	Cyclosporine + MTX	11
	Cyclosporine + MMF	26
	Cyclosporine + solumedrol	2
	Cyclosporine alone	1
Donor	Sibling	17
	UD	23
HLA identity	9/10	6
	10/10	27
	3/6	1
	4/6	4
	5/6	1
	6/6	1
Graft origin	Bone marrow	17
	PBSC	16
	UCB	7
EBV serology	D+/R+	26
	D+/R–	4
	D–/R+	7
	D–/R–	3
Mean graft content	Nuclear cells $\cdot$ 10 ⁸ /kg	3.8
	CD34 $\cdot$ 10 ⁶ /kg	4.14
	CD3 $\cdot$ 10 ⁷ /kg	10.49
	CD19 $\cdot$ 10 ⁷ /kg	2.6
	CFU-GM $\cdot$ 10 ⁴ /kg	131.2

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

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

TTG AT 3' and P23-UP 5'CGC CTG GCT CGC CTG GAG T 3', and the following probes: EBFL probe 5' GCG GAG GCA CTG GAG CAG AAG GAA CA Fluo 3' and EBLC probe 5' (LCRed 640) AGG TAG ACG AGG CAC AGG CAC CCC CT 3'. For each PCR, a 20 μ L mixture contains: 4 μ L of MIX reaction 5 $\times$ from Light cycler Fast Start DNA Master Plus, 2 μ L H₂O, 2 μ L EBLC probe at 1.5 μ M, 2 μ L EBFL probe at 1.5 μ M, 1 μ L primer P23-LO sens at 10 μ M, 1 μ L primer P23-UP antisens at 10 μ M, 1.5 U of Taq DNA polymerase, and 200 μ M of each dGTP, dATP, dCTP, and dTTP (Roche Diagnostics, Meylan, France). A plasmid DNA containing a part of the p23 sequence of the VCA gene with a deletion of 30 bp (kindly provided by Prof. Gärtner and Pr. Müller-Lantzsch, Homburg,

Germany), was used as the external standard, was serially diluted and used as a quantification standard for the real-time qPCR. Appropriate negative and positive controls were included in all tests.

PCR conditions (external and internal) were as follows: activation 95 °C for 8 min; 45 cycles of 95 °C (10 s), 60 °C (10 s for the fluorescence acquisition), and 72 °C (18 s). Results were calculated as the number of EBV genomic equivalent copies per milliliter (cp/mL) of whole blood [13]. The detection limit of this assay was 1000 cp/mL.

2.3. Monitoring of cellular immunity reconstitution

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

2.3.1. Flow cytometry

Lymphocyte phenotype was performed on EDTA whole blood samples, with a FACSCalibur flow cytometer (Beckton Dickinson, San Jose, USA), by direct immunofluorescence using the following specific conjugated monoclonal antibodies : anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD19, -CD16 and -CD56 (Becton Dickinson, San Jose, USA).

2.3.2. Mitogen and antigen induced proliferation

Proliferation assays in response to PHA, PMA-ionomycin were performed as previously described [25].

2.4. Monitoring of EBV-specific T-lymphocyte reconstitution

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

2.4.1. Isolation of PBMC and generation of LCL

PBMC were isolated from donor peripheral blood by Ficoll gradient density centrifugation. For LCL generation, 2×10^6 PBMC were incubated with 0.4 mL supernatant from the B95-8 EBV-producer cell line for 1 h at 37 °C under shaking. Cyclosporine A (Novartis, Pharma S.A., Reuil-Malmaison, France) was added directly to PBMC infected at days 0, 2, 4, and 6 in order to inhibit specific T-cells. The culture was incubated at 37 °C with 5% CO₂ in culture medium (RPMI Glutamax: (Invitrogen, Gibco BRL Life Technologies, Paisley, Scotland) supplemented with an antimycotic and antibiotic solution (Invitrogen, Gibco BRL Life Technologies, Paisley, Scotland) and 20% Fetal Bovine Serum (FBS)). LCL were expanded in this medium. After 3 to 4 weeks, LCL viability was checked over 75% to be used in an Elispot assay. When viability was lower, Ficoll density gradient centrifugation was performed to eliminate dead cells.

2.4.2. Elispot assay

Elispot assay was performed as previously described [26]. Briefly, after overnight coating of 96 well-Multiscreen ImmobilonR-P plates (MAIPS) (Millipore, Bedford, MA) with a monoclonal anti-human IFN- γ antibody, 1-D1K (Mabtech, Stockholm, Sweden), donor LCL were added to each well at 5×10^4 cells/well in RPMI supplemented with 20% (FBS), as antigen presenting cells. Then, thawed PBMC (previously controlled as leading to similar EBV-specific T-cell count than freshly drawn PBMC with IFN- γ -Elispot method) were added in triplicate from 1×10^6 to 1.25×10^5 cells/mL and incubated for 20 h at 37 °C. Negative controls of each type of cell were incubated alone with 100 μ L RPMI 20% FBS. Positive controls were recipient cells incubated with PHA at 1 μ g/mL. Allogeneic T-cell response was studied against HLA-mismatched LCL. After undisturbed incubation for 20 h at 37 °C with 5% CO₂, the cells were discarded and revelation using a second biotinylated anti-human IFN- γ 7B 6-1 biotin (Mabtech), a streptavidin conjugated alkaline phosphatase (Mabtech) and an alkaline phosphatase-conjugate substrate kit (Biorad, Richmond, CA) was

performed. After 15 min, the reaction was stopped, the plates washed and air-dried. Dark spots were counted using an automated Elispot reader: Bioreader 4000 PRO-S (BIO-SYS, SERLABO, Entraigues sur la Sorgues, France). The number of specific T-cell was calculated after subtracting negative control values. Results were expressed in spot-forming cells (SFC) per 10^6 PBMC. EBV specificity was evidenced by absence of IFN- γ secretion when testing EBV seronegative donors (median $\pm$ SD: 55 ± 120 SFC/ 10^6 PBMC, with $n = 6$). A positive control – thawed PBMC from a known positive donor against autologous EBV

Table 2

Patient outcome after HSCT.

Follow-up post-graft	Number
Evaluable Elispot patients	
D60	28
D100	27
D180	27
D360	23
EBV load	
Undetectable	21
Detectable but ≤ 40000 cp/mL	10
> 40000 cp/mL	4
PTLD	
Presumed	2
Confirmed	0
Treatment	
Rituximab	2
Other immunotherapy	0
Other viral infection	
CMV	12
HHV6	4
HSV	5
VZV	2
SRV	2
Acute GVHD	
Grade I	4
Grade II	24
Grade $> II$	1
No	6
Chronic GVHD	
Limited	14
Extensive	9
No	12
Death	
Relapse	7
Infections (excepted EBV)	5
Chronic GVHD	2
Other	1
EBV DNAemia	
D+/R+ ($n = 26$)	10
D+/R- ($n = 4$)	2
D-/R+ ($n = 3$)	2
D-/R- ($n = 2$)	0
Mean days post-HSCT of EBV DNAemia detection	
D+/R+	105.2 [40–303]
D+/R-	49 [39–59]
D-/R+	112 [64–160]
D-/R-	0
Mean levels (cp/mL) of EBV DNAemia detection	
D+/R+	15.572 [2.451–81.750]
D+/R-	105.405 [16.610–194.200]
D-/R+	54.750 [45.500–64.000]
D-/R-	0

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

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

Table 3
Patients with EBV DNAemia after HSCT.

Patients	Age (year)	Diagnosis	ATG	EBV serostatus (donor/recipient)	Grade of aGVHD	cGVHD	Start of EBV DNAemia (days after HSCT)	PTLD symptoms	Treatment	Peak DNA load (cp/mL)	EBV Elispot > 1000 SFC/10 ⁶ (day after HSCT)	CD3- (/mm ³)	CD4 (/mm ³)	CD8 (/mm ³)	CD3-CD16/CD56 (/mm ³)
2	30	AML CR1	+	D+/R+	2	Extensive	63	No, Sp C		8645	360	87	16	62	ND
4	6	ALL	+	D+/R-	3	Extensive	59	No, Sp C		16610	100	73	40	35	168
12	2	T-ALL CR1	+	D+/R+	2	No	40	No, Sp C		27985	<60	429	39	368	61
18	47	AML Phi +	+	D+/R+	2	Limited	38	No, Sp C		2451	ND	90	22	66	93
19	6	Aplastic anemia	+	D+/R-	2	Extensive	39	Pulmonary + splenic lesions	Rituximab	194200	<60	261	65	178	91
23	39	AML	+	D+/R+	2	Limited	94	No, Sp C		2969	<60	ND	ND	ND	ND
24	18	Hodgkin lymphoma	+	D+/R+	2	Limited	69	No, Sp C		18155	100	1283	988	269	41
28	46	Sezary syndrome	+	D+/R+	2	Limited	127	No, Sp C		81750	ND	193	130	60	ND
29	53	MDS	+	D+/R+	1	No	87	No, Sp C		3365	ND	84	22	50	ND
35	7	Sickle cell disease	+	D-/R+	1	No	64	No, Sp C		45500	<60	780	273	405	ND
36	36	CML	+	D+/R+	0	Extensive	168	No, Sp C		2874	180	575	178	356	153
37	3	B-ALL	+	D+/R-	2	Limited	160	Sinusitis + lymphadenopathy	Rituximab	64000	180	319	ND	ND	ND
38	30	Hodgkin lymphoma	+	D+/R+	1	Limited	303	No, Sp C		6280	180	1645	247	1332	166
40	51	AML	+	D+/R+	0	No	63	No, Sp C		2250	ND	ND	ND	ND	ND

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

LCL – was performed in each Elispot assay (median $\pm$ SD values of positive controls: 1997 ± 813 SFC/10⁶ PBMC, with $n = 45$).

According to the Society of Biological Therapy, Elispot assays are defined by the detection of a 2 or 3 fold increase over unstimulated control wells [27].

2.5. Statistical analysis

Wilcoxon's nonparametric test was used to compare quantitative factors. The X2 test (Pearson or Fischer's exact test, two tailed) was

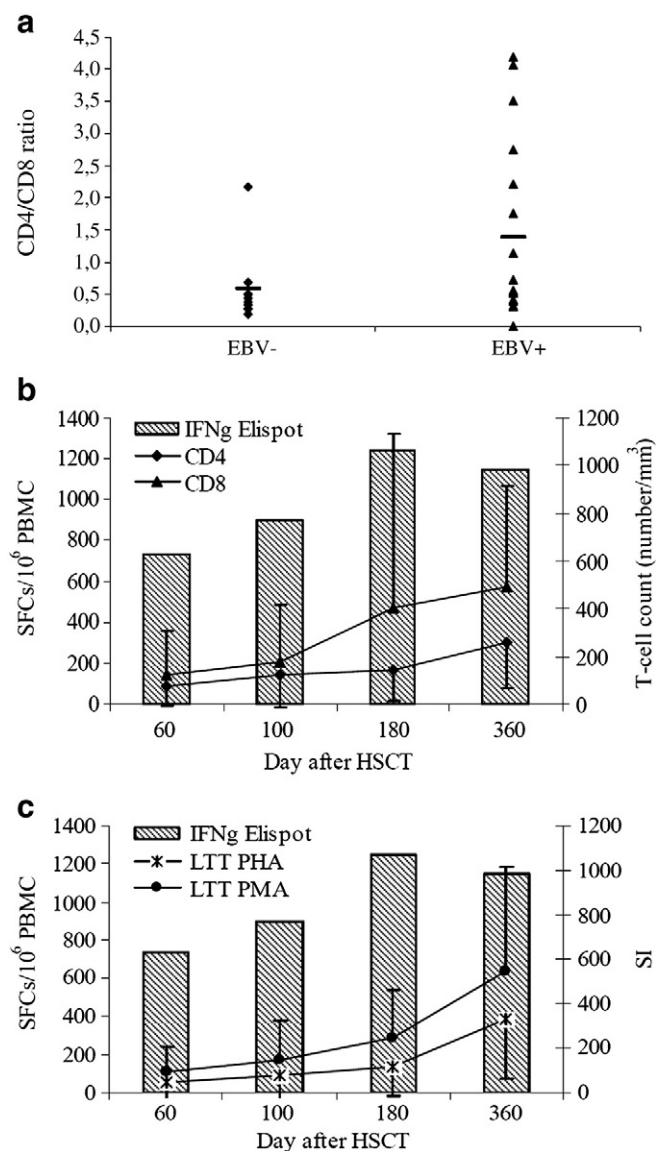


Fig. 1. Correlation between general T-cell reconstitution after HSCT and Elispot results. SI, stimulation index; LTT, lymphoblastic transformation test. Spearman rank correlation was used for assessing relationships between variables. 1a. Reverse CD4/CD8 ratio for patients with EBV DNAemia compared to patients without EBV DNAemia at day 100. Wilcoxon's nonparametric test was used to compare quantitative factors. Lymphocyte subset counts were determined at days 60, 100, 180, and 360. We observed that patients with EBV DNAemia had a reverse CD4/CD8 ratio just after the onset of DNAemia ($p = 0.08$). 1b. Mean of CD8 T-cell count correlates to mean of Elispot results at days 60 ($p = 0.01$) and 100 ($p < 0.01$) for several patients in the study. Mean of CD4 T-cell count at days 100 ($p < 0.01$) and 360 ($p = 0.03$) correlates to mean of Elispot results for several recipients studied. 1c. There is a significant correlation between Elispot assay results and mitogen proliferative assay, performed with PHA and PMA ionomycin, at day 100 ($p = 0.03$ and $p = 0.01$, respectively) and day 360 ($p = 0.03$ and $p < 0.01$, respectively).

Table 4a

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

Days after HSCT	Median (±SD) of Elispot results for patients <18 years old (SFC/10 ⁶ PBMC)			Median (±SD) of Elispot results for patients ≥ 18 years old (SFC/10 ⁶ PBMC)			Statistical significance [*]
	Negative controls		Test [*]	Negative controls		Test [*]	
	MNC	Donor EBV LCL		MNC	Donor EBV LCL		
D60 (n = 28)	20 ± 30	30 ± 118	1880 ± 1501	10 ± 509	35 ± 250	95 ± 714	p = 0.01
D100 (n = 24)	25 ± 37	30 ± 138	1510 ± 1873	30 ± 43	20 ± 142	160 ± 820	p < 0.01
D180 (n = 27)	50 ± 29	20 ± 65	2010 ± 1958	10 ± 33	10 ± 196	470 ± 780	p < 0.01
D360 (n = 22)	40 ± 57	5 ± 83	1470 ± 701	10 ± 15	10 ± 41	450 ± 1195	p > 0.05

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

* Statistical difference between the tests of the two groups.

used to compare nominal or discrete factors and Spearman rank correlation was used for assessing relationships between variables. For all tests, a p value < 0.05 was considered significant. For multivariate analysis, a p value < 0.10 was considered significant. The analyses were generated using SAS/STAT software, Version 9.1.3 of the SAS System for Windows. Copyright © 2002–2003 SAS Institute Inc.

3. Results

3.1. Clinical outcome

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

3.2. Incidence of EBV DNAemia and PTLD

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

3.3. Simultaneous EBV-specific and general T-cell immune reconstitution

Because delayed recovery of the immune system might be of importance in the onset and progression of EBV DNAemia, the absolute lymphocyte counts of uninfected patients and EBV reactivating patients were compared. The time to lymphocyte reconstitution (set at $0.2 \cdot 10^9$ lymphocytes/L) was the same for both groups but patients with EBV DNAemia had a reverse CD4/CD8 ratio just after the onset of virus DNAemia (p = 0.08). This ratio persisted until clearance of EBV (Fig. 1a).

Table 4b

Comparison of Elispot results 60, 100, 180, and 360 days after HSCT for patients with EBV DNAemia against patients without EBV DNAemia.

Days after HSCT	Median (±SD) of Elispot results for patients with EBV DNAemia (SFC/10 ⁶ PBMC)			Median (±SD) of Elispot results for patients without EBV DNAemia (SFC/10 ⁶ PBMC)			Statistical significance*
	Negative controls		Test*	Negative controls		Test*	
	MNC	Donor EBV LCL	MNC + Donor EBV LCL	MNC	Donor EBV LCL	MNC + Donor EBV LCL	
D60 (n = 28)	200 ± 351	30 ± 105	510 ± 1518	10 ± 510	40 ± 250	95 ± 855	p = 0.08
D100 (n = 24)	200 ± 187	30 ± 125	1190 ± 1679	30 ± 50	10 ± 146	140 ± 1083	p = 0.01
D180 (n = 27)	40 ± 23	10 ± 46	1635 ± 1737	10 ± 36	20 ± 198	170 ± 1129	p = 0.01
D360 (n = 22)	20 ± 58	10 ± 53	940 ± 881	10 ± 26	10 ± 58	815 ± 1181	p > 0.05

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

* Statistical difference between the tests of the two groups.

3.4. Factors influencing EBV-specific T-cell reconstitution studied by Elispot assays

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

We observed five factors modulating the recovery of EBV-specific cellular immunity. The young age of recipients (<18 years) resulted in significantly higher Elispot results at days 60, 100, and 180 (Table 4a) and EBV DNAemia (before Elispot assay was performed) at days 100 and 180 (Table 4b). As expected, significant correlations were observed between Elispot assay results and CD8, CD4 T-cell counts and mitogen proliferative assays (Fig. 1b and c). Moreover, donor EBV+ serological status influenced EBV-specific T-cell increase at day 60 (p < 0.05) and acute GVHD delayed EBV-specific T-cell recovery (p = 0.057 at D100) but we had insufficient data to reach significance at each time post transplant. Viral reactivations (other than EBV), conditioning regimen intensity and the CD19 and CD3 cell counts in the graft infused had no significant impact on EBV-specific T-cell recovery.

In multivariate analysis, four of the modulating factors identified were significantly correlated with specific immune reconstitution against EBV:

- Three factors accelerated specific EBV immune reconstitution: age of recipient (<18 years old, D180, p < 0.008), EBV DNAemia (D100, p = 0.11) and T cell reconstitution (D60, D100, and D360, p < 0.01).
- One factor impaired EBV specific immune reconstitution: acute GVHD (D60, p < 0.05).

3.5. Elispot assay threshold of EBV-specific T-cell reconstitution

Assessment of the level of T-cell reconstitution at the time of EBV DNAemia is relevant for clinical decision-making. For 9 patients with an Elispot evaluation among the 14 with EBV DNAemia, we tried to find a threshold which could determine effective EBV-specific cellular immunity and thus target those recipients who need immunotherapy. In our cohort, 7 patients had EBV DNAemia which decreased spontaneously and 2 were treated by immunotherapy (Fig. 2). As Elispot assays were performed at fixed points, we observed that at the time of EBV DNAemia, 4 out of 7 patients already presented EBV-specific T-cell frequency over 1000 SFC/10⁶ PBMC and 3 out of 7 were tested above this arbitrary threshold 12 to 31 days after (Table 5). Thus, for patient 38, Elispot results were at 1030 SFC/10⁶ PBMC at day 180 and 1410 SFC/10⁶ PBMC at day 360. But, on day 303, EBV DNAemia increased under 10 000 cp/mL during 6 days, testifying the ability of his EBV-specific T cells to control EBV-DNA load. Although 1000 SFC/10⁶ PBMC is not a high response to LCL, it appears to be enough to attest for an immunosurveillance in this immunocompromised cohort.

Two patients were treated because their EBV-DNA load exceeded 40 000 cp/mL with PTLD compatible symptoms. They received only 2 infusions of rituximab. Clearance of EBV-DNA load was then observed concomitant to EBV-specific T-cell increase (Fig. 2a and b). We suppose that EBV PTLD resolved, in part, thanks to EBV

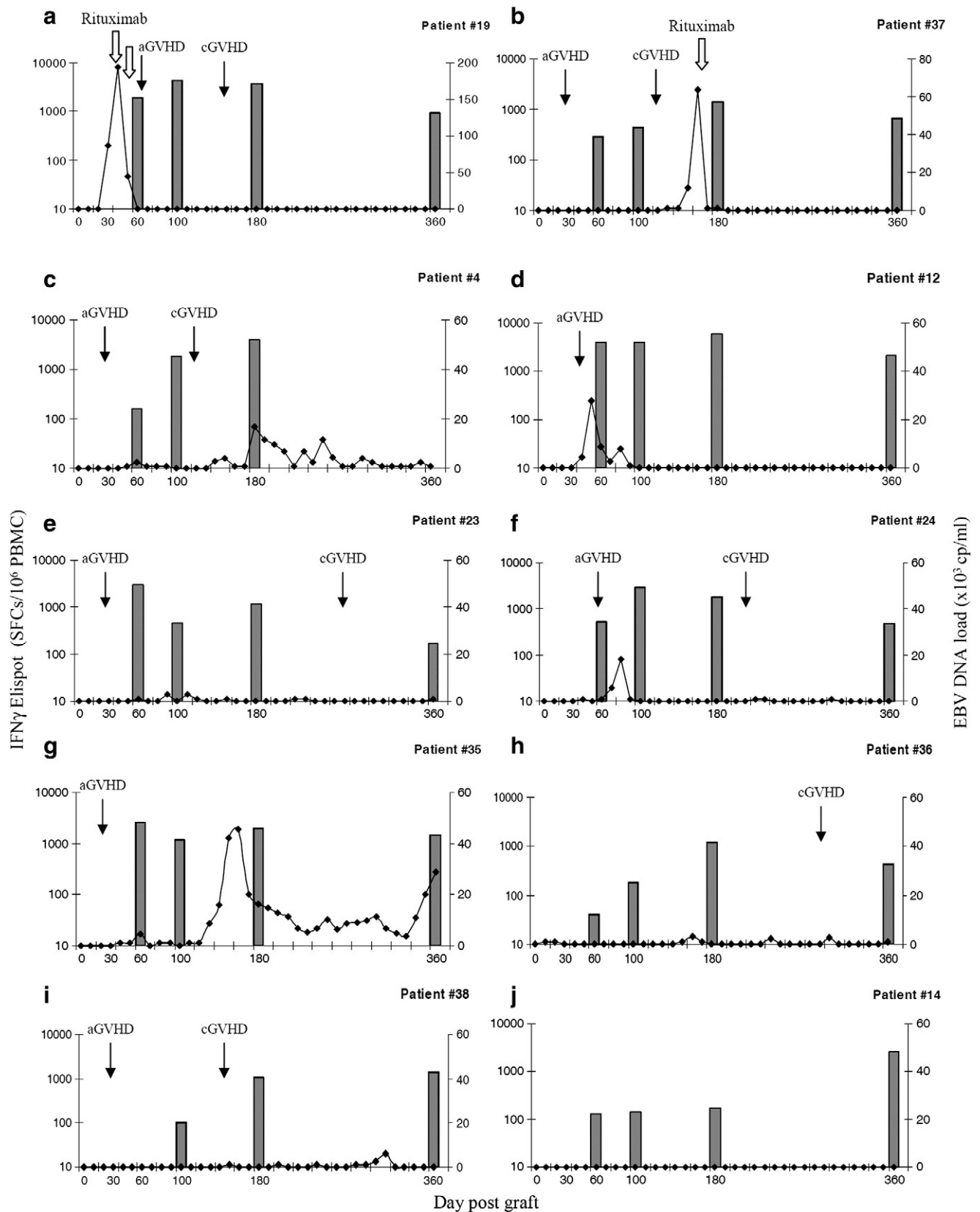


Fig. 2. EBV-DNA load studied with Elispot results. 2a and 2b. Two patients treated with rituximab. The first patient presented EBV DNAemia which reached 194 200 cp/mL at day 40, with an Elispot result at day 60 at 1880 SFC/10⁶ PBMC. This patient received a weekly infusion of rituximab 375 mg/m² twice and total clearance of EBV viremia occurred on the 11th day after the peak load. At day 100, Elispot reached 4330 SFC/10⁶ PBMC which could explain why this patient with very fast and high EBV DNAemia cleared the EBV-DNA load after only two infusions of rituximab. For the second patient, the EBV-DNA load reached 64 000 cp/mL at day 160 when the Elispot result at day 100 was 430 SFC/10⁶ PBMC, but the Elispot result at day 180 was 1440 SFC/10⁶ PBMC. 2c–2i. Patients with EBV DNAemia who experienced clearance of EBV without rituximab. 2j. Example of one patient without EBV DNAemia.

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

Patients	Start of EBV DNAemia (days after HSCT)	Peak load (cp/mL)	Time during EBV DNAemia (days)	Elispot D60	Elispot D100	Elispot D180	Elispot D360
4	145	16610	240	160	1830	4030	ND
12	40	27985	27	4040	4100	5940	2140
23	94	2969	1	3000	440	1150	170
24	69	18155	4	510	2940	1830	480
35	64	45500	365	2550	1190	1980	1470
36	168	2874	1 ^a	40	180	1210	420
38	303	6280	8	0	100	1030	1410

EBV, Epstein Barr virus; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; D, days after transplantation; and ND, not done.

Elispot assays were used to determine the frequency of EBV-specific T-cells in patient PBMC producing interferon gamma in response to stimulation with donor LCL [40]. In 6 out of 7 cases, Elispot results ranged from 1150 to 4040 SFC/10⁶ PBMC.

^a Patient 36 presented 3 episodes of 1 day EBV DNAemia, at day 168, day 240 and day 300.

specific immune reconstitution, although we lack immune monitoring data to assert this.

4. Discussion

EBV-LPD prognosis after allogeneic HSCT has improved over recent years, mostly due to close PCR-EBV load monitoring and implementation of innovative pre-emptive immunotherapy. However, high risk patients are still not identified clearly and may be abusively treated. Combining EBV-DNA load assessment with EBV-specific immune monitoring has been shown to be very helpful [22,23]. We report here a retrospective, one year study investigating EBV infection and EBV-specific immune recovery using the functional IFN γ Elispot assay in 35 evaluable allogeneic HSCT patients. As previously reported, we identified ATG treatment as the greatest risk factor associated to EBV DNAemia. By multivariate analysis, three factors were found to significantly influence EBV specific cellular immune recovery: young age (<18 years old) (D180), T-cell recovery (D60, D100 and D360) and severe acute GVHD (D60), and one nearly reached significance due to the limited size of the cohort: EBV DNAemia (D100). EBV DNAemia occurred in 14 patients and, for 7 patients whose Elispot results were detected over 1000 spot-forming cells (SFC)/10⁶PBMC before or up to 30 days after EBV DNAemia, spontaneous clearance was observed.

Moreover, Elispot assays with EBV-LCL as antigen-presenting cells offer advantages over other techniques. Limiting dilution assay (LDA) is labor intensive (12 days to generate results) and underestimates the frequencies of antigen-reactive T-cells. Elispot assay requires fewer cells, less time and gives values 2 to 10 fold higher than those obtained with LDA [28]. Measuring T-cell binding peptide-HLA tetramers [29] is a more accurate and sensitive approach [30]. However, it is HLA-restricted and detects the presence of EBV epitope-specific T-cells without any requirement for function, whereas Elispot assay with LCL is not HLA-restricted and relies on the ability to secrete cytokine upon activation. Moreover, when T-cell frequencies measured by Elispot assay are below 20/10⁶PBMC, tetramer and IFN γ + Intra-Cytoplasmic Cytokine (ICC) staining, both performed by cytometric analysis [31,32] fail to reach a signal, attesting the sensitivity limits imposed by flow cytometry detection. Elispot assay may provide advantages for detecting such antigen-specific T-cells at lower frequencies [33,34], without HLA-restriction, and is particularly relevant in the analysis of an immunocompromised population [35]. However, obtaining LCL is time consuming, and must be anticipated at the time of HSCT. Recent availability of overlapping peptide pools for the EBV immunodominant proteins will probably give more flexibility.

Compared to adult recipients, children had significantly faster EBV-specific immune reconstitution. We report a correlation between EBV seropositive donors and higher EBV-Elispot results at D60, suggesting effective peripheral T-cell expansion against EBV antigens. Nevertheless, one child (patient 35), who received HSCT from an EBV

seronegative donor, experienced a dramatic early increase in EBV-specific IFN γ -positive cells (D60) which could hardly be due to recipient cells because of complete donor chimerism from day 45 post-HSCT. Strikingly, in our study we did not find any significant correlation between a higher number of infused T-cells and faster T-cell reconstitution after HSCT. Regarded to these arguments, immune reconstitution against EBV can also be due in children to recent thymic emigrants [36].

Patients with EBV DNAemia had significantly higher Elispot results at D100 and D180. For these patients with EBV DNAemia, no difference in lymphocyte count, but a trend to a reverse CD4/CD8 ratio at the onset of EBV DNAemia was observed. Although we lack absolute evidence, the predominant increase in CD8 + T-cells simultaneous to EBV DNAemia, correlated to Elispot results at early checkpoints after HSCT (D60 and D100), could result from the expansion of EBV-specific CD8 T-cells, allowing for early specific immune response study. Persistent EBV-specific immune response may rely on CD4+ T-cells as suggested by significant correlations between Elispot results and CD4 T-cell counts and also mitogen proliferative assay at later checkpoints after HSCT (D100 and D360). EBV persists in the target cells due to an immunobalance between the proliferation of infected cells and the response of virus-specific T-cells [37], particularly CD4+ T-cells with T-helper 1 (Th1)-like function and CD4+ and CD8+ cytotoxic T-cells [38]. From 180 to 360 days after allogeneic HSCT, EBV immune regulation seems to be based on lower IFN γ secreting T-cells. It would be interesting to study cytokine patterns of the EBV-specific T-cells after D180 by, for example, a concomitant IL2 Elispot. It could be that part of these cells secretes only IL2 or both IFN γ and IL2, which has been described as a multifunctional signature in case of chronic controlled infection as EBV infection [39]. Such an evolutive cytokine pattern has been recently reported in CD4+ T cells with other viruses like CMV and ADV [40,41].

Cwynarski et al. [42] have defined a cut-off level for CMV-specific T-cell count protecting against CMV infection, but when EBV replicates, the antigenic load quickly expands due to B-cell proliferation, and T-cells continuously adapt to it [23]. In our center, direct quantification of specific T-cells may provide a threshold value useful for controlling viral DNAemia. In order to complete our center guidelines based on an EBV-DNA load threshold of 40 000 cp/mL, we propose the following strategy for high risk patients. When EBV-DNA load is over 40 000 cp/mL and in the absence of symptom, two Elispot assays could be required to evaluate EBV-specific T-cell recovery kinetics. When EBV-DNA load is lower than 40 000 cp/mL, one Elispot result over 1000 SFC/10⁶PBMC could be sufficient to allow for spontaneous EBV clearance. After this study, we performed Elispot assay for six patients who underwent an allogeneic HSCT, with EBV DNAemia between 10 000 and 40 000 cp/ml (data not shown). In all cases, Elispot results were over 1000 SFC/10⁶PBMC at the onset of the EBV DNAemia increase or in the 48 following hours and EBV-DNA load was cleared spontaneously. However, if the Elispot result is lower

than 1000 SFC/10⁶ PBMC, the assay should be repeated a week later in order to detect any increase in EBV-specific T-cells. Such a strategy requires confirmation in a prospective study.

Contribution of EBV-specific immune monitoring to target post-HSCT patients with EBV DNAemia who need pre-emptive treatment has been previously reported by different teams, using tetramer assay [14,22,23]. However, although tetramer assay is easy to perform, there are main drawbacks due to absence of functional information, HLA restriction and unique peptide EBV antigen presentation. The Elispot assay performed in our study does not have these drawbacks, since it is a functional assay, allowing wide EBV antigen presentation, which is essential as many immunodominant EBV antigens were described [43]. These performances will be preserved with evolution to EBV overlapping peptide pools or peptide mix.

Performing EBV Elispot can reduce rituximab indications to patients with insufficient EBV-specific T-cell reconstitution, in order to limit detrimental effects induced by rituximab [44]. It may be also a useful tool to identify patients lacking specific immune reconstitution who could benefit from specific CTL infusion, as well as in the follow-up of EBV T-cell recovery after specific CTL infusion [5].

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

Financial disclosure statement

Each author asserts that he or she has no commercial association (e.g., consultancies, stock ownership, equity interest, patent/licensing arrangements, etc.) that might lead to a conflict of interest in connection with this study.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the *Direction de la Recherche Clinique* from Nancy Hospital. We wish to thank Mrs. Petri from UTCT for careful collecting data and Mrs. Maix, Mrs. Masson, Mrs. Brassard, Mrs. Binot-Saintot, Mrs. Frantzen, Mrs. Haler, and Mr. Burton from UTCT for their excellent technical assistance.

References

- [1] Curtis RE, Travis LB, Rowlings PA, et al. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood* 1999;94:2208–16.
- [2] Hale G, Waldmann H. Risks of developing Epstein-Barr virus-related lymphoproliferative disorders after T-cell-depleted marrow transplants. *CAMPATH Users*. *Blood* 1998;91:3079–83.
- [3] Gerritsen EJ, Stam ED, Hermans J, et al. Risk factors for developing EBV-related B cell lymphoproliferative disorders (BLPD) after non-HLA-identical BMT in children. *Bone Marrow Transplant* 1996;18:377–82.
- [4] Landgren O, Gilbert ES, Rizzo JD, et al. Risk factors for lymphoproliferative disorders after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2009;113:4992–5001.
- [5] van Esser JW, Niesters HG, van der Holt B, et al. Prevention of Epstein-Barr virus-lymphoproliferative disease by molecular monitoring and preemptive rituximab in high-risk patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002;99:4364–9.
- [6] Sirvent-Von Bueltingersloewen A, Morand P, Buisson M, et al. A prospective study of Epstein-Barr virus load in 85 hematopoietic stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 2002;29:21–8.
- [7] Kimura H, Morita M, Yabuta Y, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 1999;37:132–6.
- [8] Meerbach A, Wutzler P, Hafer R, Zintl F, Gruhn B. Monitoring of Epstein-Barr virus load after hematopoietic stem cell transplantation for early intervention in post-transplant lymphoproliferative disease. *J Med Virol* 2008;80:441–54.
- [9] Stevens SJ, Verschuur EA, Pronk I, et al. Frequent monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of posttransplant lymphoproliferative disease in high-risk patients. *Blood* 2001;97:1165–71.
- [10] Aalto SM, Juvonen E, Tarkkanen J, et al. Epstein-Barr viral load and disease prediction in a large cohort of allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2007;45:1305–9.
- [11] Juvonen E, Aalto S, Tarkkanen J, Volin L, Hedman K, Ruutu T. Retrospective evaluation of serum Epstein Barr virus DNA levels in 406 allogeneic stem cell transplant patients. *Haematologica* 2007;92:819–25.
- [12] Wagner HJ, Cheng YC, Huls MH, et al. Prompt versus preemptive intervention for EBV lymphoproliferative disease. *Blood* 2004;103:3979–81.
- [13] Gartner BC, Fischinger J, Schafer H, Einsele H, Roemer K, Muller-Lantzsch N. Epstein-Barr viral load as a tool to diagnose and monitor post-transplant lymphoproliferative disease. *Recent Results Cancer Res* 2002;159:49–54.
- [14] Meij P, van Esser JW, Niesters HG, et al. Impaired recovery of Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8+ T lymphocytes after partially T-depleted allogeneic stem cell transplantation may identify patients at very high risk for progressive EBV reactivation and lymphoproliferative disease. *Blood* 2003;101:4290–7.
- [15] Lucas KG, Small TN, Heller G, Dupont B, O'Reilly RJ. The development of cellular immunity to Epstein-Barr virus after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87:2594–603.
- [16] Cavazzana-Calvo M, Bensussan D, Jabado N, et al. Prevention of EBV-induced B-lymphoproliferative disorder by ex vivo marrow B-cell depletion in HLA-phenotypical or non-identical T-depleted bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1998;103:543–51.
- [17] Papadopoulos EB, Ladanyi M, Emanuel D, et al. Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994;330:1185–91.
- [18] Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK. EBV specific CTL: a model for immune therapy. *Vox Sang* 1998;74:497–8 Suppl 2.
- [19] Haque T, Wilkie GM, Jones MM, et al. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* 2007;110:1123–31.
- [20] Gustafsson A, Levitsky V, Zou JZ, et al. Epstein-Barr virus (EBV) load in bone marrow transplant recipients at risk to develop posttransplant lymphoproliferative disease: prophylactic infusion of EBV-specific cytotoxic T cells. *Blood* 2000;95:807–14.
- [21] Kuehnle I, Huls MH, Liu Z, et al. CD20 monoclonal antibody (rituximab) for therapy of Epstein-Barr virus lymphoma after hemopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2000;95:1502–5.
- [22] Annels NE, Kalpoe JS, Bredius RG, et al. Management of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation after allogeneic stem cell transplantation by simultaneous analysis of EBV DNA load and EBV-specific T cell reconstitution. *Clin Infect Dis* 2006;42:1743–8.
- [23] Clave E, Agbalika F, Bajzik V, et al. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation in allogeneic stem-cell transplantation: relationship between viral load, EBV-specific T-cell reconstitution and rituximab therapy. *Transplantation* 2004;77:76–84.
- [24] Gottschalk S, Heslop HE, Rooney CM. Adoptive immunotherapy for EBV-associated malignancies. *Leuk Lymphoma* 2005;46:1–10.
- [25] Bordignon P, Faure G, Bene MC, et al. Improvement of cellular immunity and IgA production in immunodeficient children after treatment with synthetic serum thymic factor (FTS). *Lancet* 1982;2:293–7.
- [26] Aissi-Rothe L, Decot V, Venard V, et al. Rapid generation of full clinical-grade human antiadenovirus cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother* 2010;33:414–24.
- [27] Comin-Anduix B, Gualberto A, Glaspy JA, et al. Definition of an immunologic response using the major histocompatibility complex tetramer and enzyme-linked immunospot assays. *Clin Cancer Res* 2006;12:107–16.
- [28] Tan LC, Gudgeon N, Annels NE, et al. A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol* 1999;162:1827–35.
- [29] Kuzushima K, Hayashi N, Kudoh A, et al. Tetramer-assisted identification and characterization of epitopes recognized by HLA A*2402-restricted Epstein-Barr virus-specific CD8+ T cells. *Blood* 2003;101:1460–8.
- [30] Marshall NA, Howe JG, Formica R, et al. Rapid reconstitution of Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2000;96:2814–21.
- [31] Koehne G, Smith KM, Ferguson TL, et al. Quantitation, selection, and functional characterization of Epstein-Barr virus-specific and alloreactive T cells detected by intracellular interferon-gamma production and growth of cytotoxic precursors. *Blood* 2002;99:1730–40.
- [32] Kuzushima K, Hoshino Y, Fujii K, et al. Rapid determination of Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T-cell frequencies by flow cytometry. *Blood* 1999;94:3094–100.
- [33] Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Huls H, et al. Adoptive immunotherapy with allodepleted donor T-cells improves immune reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. *Blood* 2006;108:1797–808.
- [34] Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Yvon E, et al. Selective depletion of donor alloreactive T cells without loss of antiviral or antileukemic responses. *Blood* 2003;102:2292–9.
- [35] Chakrabarti S, Milligan DW, Pillay D, et al. Reconstitution of the Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocyte response following T-cell-depleted myeloablative and nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2003;102:839–42.
- [36] Chen X, Barfield R, Benaim E, et al. Prediction of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients. *Blood* 2005;105:886–93.
- [37] Klenerman P, Hill A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat Immunol* 2005;6:873–9.
- [38] Nazaruk RA, Rochford R, Hobbs MV, Cannon MJ. Functional diversity of the CD8(+) T-cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the pathogenesis of EBV-associated lymphoproliferative disorders. *Blood* 1998;91:3875–83.
- [39] Pantaleo G, Harari A. Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat Rev Immunol* 2006;6:417–23.

- [40] Guerin V, Dalle JH, Pedron B, et al. Cellular immune parameters associated with spontaneous control of CMV in children who underwent transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:442–9.
- [41] Khourouj-Guerin V, Dalle JH, Pedron B, et al. Quantitative and qualitative CD4 T-cell immune responses related to adenovirus DNAemia in hematopoietic-stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;17(4):476–85.
- [42] Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M, et al. Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2001;97:1232–40.
- [43] Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* 2007;25:587–617.
- [44] Masjosthusmann K, Ehlert K, Eing BR, et al. Delay in B-lymphocyte recovery and function following rituximab for EBV-associated lymphoproliferative disease early post-allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2009;43:679–84.

Sélection immunomagnétique des lymphocytes T antiviraux IFN- γ + : ***Analyse quantitative, fonctionnelle et composition en sous-populations lymphocytaires T***

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est un des seuls traitements curatifs des hémopathies bénignes ou malignes et des déficits immunitaires primitifs. Cependant, les infections notamment virales comptent parmi les complications les plus fréquentes des allogreffes associées à la morbidité et la mortalité. Ces infections surviennent souvent en l'absence de reconstitution immunitaire spécifique. Les traitements médicamenteux anti-viraux préconisés présentent une efficacité inconstante dans ce contexte d'immunodéficience et ne sont pas dénués de toxicité. L'alternative thérapeutique prometteuse étudiée à l'heure actuelle est l'immunothérapie adoptive cellulaire notamment celle qui consiste en l'injection de lymphocytes T spécifiques anti-viraux (CTL ou VSTs).

La production de VSTs anti-Adénovirus par technique immunomagnétique a été développée au sein de l'équipe depuis 2007 et un protocole clinique a été initié en 2012 et est actuellement en cours. C'est dans la continuité de ces travaux sur l'Adénovirus, que nous avons souhaité développer une immunothérapie adoptive anti-EBV. Dans cette optique, il est au préalable nécessaire de déterminer un antigène capable d'induire une stimulation optimale des lymphocytes T spécifiques quel que soit le contexte HLA du donneur pour permettre la production de CTL anti-EBV. Nous présentons la validation pré-clinique des VSTs-EBV de grade clinique : 6 productions ont été réalisées avec un antigène synthétique préalablement défini. *In vitro*, ces VSTs-EBV montre une spécificité, une efficacité et une absence de toxicité.

L'efficacité des VSTs résidant dans leur capacité d'expansion *in vivo* en présence du virus, nous avons étudié la composition en sous populations lymphocytaires T en nous intéressant aux sous populations les moins différenciées (notamment les T souches mémoires : T_{SCM}) qui présentent un rôle critique en immunothérapie du fait de leur propriétés d'auto-renouvellement et d'expansion. Nous montrons que la technique immunomagnétique concentre les sous populations les plus différenciées au détriment d'une faible fréquence des sous populations les plus immatures. Enfin, les CTL multivirus commencent à se développer actuellement car elles permettent de traiter plusieurs infections chez les patients immunodéprimés et représentent un avantage en terme de coût. Cependant, aucune étude n'a validé que les propriétés des CTL multivirus vis-à-vis de chaque virus sont équivalentes à celles de CTL monospécifiques correspondantes. Nous avons réalisé cette étude comparative avec les CTL-ADV et -EBV selon les modalités mises au point précédemment et avons pu montrer dans ce modèle des propriétés comparables entre les CTL bispécifiques et mono-spécifiques.

Mot clé : Allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques, Immunothérapie adoptive cellulaire, Infections virales, Lymphocytes T spécifiques anti-viraux (VSTs), sous-population de lymphocyte T, T_{SCM}

Immunomagnetic isolation of antiviral IFN- γ + T lymphocytes : ***Quantitative, functional and T lymphocytes subset composition analysis***

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the standard treatment for malignant or non-malignant hematological disorders or primary immunodeficiencies. However, microbiological infections especially viral infections are one of the major causes of morbidity and mortality after HSCT.

These infections arise in the absence of immune reconstitution, context where antiviral treatment efficacy is impaired while toxicity can occur. An alternative treatment is adoptive cellular immunotherapy by infusion of virus specific T cells (VSTs) which have demonstrated their effectiveness in virus infection control after HSCT.

VSTs against Adenovirus have been previously generated in our team according to Good Manufacturing Practice using an immunomagnetic selection based on IFN- γ secretion and a clinic trial is underway. In this work, we aimed to define optimal conditions to produce VSTs against Epstein Barr Virus (EBV). We performed an *in vitro* pre-clinical study on 6 donors with a good cellular immune response against EBV. We obtained VSTs with a high specificity, a good efficiency controlled by a cytotoxicity assay and absence of toxicity with a weak residual alloreactivity.

Efficacy of IFN- γ sorted VSTs is due to their dramatic expansion capacity *in vivo* in presence of virus load. Several subsets of T lymphocytes have been described and expansion capacity has been reported mainly in the less differentiated stages. We aimed to analyze the distribution of VSTs sub-populations, focusing on the recently described Stem cell like memory T cells (T_{SCM}), in healthy humans, in IFN- γ sorted VSTs and after *in vitro* expansion. In this study, we report that healthy donors present with a panel of heterogeneous VSTs, while the IFN- γ based immunomagnetic selection system sorts the most differentiated sub-populations. This was probably because of the low intensity of IFN- γ secretion mainly against viruses generating a mild T cell response such as ADV.

Finally, according to our experience to produce anti-ADV and anti-EBV VSTs, we developed the bispecific VST production. Besides economic advantages, bispecific CTL can be useful in immunocompromised patients after HSCT who are highly susceptible to infections.

Also To our knowledge, no study has compared the properties of bispecific VSTs with their related mono-specific VSTs, although competition between stimulating antigens had been previously described. We present our results obtained on 3 different donors and report comparable properties between mono- and bispecific VSTs.

Key words: Hematopoietic stem cell transplantation, Cellular immunotherapy, Viral infections, Virus specific T cells (VSTs), T cell subsets, T_{SCM}