

UNIVERSITE DE LILLE 2  
Faculté de Médecine et CHU de Lille  
(Dérégulation de l'Homéostasie Lymphocytaire, EA2686, IFR114)

**Année 2013**

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**THESE**  
Pour l'Obtention du Grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 2**  
**SPECIALITE : HEMATOLOGIE - TRANSFUSION**

Présentée publiquement le 29 novembre 2013 par

Bachra CHOUI  
Née le 16 juin 1962

**Titre**

**Effacité et Innocuité d'une Déplétion Partielle et Sélective des Greffons de  
Cellules Souches Hématopoïétiques : Etude de l'Alloréactivité, et des  
réponses antiinfectieuses et anti-tumorales des Sous-Populations  
Lymphocytaires T4 Naïves et Mémoires**

**Jury**

Pr Mauricette Michallet  
Pr Kaïss Lassouad  
Pr Myriam Labalette  
Pr Ibrahim Yakoub-Agha

Rapporteur  
Rapporteur  
Membre examinateur  
Directeur de thèse

## REMERCIEMENTS

**Mon directeur de thèse le Pr Yakoub- Agha Ibrahim,**

*Je tiens à te remercier en tout premier lieu, toi qui a dirigé cette thèse, tout au long de ces trois années, et qui a su orienter cette recherche et aux bons moments. Tu m'as fait découvrir le versant fondamental de la GVH et particulièrement l'implication des différentes sous populations lymphocytaires dans la GVH. Malgré tes lourdes responsabilités notamment depuis ton élection à la présidence de la SFGMTC, tu as toujours été disponible pour d'intenses et rationnelles discussions. Pour tout cela, je te remercie vivement de m'avoir très fortement soutenu et impliqué dans ce projet très passionnant.*

**Madame le Pr Myriam Labalette,**

*Merci de m'avoir acceptée dans ton laboratoire, de m'avoir impliquée dans ce passionnant projet et d'avoir consacré plusieurs heures de ton temps à la discussion, à la mise au point des manip et notamment pour ma préparation à la soutenance*

**Mr le Pr Dessaint et le Pr Prin,**

*Vous m'avez fait confiance sachant ma lourde tâche, vu le poste que j'occupe au centre hospitalier de Boulogne. Vous m'avez autorisée à m'inscrire à l'école doctorale, je vous en serai très profondément et infiniment reconnaissante.*

*Le Pr Bruno Quesnel, pour ton aide scientifique notamment dans la partie anti-tumorale.*

**Mes rapporteurs le Pr Lassoued Kaiss et Mauricette Michallalet,**

*Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez apporté à mon travail, la rapidité avec laquelle vous avez lu mon manuscrit, de l'avoir commenté et corrigé, merci d'avoir fait le déplacement jusqu'à Lille.*

**La qualité et la continuité des données présentées ici sont aussi le fruit d'un travail d'équipe sur le terrain pour cela :**

*Je voudrai remercier également Jacques Trauet, technicien chercheur qui a joué un rôle fondamental dans cette thèse et accepté de m'aider dans toute sa partie expérimentale, mon éloignement du laboratoire a été largement couvert par ta présence continue, je te remercie tout spécialement.*

*Je tiens à souligner la présence et l'efficacité de l'équipe du service des maladies du sang chacun son rôle, tout d'abord le Pr Jean Pierre Jouet pour son soutien, Mesdames les secrétaires, notamment Évelyne et la coordinatrice de greffe Anne pour leur accueil et leur disponibilité dont j'ai parfois peut-être abusé.*

**Sans doute le laboratoire d'immunologie a été un cadre privilégié pour effectuer cette thèse, je n'oublierai pas les aides permanentes reçues du personnel, Mesdames et Messieurs les techniciens et secrétaires. Aussi Le docteur Françoise Duffosse qui m'a soutenue tout de même à sa manière. Un grand merci à Guillaume, Sylvain, Thomas, Didier et à Marie-Eve.**

*Je tiens aussi à remercier Mme le docteur F. Boulanger de l'établissement français du sang du nord de France.*

*J'ai eu également le plaisir de collaborer avec le Dr Christophe Roumier du laboratoire d'immunologie CHU de Lille qui a toujours répondu présent.*

*Pour le Centre Hospitalier de Boulogne sur Mer; mes plus vifs remerciements à Mme Paul ex-directeur de notre établissement, Mme Ait Ziane ex-directeur des ressources humaines pour m'avoir fait confiance dans cette aventure ainsi que leur successeurs respectifs Mr Marlier et Mr Druésne. Je tiens aussi à remercier mon confrère le Dr Chochois président de la CME dont le soutien a été infailible.*

*Je tiens à remercier ma propre équipe du service d'Hématologie qui a aussi grandement participé à la réalisation de cette mission, d'abord mes collaborateurs le **Dr voronina, le Dr Kadiata et le Dr Barry**. Aussi Mesdames les secrétaires, **Sylvie, Mme Saint Martin** (secrétaire de direction) et **Catherine**. les cadres du service **Mr Dufour et Mme De la Basserue**, aussi MrBerenger pour son aide à la maîtrise du logiciel « Zotero » .*

*Sans oublier les infatigables **Éric et Didier** pour le soutien logistique et qui ont parfois assuré même mon transport jusqu'au laboratoire au moment de ma fracture du tibia en 2011.*

*Un grand merci, aux **donneurs de CSP**.*

*A mon mari **Lazhar**.*

*A mes deux enfants **Maïfa et Ryan**.*

*A **mes parents** notamment mon père qui m'a inculqué la soif du savoir et l'amour du travail.*

*Mes frères et sœurs particulièrement **Charif**.*

## Résumé

Véritable immunothérapie adoptive, l'allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) est destinée à prévenir la rechute d'une hémopathie maligne grâce au combat immunologique du greffon contre la maladie (effet GVL, *Graft Versus Leukemia*), dans lequel les lymphocytes T apportés par le greffon sont déterminants. Ils peuvent aussi compromettre le résultat escompté, en induisant une réaction du greffon contre l'hôte (GVH, *Graft Versus Host*) qui reste une complication redoutée de l'allogreffe.

Dans une précédente étude prospective portant sur 62 couples donneur/receveur nous avons pu étudier l'impact de la composition du greffon en cellules T de phénotypes naïfs et mémoires sur le devenir des receveurs d'allogreffes à partir d'un donneur HLA-identique apparenté ou non; et nous avons pu démontrer qu'une proportion élevée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> dans le greffon était un facteur de risque de la survenue, la précocité et la sévérité de la GVH aiguë, sans influence sur la GVH chronique ou la rechute. Dans le but de séparer l'effet GVL de la GVH, nous avons voulu à travers les travaux de cette thèse, étudier le concept d'une T déplétion partielle et sélective du greffon en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>.

Nos travaux se sont scindés en trois parties :

1) Au plan clinique, nous avons pu confirmer nos précédents résultats sur une cohorte additionnelle de 137 patients. Non seulement, nous avons confirmé qu'une proportion élevée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> dans le greffon était un facteur de risque de la survenue de la GVH aiguë, mais également, nous avons observé un effet préférentielle de la sous-population naïve des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sur l'incidence de la GVH aiguë. Bien entendu, aucun impact sur l'incidence de la rechute post-allogreffe n'a été enregistré.

2) Dans un modèle expérimental utilisant des cultures lymphocytaires en présence des cellules dendritiques provenant des six couples (frère/sœur) HLA-identiques, nous avons pu démontrer que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs déclenchaient la réponse allogénique la plus importante et avec un degré moindre les cellules mémoires centrales par rapport aux effecteurs mémoires T CD4<sup>+</sup>. Ces résultats non seulement, valident *in vitro* les constatations cliniques mais aussi mettent l'accent sur le rôle prépondérant des lymphocytes T naïfs dans l'alloréactivité, notamment en situation de compatibilité HLA.

3) Nous avons dans la troisième partie pu démontrer qu'une déplétion partielle sélective des greffons en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> n'altère pas les réponses immunologiques secondaires vis-à-vis des virus.

La suite de nos travaux se focalise sur l'effet de la déplétion partielle sélective des greffons en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> sur la réaction anti-tumorale du greffon dans la situation HLA compatibilité chez l'homme.

Nos résultats constituent une pierre angulaire dans le concept de déplétion partielle sélective des greffons en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>, *ex vivo* chez l'homme, en vue de réduire l'incidence de la GVHD sans altérer la réponse anti-infectieuse ou tumorale du greffon notamment chez les donneurs présentant un taux élevé de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs et/ou mémoire centrale .

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

Allo-CSH : Allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques.

CCR : Récepteur des chimiokines à deux cystéines contiguës.

CD : Cellules Dendritiques.

CLP : Compartiment Lymphocytaire Périphérique.

CMV : Cytomegalovirus.

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigène

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques.

CSP : Cellules Souches Périphériques.

EBV : Virus d'Epstein-Barr.

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor.

GVH : Graft-Versus-Host (réaction du Greffon contre l'Hôte).

GVHD : Graft-Versus-Host Disease (maladie de Greffon contre l'Hôte).

GVL : Graft-Versus-Leukemia (réaction du greffon contre la leucémie).

HVG : Host-Versus-Graft (réaction de l'Hôte contre le Greffon).

ICT : irradiation corporelle totale.

IFN- $\gamma$  : Interféron-Gamma.

IL- : Interleukine-.

LAL ; Leucémie Aiguë Lymphoblastique.

LAM : Leucémie Aiguë Myéloblastique.

MLR : Réaction mixte lymphocytaire (mixed lymphocytes reaction)

mHA : Antigènes mineurs d'histocompatibilité

MO : Moelle Osseuse.

T<sub>CM</sub>: T cell Central Memory.

T<sub>EM</sub>: T cell Effector Memory.

T<sub>TD</sub>: T cell Effector Terminally differentiated.

# Table de matières

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>9</b>
<b>A)- GVH ET GVL : MEME REACTION MAIS DIFFERENTS TISSUS CIBLES.</b> .....	<b>11</b>
Dommage tissulaire lié au conditionnement .....	12
Activation des lymphocytes-T du donneur.....	13
Attaque des tissus cibles .....	14
2) L'EFFET DU GREFFON CONTRE LA MALADIE MALIGNE (GVL) :.....	16
3) INTERACTIONS ENTRE GVL ET GVH :.....	18
<b>B) ROLES DES LYMPHOCYTES T NAÏFS ET MEMOIRES EN ALLO-CSH</b> .....	<b>20</b>
1) IMMUNITE HETEROLOGUE .....	20
2) HETEROGENEITE PHENOTYPIQUE ET FONCTIONNELLE DES LYMPHOCYTES T CD4 <sup>+</sup> ET CD8 <sup>+</sup> DU COMPARTIMENT LYMPHOÏDE PERIPHERIQUE (CLP):.....	22
Répartition, migration et fonction de la population T .....	22
Coopération ly T / CD et polarisation de la réponse immunitaire.....	28
3) LES LYMPHOCYTES T NAÏFS ET T <sub>CM</sub> SONT LES PRINCIPAUX RESPONSABLES DE L'INDUCTION D'UNE GVH EXPERIMENTALE. ....	31
4) LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE POST ALLOGREFFE.....	32
5) LA PROBLEMATIQUE « VALEURS ABSOLUES ET RATIOS » DES SOUS POPULATION T ET GVHD .....	34
<b>C) AXES DE RECHERCHE DANS NOTRE LABORATOIRE :</b> .....	<b>35</b>
<b>TRAVAUX PERSONNELS</b> .....	<b>38</b>
<b>A) IMPACT DE LA COMPOSITION DU GREFFON SUR LE DEVENIR DE L'ALLOGREFFE (COHORTE DE CONFIRMATION.</b> .....	<b>39</b>
1) CRITERES D'INCLUSION / EXCLUSION .....	39
Donneurs .....	39
Receveurs .....	40
2) SUIVI CLINIQUE .....	40
3) SUIVI BIOLOGIQUE DE ROUTINE .....	41
4) CALENDRIER DU SUIVI IMMUNOLOGIQUE .....	41
5) ETUDE IMMUNOLOGIQUE .....	41
6) CHOIX DES MARQUEURS :.....	41
7) MANUSCRIT #1 .....	42
<b>B) L'ALLOREACTIVITE PROPRE DE CHAQUE SOUS-POPULATION LYMPHOCYTAIRE T IN VITRO DANS UNE SITUATION DE COMPATIBILITE HLA</b> .....	<b>56</b>
1) JUSTIFICATION DE L'ETUDE :.....	56
<b>2) MANUSCRIT #2</b> .....	<b>59</b>
3) INTERPRETATION .....	77
<b>C) MAINTIEN DE LA REPOSE ANTIVIRALE APRES DEPLETION PARTIELLE ET SELECTIVE DES LYMPHOCYTES T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup></b> .....	<b>77</b>
1) JUSTIFICATION DE L'ETUDE.....	77
2) MANUSCRIT #3 .....	79
3) INTERPRETATION DES RESULTATS.....	100
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>101</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>104</b>

# **INTRODUCTION**

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-CSH) peut être le seul traitement curatif pour un certain nombre de maladies hématologiques malignes. Cette technique a été introduite de façon régulière à partir des années 80 dans l'arsenal thérapeutique hématologique et dont le but est d'assurer la reconstitution hématopoïétique après traitement intensif et potentiellement myéloablatif d'une maladie maligne et plus rarement pour corriger un déficit constitutionnel ou acquis du tissu hématopoïétique : aplasies médullaires, déficits immunitaires combinés sévères, certaines hémoglobinopathies notamment et surtout, de réaliser une véritable immunothérapie adoptive responsable d'un effet anti-tumoral<sup>1 2 3 4</sup> C'est G. Mathé en 1965 qui a introduit le concept d'immunothérapie adoptive.<sup>5</sup> En 1990, Horowitz et al. ont apporté, dans une étude du registre international (IBMTR) incluant un nombre important de malades, la confirmation de l'effet du greffon contre la leucémie (GVL) en montrant un taux de rechute plus élevé chez les patients allogreffés à partir d'un donneur syngénique ou d'un greffon T-déplété<sup>2</sup>

La moelle osseuse (MO), siège de l'hématopoïèse, s'est imposée, initialement, comme source logique de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Néanmoins, et depuis les années 90, deux autres sources de CSH peuvent être utilisées : d'une part, le prélèvement des cellules souches périphériques (CSP) après mobilisation préalable de celles-ci par un facteur de croissance hématopoïétique, généralement le G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), et d'autre part, le sang placentaire.<sup>6</sup>

Le donneur sélectionné est le plus souvent un membre de la fratrie HLA (human leucocyte antigen) compatible. Toutefois, en l'absence de donneur familial, la greffe peut être effectuée à partir de CSH d'un donneur non apparenté HLA-compatible. La compatibilité HLA est souvent appréciée, tout au moins en France, par le typage en biologie moléculaire des allèles A, B, Cw de classe I et DRB1, DQB1 de classe II<sup>7</sup> Lorsque l'identité HLA entre donneur et receveur n'est pas parfaite, on parle de « greffe mismatch ». Mis à part le cas de greffe syngénique, il existe toujours une différence d'histocompatibilité entre le donneur et le receveur HLA-compatible, due aux antigènes mineurs d'histocompatibilité (mHA). Ce sont des peptides issus de protéines cellulaires polymorphiques<sup>8</sup> qui sont codés par des gènes dotés d'une variabilité allélique situés à l'extérieur du complexe majeur d'histocompatibilité. Ils sont présentés par les molécules HLA de classe I ou II<sup>9 10 11</sup> de manière directe par les Cellules Présentatrices d'Antigène (CPA) du receveur ou indirecte (captées et présentées par



les CPA dérivées des CSH greffées)<sup>12</sup> A noter que l'expression de ces antigènes mineurs diffère d'un tissu à l'autre et peut être restreinte. Certains sont normalement exprimés exclusivement sur les cellules hématopoïétiques.<sup>13</sup> Les différences antigéniques entre donneur et receveur concernant éventuellement les antigènes majeurs et/ou antigènes mineurs sont responsables des réactions allogéniques post-greffe.

Le greffon apporte en effet non seulement des cellules souches hématopoïétiques, mais aussi des cellules différenciées (notamment lymphocytes T, B naïfs et mémoires et cellules NK...). Outre la prévention du rejet du greffon (HVG : Host-Versus-Graft) par le système immunitaire résiduel du receveur et la reconstitution de son système immunitaire détruit par le conditionnement, ces cellules participent directement à deux réactions immunologiques distinctes : L'une est souvent délétère, la maladie du greffon contre l'hôte (GVH : Graft Versus Host) et l'autre dite « bénéfique » (GVL : Graft-Versus-leukemia) constitue le principal objectif de l'allo-CSH qu'est l'élimination des cellules tumorales résiduelles. Outre le type de greffon (MO versus CSP) et son contenu en lymphocytes T, la déplétion lymphocytaire du receveur induite par le conditionnement et les stimulations antigéniques post-greffe (tumeur, infections..) jouent un rôle important dans la nature et l'intensité de ces réactions.

## **A)- GVH et GVL : Même réaction mais différents tissus cibles.**

### **1) La réaction du greffon contre l'hôte (GVH) :**

C'est une des complications majeures de l'Allo-CSH, responsable d'une morbidité et d'une mortalité très importantes<sup>3</sup> La GVH peut se présenter sur un mode aigu, classiquement dans les quatre premiers mois qui suivent la greffe, avec des manifestations cutanées, hépatiques ou digestives prédominantes. Elle peut également survenir plus tardivement (GVH chronique) soit après une GVH aiguë soit *de novo*. Ses manifestations sont alors très variées, donnant des tableaux cliniques qui pourraient évoquer des pathologies auto-immunes.

La physiopathologie de la GVH aiguë peut être divisée en trois phases successives : (figure 1)

## **Domage tissulaire lié au conditionnement**

Le dommage tissulaire est le catalyseur nécessaire au développement d'une GVH rapide. Le dommage a lieu souvent avant le transfert des cellules allogéniques (greffe). La pathologie maligne sous-jacente, les effets des traitements préalables et le conditionnement sont responsables d'une sécrétion importante de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires conduisant, notamment, à une activation précoce des CPA de l'hôte<sup>14 15</sup> Cette inflammation tissulaire entraîne l'activation des CPA et leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires.

L'identité et la localisation des CPA responsables de l'induction d'une GVH ont fait l'objet de beaucoup de travaux. La famille des CPA comporte plusieurs types cellulaires notamment les cellules dendritiques (CDs), les monocytes/macrophages et les lymphocytes B. Le rôle respectif de ces différentes cellules dans le déclenchement de la GVH aiguë est difficile à établir. Un certain nombre d'arguments laissent supposer que les CD résiduelles de l'hôte jouent un rôle important dans l'induction de la GVH aiguë<sup>15 16</sup> En effet, les CDs tissulaires ne se divisent pas fréquemment, et résistent donc au conditionnement subi par le receveur. Des CDs spécifiques de tissus telles que les cellules de Langerhans joueraient un rôle dans l'initiation de la GVH spécifique d'organe. Dans un modèle murin, la déplétion en cellules de Langerhans de l'hôte avant la réinjection des lymphocytes allogéniques prévient la survenue d'une GVH cutanée<sup>17</sup>

Bien que les CPA résiduelles du receveur soient indispensables et suffisantes pour l'induction d'une GVH aiguë<sup>18</sup>. cette dernière, une fois initiée, peut être amplifiée et entretenue par des CPA dérivées des CSH du donneur<sup>19 20</sup>. En effet, la durée de vie des CDs varie entre une et plusieurs semaines selon le tissu et l'origine des CDs. De plus, les lymphocytes activés du donneur vont détruire les CDs de l'hôte conduisant au remplacement de celles-ci par les CDs de type donneur<sup>17</sup>. Le renouvellement des CDs sanguines se fait conjointement avec la repopulation myéloïde<sup>21 22</sup> et, pour les CDs cutanées, un chimérisme quasi-complet de type donneur est obtenu durant le 2<sup>ème</sup> mois en cas de conditionnement myéloablatif, le 4<sup>ème</sup> mois en cas de conditionnement atténué<sup>23 24</sup>.

## Activation des lymphocytes-T du donneur

Des données récentes ont montré le rôle important des lymphocytes T du donneur dans le déclenchement de la GVH aiguë.

Alors que l'incompatibilité HLA donneur/receveur de classe I ou de classe II stimule les réponses T CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>, le rôle respectif de chacune des deux populations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans l'induction d'une GVH aiguë est moins clair en cas de greffe HLA compatible notamment génoïdétique.

Chez l'homme, les déplétions sélectives en cellules T CD8<sup>+</sup> des greffons médullaires entraînent une réduction significative de l'incidence et de la sévérité des GVH aiguës<sup>25</sup>. Par contre, l'élimination de cette population cellulaire semble entraver la prise de greffe<sup>26</sup>. De plus, il semblerait exister une corrélation entre le nombre de cellules T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> greffées et l'incidence de la GVH aiguë<sup>27</sup>. De même, après un conditionnement d'intensité réduite, on a pu observer une corrélation entre la dose de lymphocytes CD8<sup>+</sup> greffés et l'incidence de la GVH aiguë<sup>28 29</sup>. Après conditionnement myéloablatif, par contre, la dose de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> administrés n'influence pas la survenue de GVH aiguë ou chronique.

Ces discordances peuvent s'expliquer par la faible quantité de lymphocytes T alloréactifs nécessaires à l'induction d'une GVH ( $1 \times 10^5$  lymphocytes T /kg en l'absence de disparité HLA<sup>30</sup> et  $1 \times 10^4$  lymphocytes T /kg en cas de greffe mismatch<sup>31</sup>). Même en considérant que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont les effecteurs principaux de la GVH, leur différenciation requiert une coopération avec les lymphocytes T CD4<sup>+</sup><sup>32 33</sup>, qui renferment à l'état basal la majorité des cellules alloréactives<sup>34</sup>. Ainsi, l'élimination préalable des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques des antigènes mineurs immunodominants n'empêche pas le développement d'une GVH ciblée sur d'autres alloantigènes<sup>35</sup>.

Les études dynamiques du trafic cellulaire ont mis en évidence la migration des lymphocytes T du donneur dans les organes lymphoïdes secondaires avant le déclenchement de la GVH.<sup>36 37</sup>; Bien que les plaques de Peyer aient toujours été considérées comme un site privilégié de l'activation des lymphocytes T du donneur dans le déclenchement d'une GVH aiguë, des études récentes ont montré que l'induction d'une GVH létale peut être déclenchée après un conditionnement myéloablatif même en l'absence de plaques de Peyer<sup>38</sup>.

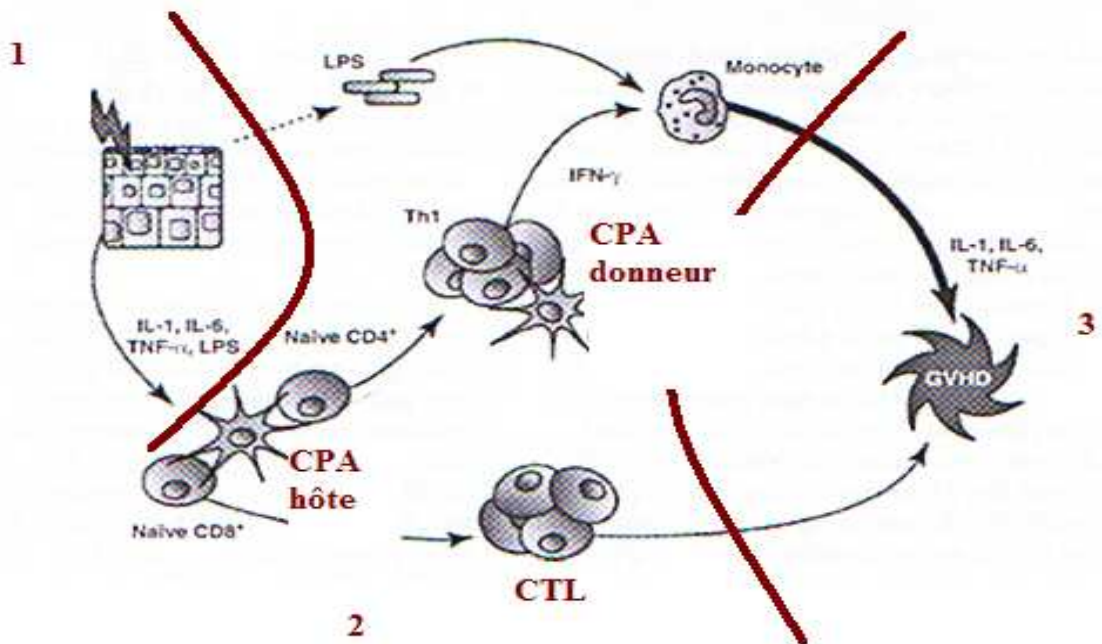
Le rôle crucial des organes lymphoïdes secondaires dans l'initiation de la réponse allogénique est démontré expérimentalement chez les animaux dont les récepteurs de domiciliation ont été bloqués<sup>39 40</sup>, ou recevant des antagonistes ou des anticorps anti-récepteur<sup>41 42 43 44</sup>.

### **Attaque des tissus cibles**

La phase finale de la GVH est caractérisée par l'agression des tissus cibles. Cette agression est induite directement par les effecteurs cytotoxiques (lymphocytes T cytotoxiques et cellules NK)<sup>45</sup> et indirectement par l'orage cytokinique. Les cytokines jouent un rôle important dans le dommage tissulaire, et permettent d'exercer des effets collatéraux sur des cibles n'exprimant pas l'alloantigène<sup>46</sup>. La polarisation du lymphocytes T effecteurs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de type Th1 et Tc1 semble jouer un rôle prédominant mais, particulièrement dans la GVH chronique, la polarisation Th2/Tc2 contribue également à la pathogenèse<sup>47 48 49</sup>

Le contrôle de l'alloréactivité post-greffe reflète donc un ensemble d'interactions entre le système immunitaire inné et l'immunité adaptative grâce aux cellules du greffon. Les cellules natural killer T (NKT), natural killer (NK), lymphocytes T régulateurs, lymphocytes T  $\gamma\delta$ , les CPA régulatrices et les cellules mésenchymateuses participent à des degrés divers au développement de la GVH, mais les expériences de déplétion montrent que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> alloréactifs activés dans les organes lymphoïdes secondaires ont un rôle déterminant dans la genèse de la GVH.<sup>50</sup>

Alors que la physiopathologie de la GVH aiguë paraît relativement claire, celle de la GVH chronique reste très mal connue. La survenue plus tardive de la GVH chronique et les manifestations cliniques différentes de celles de la GVH aiguë laissent à penser que la GVH chronique répond à d'autres mécanismes et schémas d'activation lymphocytaire T et B entraînant des manifestations d'auto-immunité<sup>48</sup>. Récemment, la détérioration dans la fonction de sélection négative thymique a été évoquée comme mécanisme probable de la GVH chronique<sup>51</sup>.



Modifié d'après, ES Morris and GR Hill, *British journal of haematology*, 2007.<sup>50</sup>

(1) Lorage cytokinique induit par le conditionnement entrainant l'activation des CPA, (2) représente l'étape d'activation lymphocytaire dans les organes lymphoïdes secondaires de voisinage et (3) représentent la destruction des tissus cibles.

**Figure 1.** Physiopathologie simplifiée de la réaction aiguë du greffon contre l'hôte (GVH).

Etape 1- dommage tissulaire attribuable, tout au moins dans les allo-SCH à conditionnement myéloablatif, à la maladie sous-jacente, aux traitements antérieurs et au conditionnement, conduisant à la génération d'une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1, IL-6...) qui, à leur tour, stimulent l'activation des CPA de l'hôte. La translocation à travers la paroi intestinale endommagée des lipopolysaccarides (LPS) et autres produits bactériens va stimuler le système immunitaire inné et accroître la cascade des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires.

Etape 2- les lymphocytes T du donneur après migration dans les organes lymphoïdes secondaires sont stimulés par les CPA résiduelles de l'hôte générant des puissants lymphocytes T cytotoxiques (CTL) ( $CD8^+$  mais aussi  $CD4^+$ ). Les lymphocytes T du donneur sont également différenciés vers une polarisation Th1 et Tc1 avec production des cytokines (notamment l'interféron- $\gamma$ ,  $IFN-\gamma$ ) responsables de l'activation des monocytes/macrophages. Après la disparition des CPA de l'hôte, les CPA dérivées des CSH greffées entretiendront la réponse allogénique.

Etape 3- attaque des tissus cibles du receveur directement par les CTL (voie cytotoxique directe) et indirectement par les cytokines (voie des cytokines pro-inflammatoires).

## 2) L'effet du greffon contre la maladie maligne (GVL) :

Sans méconnaître la contribution des lymphocytes B, des cellules NK et autres effecteurs, l'effet anti-tumoral du greffon peut être expliqué par la reconnaissance de la tumeur par les lymphocytes T du donneur. Le rôle des Lymphocytes T a pu être démontré par transfert adoptif des clones anti-leucémiques<sup>52 53</sup>. Un mécanisme de reconnaissance direct semble impliqué.

Différents types d'antigènes peuvent être des cibles des effecteurs de la GVL tels que les mHA d'expression restreinte sur les cellules hématopoïétiques en particulier HA-1 et HA-2<sup>53 54 55 56</sup>, BCL2A1<sup>57</sup> et HB-1<sup>58</sup> ou des antigènes associés à la tumeur (TAA) ou surexprimés par celle-ci (ex : protéinase 3 des LAM et LMC,<sup>59</sup> idiotypes du myélome).

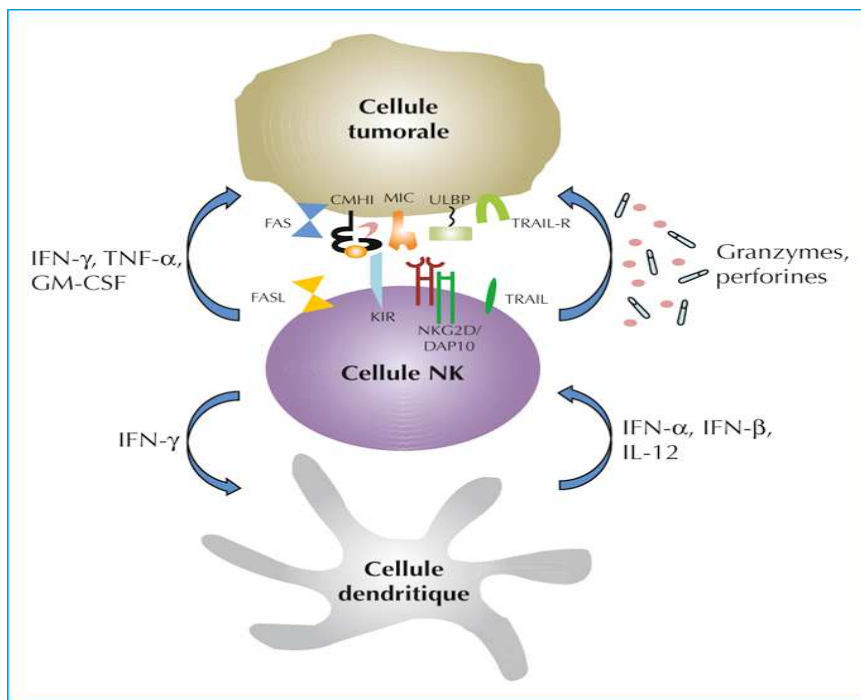
A côté des réponses cytotoxiques T CD8<sup>+</sup> vis-à-vis des mHA et TAA, des réponses dépendantes des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont également impliquées dans la genèse de l'effet GVL<sup>60</sup>. Alors que certains mHA sont restreints aux molécules HLA de classe I (cibles de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>), d'autres sont restreints aux molécules HLA de classe II (cibles des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>)<sup>9 61</sup>. Les plus connus sont les mHA localisés au chromosome Y (HY) apportant une explication probable à l'effet GVL observé au décours des greffes dites « sex-mismatch ». L'impact de la différence de sexe entre donneur et receveur a été démontré chez des patients de sexe masculin ayant reçu une allogreffe à partir d'un donneur de sexe féminin<sup>55 62 63 64</sup>. Par ailleurs, l'intérêt des mHA restreints aux molécules HLA de classe II réside dans la coopération cellulaire<sup>33</sup> entre lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (inducteur/helper) et CD8<sup>+</sup> (effecteur), une CPA présentant les deux types de mHA assurant l'appariement des 2 types de lymphocytes T<sup>65</sup>.

Il est actuellement bien établi que les cellules NK possèdent la capacité singulière d'exercer un effet GVL sans GVHD via leurs récepteurs appelés « killer Cell Immunoglobulin-like Receptors » ou KIR<sup>66</sup>. Le mécanisme de reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK s'effectue soit via les récepteurs inhibiteurs (KIR) ou des récepteurs activateurs tels que le « NKG2D » ligand pour les molécules HLA classe I ou des molécules de stress exprimées par les cellules infectées ou bien par les cellules tumorales (Fig 2)

En situation d'allogreffe haplo-identique, le rôle potentiel anti-tumoral des cellules NK, est actuellement bien démontré<sup>67</sup>. Les molécules HLA exprimées chez le receveur et

absentes chez le donneur constituent le ligand KIRs, cible de l'effet GVL notamment dans les leucémies aigues myéloblastiques allogreffées en situation haplo-identique avec mismatch HLA-C group 2<sup>68</sup>. En effet l'incompatibilité entre le récepteur KIRs et les molécules CMH classe I semble jouer un rôle déterminant dans l'allogreffe comme l'illustre une nette diminution du taux de rechute des leucémies aiguës myéloblastiques,<sup>69</sup> cependant non confirmé dans les leucémies aigues lymphoblastiques (LAL).

L'analyse de 2 grands registres<sup>70, 71</sup> ont montré que la présence d'un KIR plus actif chez le donneur est associée à une amélioration de la survie sans progression et une baisse du taux de rechute. Afin d'optimiser l'effet GVL des protocoles sont en cours consultable sur : [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) permettant de tester la potentialisation des cellules NK par l'administration d'IL15 ou par une combinaison optimale entre le génotype KIR et le génotype HLA.



**Figure 2:** Mécanismes d'action des cellules Natural Killers (NK) sur les cellules tumorales (Tougeron et al **Bulletin du Cancer, 2013, 100, 283-94**). Les cellules NK expriment des récepteurs inhibiteurs (KIR) et des récepteurs activateurs (NKG2D) qui lient les molécules du CMH de classe I et différentes molécules de stress exprimées par les cellules infectées ou par les cellules malignes. Si l'équilibre est en faveur des KIR celui-ci conduit à l'activation des cellules NK et la lyse de la cible via divers mécanismes : le système perforine granzyme, les voies Fas/FasL, TRAIL/TRAIL-R, IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ .  
 KIR : killer cell immunoglobulin-like receptor ; IFN : interferon ; TNF- $\alpha$  : tumour necrosis factor-alpha ; GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; TRAIL-R : TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor ; CMH : complexe majeur d'histocompatibilité.

### 3) Interactions entre GVL et GVH :

Weiden et al. ont observé, dans une étude réalisée en 1979, un taux de rechute moindre chez les patients allogreffés pour une leucémie aiguë ayant présenté une GVH<sup>4</sup>. Un effet protecteur de la GVH, qu'elle soit aiguë ou chronique, contre la rechute a été également observé dans d'autres études<sup>1 3 4</sup>.

Toutes ces réactions immunologiques (GVL et GVH) impliquent les lymphocytes T du donneur et sont apparemment interdépendantes de telle sorte que toute manipulation du greffon visant à modifier l'intensité de l'une d'entre elles conduira inévitablement à modifier l'intensité de l'autre. A titre d'exemple, la déplétion ex-vivo du greffon en cellules-T peut atténuer, voire prévenir, la GVH mais, en même temps, provoquera un retard dans la reconstitution immunologique post-greffe responsable d'un taux élevé de rechute et d'infections opportunistes<sup>72</sup>. Dans une étude comparant 35 allogreffes non T-déplétées à 36 greffes T-déplétées, Maraninchi et al. ont retrouvé un taux de rejet de greffon et de rechute de la maladie sous-jacente statistiquement supérieur, mais un taux de GVH aiguë nettement inférieur chez les patients recevant un greffon T-déplété par rapport à ceux recevant un greffon non manipulé<sup>73</sup>.

En 1990, Horowitz et al, ont apporté, dans une étude du registre international (IBMTR) incluant un nombre important de malades, la confirmation de l'effet GVL en montrant un taux de rechute plus élevé chez les patients allogreffés à partir d'un donneur syngénique ou d'un greffon T-déplété<sup>4</sup>. Certaines études suggèrent que la déplétion T du greffon réduise de façon plus marquée la GVH aiguë que la GVH chronique<sup>74 75</sup>.

Bien que la GVH puisse avoir un effet adjuvant sur la GVL,<sup>76</sup> certaines données cliniques et expérimentales laissent à penser que ces deux effets sont médiés par des clones T différents<sup>77 78</sup>.

Plusieurs équipes ont publié des travaux visant à renforcer l'effet GVL par l'utilisation de greffon T-déplété suivie soit par une administration de cellules NK allo-réactives<sup>79 80</sup>, soit par une réinjection de lymphocytes T « allo-restreints » dirigés contre des antigènes mineurs



d'histocompatibilité et dont l'expression serait limitée aux seules cellules hématopoïétiques,<sup>64</sup>  
79 80 81 82. Toutefois, l'orage cytokinique peut induire l'expression des ces antigènes sur  
d'autres cellules que les cellules hématopoïétiques telles que les cellules épithéliales<sup>83 84</sup>, ce  
qui peut expliquer les résultats discordants concernant les alloantigènes HA-1, cibles d'une  
GVL mais aussi d'un effet GVH.<sup>47 55 56 85</sup>

Afin de dissocier l'effet GVL « bénéfique » de la GVH, plusieurs approches ont été  
essayées. Ainsi, l'équipe de Besançon a déjà publié son expérience en testant la T-déplétion  
conditionnelle *in vivo* en présence de GVH.<sup>86</sup> D'autres équipes ont rapporté les résultats d'une  
délétion spécifique *ex vivo* des lymphocytes T alloréactifs dans le cadre des allo-CSH<sup>87</sup> ou  
d'induction d'une anergie<sup>87</sup>.

Les données présentées ci-dessus indiquent que les antigènes impliqués, les clones  
lymphocytaires T et les mécanismes d'induction des réponses effectrices ne sont que  
partiellement communs aux effets GVH et GVL. Des résultats prometteurs d'élimination ou  
d'inactivation des lymphocytes T alloréactifs ont déjà été obtenus. Il apparaît aussi que la  
GVH exerce au minimum un effet adjuvant sur la réponse GVL et qu'une réponse alloréactive  
infraclinique ou cliniquement acceptable et contrôlable peut non seulement favoriser le  
contrôle des cellules leucémiques (qu'elles expriment des alloantigènes ubiquitaires ou  
restreints) mais aussi renforcer l'action des clones spécifiques des antigènes tumoraux par  
l'intermédiaire des cytokines pro-inflammatoires ainsi produites.

Dans l'attente que les procédures d'induction *in vitro* de clones anti-leucémiques non  
alloréactifs ou de déplétion à la demande des réponses indésirables soient disponibles pour un  
usage de routine, on peut se demander comment la composition du greffon non manipulé peut  
influencer l'évolution de la greffe et son effet immunothérapeutique.

## B) Rôles des lymphocytes T naïfs et mémoires en Allo-CSH

### 1) Immunité hétérologue

Les deux populations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> sont très hétérogènes. Si à la naissance la quasi-totalité des lymphocytes T est naïve, très vite en contact des antigènes il y a génération des cellules effectrices et mémoires. Les lymphocytes T effecteurs sont immédiatement actifs et peuvent se disséminer dans les tissus périphériques mais disparaissent en tout ou partie après élimination de l'antigène tandis qu'une population de lymphocytes T mémoire persiste.

A distance d'une infection aiguë, coexistent donc dans le compartiment lymphocytaire périphérique des lymphocytes naïfs T et des lymphocytes T mémoires qui s'accumulent avec l'âge suite aux expositions antigéniques. Le répertoire des sous-populations naïves est extrêmement diversifié (estimé à plus de  $20 \times 10^6$  de spécificités pour les lymphocytes CD4<sup>+</sup> chez l'homme) alors que celui des sous-populations mémoires est évidemment plus limité (environ  $0.1-0.2 \times 10^6$ ).<sup>88</sup>

En absence d'exposition antérieure à des alloantigènes, on s'attend à ce que les sous-populations lymphocytaires T naïves soient responsables de la réponse allogénique, et effectivement on estime que les sujets sains ont au moins  $0.25 \times 10^6$  clones allogéniques distincts<sup>34 89</sup>. Cependant, plusieurs arguments plaident en faveur du rôle des lymphocytes T mémoires dans l'alloréactivité<sup>90</sup> D'une part, on peut détecter des lymphocytes T alloréactifs avec un phénotype « mémoire » chez des sujets non exposés à des alloantigènes<sup>91 92</sup> et d'autre part, certaines observations cliniques soulignent l'influence des expériences immunologiques passées du donneur : le risque de GVH s'accroît avec l'âge du donneur, mais aussi le nombre de grossesses<sup>93</sup> Le chimérisme materno-fœtal peut entretenir les clones mémoires chez la mère,<sup>94</sup> mais aussi immuniser les enfants contre les antigènes non génétiquement hérités de leur mère<sup>95</sup>. L'influence du passé immunologique a pu être démontrée *in vitro* par la mise en évidence d'une réactivité croisée des cellules T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> anti-EBV,<sup>96 97</sup> anti-CMV<sup>98 99</sup> ou anti-HSV<sup>100 101</sup> vis-à-vis de cellules allogéniques et

qui peut caractériser 1 à 10% des clones CD4<sup>+</sup> spécifiques de l'agent infectieux <sup>102</sup>. La survenue de la GVH pourrait donc être favorisée par la réactivité accrue des lymphocytes T éduqués du donneur vis-à-vis des tissus cibles du receveur (immunité hétérologue) d'autant plus que les cellules T mémoires possèdent un seuil d'activation inférieur au seuil d'activation des cellules naïves et une capacité fonctionnelle généralement plus rapide à mettre en œuvre et plus diversifiée

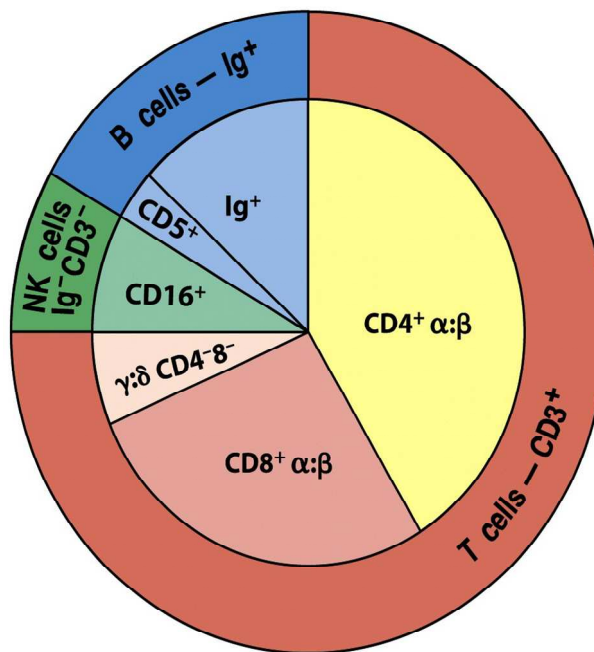
Dans une étude de notre laboratoire, nous avons confirmé l'impact des caractéristiques du donneur (âge, sérologie..) sur la composition du greffon. Bien que le sexe du donneur, le nombre de grossesses, le passé infectieux et la source de CSH conditionnent la composition du greffon, aucun facteur prédictif des proportions des sous-populations lymphocytaires T n'a été retrouvé <sup>103</sup>.

Les réponses allogéniques post-greffe sont donc susceptibles, selon le passé immunologique du donneur, d'impliquer des lymphocytes T naïfs et ou des lymphocytes T mémoires ayant des réactivités croisés avec les alloantigènes de l'hôte. Cette hétérogénéité est encore accrue si l'on prend en compte le fait que l'on définit maintenant plusieurs catégories de cellules T mémoires, caractérisées par leurs profils de marqueurs membranaires, leurs répertoires clonotypiques, leurs aptitudes migratoires, leurs domiciliations et leurs fonctionnalités (production de différentes cytokines et chimiokines ; cytotoxicité immédiate « *ex vivo* » ou seulement après stimulation).

## 2) Hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> du compartiment lymphoïde périphérique (CLP):

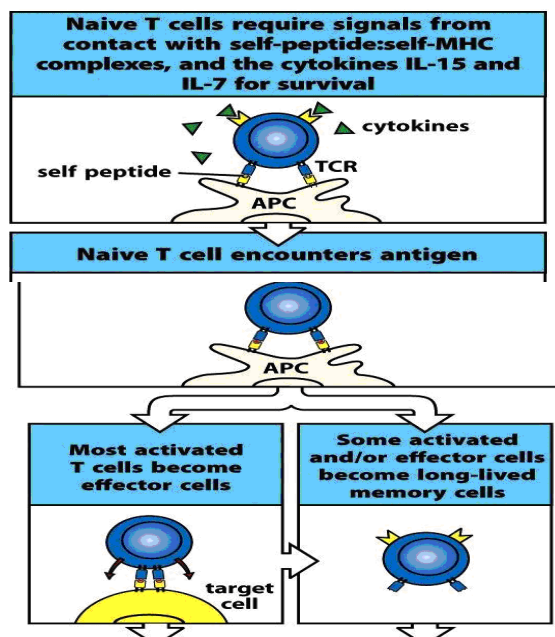
### Répartition, migration et fonction de la population T

Chez un sujet sain, les Ly T (CD3) représentent 60% à 79% de l'ensemble des cellules monocytaires et 80 à 90% de la population lymphocytaire totale avec des variations individuelles notable (Fig 3). Les lymphocytes T passés en périphérie sont soit de phénotype CD4<sup>+</sup>, (2/3), soit CD8<sup>+</sup>, (1/3) expriment pour la majorité d'entre eux le TCR $\alpha\beta$  (>90%); la population CD4-CD8- minoritaire dans le sang circulant (<10%) exprime en grande partie TCR $\gamma\delta$ <sup>104</sup>.



**Figure 3 :** Répartition des différentes sous-populations lymphocytaires. Les Ly T constituent 80 à 90% de la population lymphocytaire. La majorité des TCD4<sup>+</sup> et TCD8<sup>+</sup>, ont un TCR  $\alpha\beta$  et une minorité un TCR $\gamma\delta$ . Cette population est CD4-CD8-. (D'après Immunobiology, 7<sup>ème</sup> édition Galand Science 2008).

Les TNs, à la sortie du thymus expriment faiblement les molécules d'adhésion<sup>105</sup>, ces lymphocytes peuvent être autoréactifs s'ils ont échappé aux processus de sélection négative dans le thymus en interagissant avec les antigènes dont ils sont spécifiques. Ces TNs autoréactives sont éliminés soit par délétion clonale ou rendues anergiques<sup>106 107</sup>. Les lymphocytes survivants exerceront des fonctions effectrices de nature extrêmement diverses, ils se déclinent en différents sous-populations, les Ly T auxiliaires<sup>108</sup> et les Ly T cytotoxiques (CTL) qui exercent leur activité par un mécanisme d'exocytose (système perforine-granzyme) ou par l'intermédiaire de molécules membranaires ou solubles (Trail...) <sup>109</sup>. D'autres cellules exercent une fonction régulatrice visant à contrôler la réponse immunitaire et/ou à prévenir les désordres auto-immuns. Les fonctions régulatrices sont acquises dans le thymus pour les Ly Treg naturels (CD4+, CD25+, Foxp3+) ou sont générés en périphérie pour les T régulateurs induits<sup>110 111</sup>. Le répertoire immunitaire est constamment modifié par l'exposition aux antigènes environnementaux. Chez l'adulte 40 à 50% des LyT périphériques ont un phénotype mémoire généré à partir de TNs dans différentes circonstances: exposition aux Ags bactériens ou viraux, aux transfusions ou encore après transplantation ou suite à une grossesse<sup>112</sup>. L'induction du phénotype mémoire requière l'interaction avec la CPA. Les TNs donnent à la première division un nombre égal de lymphocytes mémoires et de lymphocytes effecteurs (Fig 5).



Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

**Figure 5** La survie des lymphocytes naifs en périphérie est tributaire du contact avec des Ag du soi et de la présence des cytokines IL7 et IL15. Dès leur première rencontre avec un Ag étranger présenté par la CPA le lymphocyte naif donne un nombre égal de lymphocyte mémoires et effecteurs.

(D'après Immunobiology, 7<sup>ème</sup> édition Galand Science 2008).

a) Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> naïfs

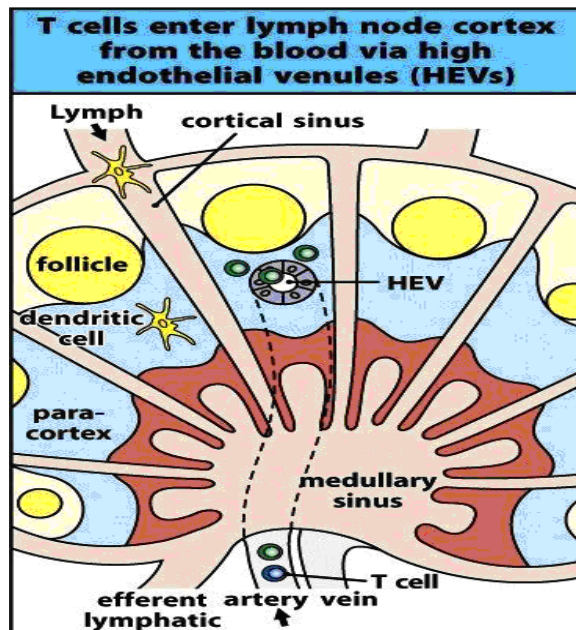
D'un point de vue conceptuel, la définition des lymphocytes T naïfs est claire : il s'agit de lymphocytes T libérés par le thymus, ensemençant le compartiment lymphoïde périphérique et y circulant en permanence dans l'attente d'une stimulation antigénique par des CD matures dans les organes lymphoïdes secondaires. Du point de vue de leur immunophénotype, plutôt, la caractérisation est plus difficile.

On a longtemps cru que les isoformes de haut et de bas poids moléculaire de la tyrosine-phosphatase pan-leucocytaire CD45 (CD45RA/CD45RO chez l'Homme) pouvaient suffire à différencier les lymphocytes T naïfs des lymphocytes T effecteurs et/ou mémoires. En effet, l'activation lymphocytaire déclenche une commutation CD45RA → CD45RO qui survient après la première mitose, signant le passage d'un phénotype naïf à un phénotype "éduqué". La démonstration d'une possibilité de commutation rétrograde CD45RO → CD45RA a bouleversé l'interprétation de beaucoup de résultats acquis<sup>113</sup>. Par conséquent, ni la population CD45RA<sup>+</sup> (qui contient des cellules éduquées rétrocommutées) ni la population CD45RO<sup>+</sup> ne peuvent être totalement assimilées respectivement aux cellules naïves et aux cellules effectrices ou mémoires. Ces observations faites initialement sur la population T CD8<sup>+</sup> ont été étendues à la population CD4<sup>+</sup>, même si le contingent des cellules non naïves CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> y est beaucoup plus réduit.

Il est donc nécessaire d'associer au marqueur CD45RA d'autres marqueurs membranaires, parmi lesquels des récepteurs de domiciliation et des récepteurs de costimulation ont été les plus utilisés<sup>114</sup>.

Reflétant leur domiciliation itérative dans les organes lymphoïdes secondaires, guidées par les molécules d'adhésion et les chimiokines,<sup>115 116</sup> les lymphocytes T naïfs expriment les molécules CD62L et CCR7. La sélectine leucocytaire CD62L (molécule d'adhérence aux glycanes des cellules endothéliales cuboïdes) et le récepteur CCR7 des chimiokines constitutionnelles (CCL19, CCL21) des organes lymphoïdes secondaires figurent parmi les molécules essentielles à la migration trans-endothéliale des cellules T recirculantes au niveau de l'endothélium hautement spécialisées cuboïde appelées (HEV) (High Endothelial Venules) du ganglion<sup>117</sup> (fig 4). Rappelons que le trafic des lymphocytes

T vers les organes lymphoïdes secondaires et la domiciliation semble jouer un rôle déterminant dans l'initiation de la GVH aiguë<sup>36 37</sup> comme dans toute réponse immunitaire primaire.



**Figure 4.** La migration des lymphocytes naïfs vers les tissus lymphoïdes secondaires (OLS), est guidée par les molécules d'adhésion et les chimiokines. Leur accès à l'intérieur des OLS s'effectue au niveau des structures endothéliales hautement spécialisées appelées HEV (High Endothelial Venules). (D'après Immunobiology, 7<sup>ème</sup> édition Galand Science 2008).

Les lymphocytes T naïfs expriment également les molécules de costimulation CD28 et CD27 : le récepteur CD28 a pour ligand les molécules CD80 et CD86 exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigène matures. Lors de la présentation antigénique, cette interaction moléculaire délivre le principal co-signal d'activation lymphocytaire T permettant l'expansion clonale par l'intermédiaire de l'IL-2, la survie cellulaire, et la prévention de l'anergie. Le récepteur CD28 influe directement ou indirectement sur les processus engendrant la mémoire<sup>118 119</sup>. La molécule CD27, membre de la famille des récepteurs au TNF (TNFR7) et interagissant avec son ligand CD70, est également une molécule de costimulation dont le rôle dans la génération des cellules mémoire semble déterminant.<sup>103</sup>

Les travaux de Sallusto<sup>114 120</sup>, de Callan<sup>121</sup> et de Farber<sup>122</sup> indiquent que les lymphocytes T naïfs se définissent par leur coexpression de l'isoforme CD45RA, de CCR7 (et CD62L) et de CD28 (et CD27) en l'absence d'expression de récepteurs de chimiokines inflammatoires tels que CXCR3 ou CCR4.

Chez les sujets sains étudiés à distance de tout épisode infectieux aigu, donc correspondant aux donneurs de CSH, la proportion de lymphocytes CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> naïfs

(CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup>) diminue avec l'âge <sup>123</sup> et leur taux de renouvellement est lent <sup>124</sup>.

b) Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> mémoires

Les travaux récents permettent d'identification au moins de trois sous-populations de cellules non naïves que l'expression de CD28 ou CD27 permet encore de les subdiviser <sup>121</sup>  
<sup>125 126</sup>

**Les cellules T “ mémoire centrale ” (T<sub>CM</sub>)**

Elles se définissent comme CD45RA<sup>neg</sup> CCR7<sup>+</sup>, majoritairement CD62L<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup> et CD28<sup>+</sup>. La présence sur ces cellules éduquées des molécules CCR7 et CD62L leur confère la capacité de retourner dans les organes lymphoïdes secondaires. Dans le compartiment CD4<sup>+</sup>, elles renferment des précurseurs des cellules Th1 et Th2 <sup>117</sup> et leur petit contingent CD28<sup>neg</sup> contient des précurseurs cytotoxiques.<sup>114</sup> Dans le compartiment CD8<sup>+</sup>, ces cellules peuvent exercer des fonctions effectrices immédiates (sécrétion d'IFN-γ et de TNF, présence de perforine).<sup>125 127 126 128</sup>

**Les cellules T “ mémoire effectrice ” (T<sub>EM</sub>) et les cellules T de “différenciation terminale” (T<sub>TD</sub>)**

Elles se caractérisent par l'absence d'expression des récepteurs de domiciliation lymphoïde (CCR7 et CD62L) et renferment une population variable de cellules CD28<sup>neg</sup> ou CD27<sup>neg</sup>. Elles exercent des fonctions effectrices immédiates (production rapide de cytokines, expression de perforine et de granzymes, fonctions cytotoxiques *ex vivo*).

L'absence d'expression de CD28 semble être la signature d'un potentiel cytotoxique <sup>125 129 130</sup> et pour les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, d'une plus grande capacité de production de l'IFN-γ qui est, par contre, produit par les cellules CD28<sup>+</sup> et CD28<sup>neg</sup> dans le cas des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> <sup>121 125 128 131</sup>.

L'expression de CD45RA subdivise ces cellules en effecteurs mémoires CD45RA<sup>neg</sup>, majoritaires dans le compartiment CD4<sup>+</sup> et en cellules T<sub>TD</sub> qui expriment l'immunophénotype CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>neg</sup>/CD62L<sup>neg</sup>/CD28<sup>neg</sup> surtout parmi les cellules T CD8<sup>+</sup> circulantes. Elles correspondent à des cellules d'apparition tardive au cours d'une réponse immunitaire. Elles sont diversement désignées en tant qu'effecteurs persistants,



effecteurs mémoires CD45RA<sup>+</sup> (T<sub>EMRA</sub>) ou effecteurs mémoires en différenciation terminale T<sub>TD</sub>. Leur capacité proliférative résiduelle est diversement appréciée et reste discutée.

Les cellules T mémoires s'opposent donc par leur capacité de domiciliation lymphoïde, la rapidité d'expression de leurs fonctions, mais aussi par leur répertoire (les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> et T<sub>EM</sub> diffèrent par leurs clonotypes<sup>132 133</sup> et leur taux de renouvellement, (les T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> se renouvellent plus lentement que les T<sub>EM</sub> ou T<sub>TD</sub>)<sup>124 133</sup>

La représentation des différentes sous-populations mémoires diffère selon le compartiment CD4<sup>+</sup> où les T<sub>CM</sub> prédominent, ou le compartiment CD8<sup>+</sup> où les cellules T<sub>EM</sub> et T<sub>TD</sub> sont plus abondantes. Ces proportions relatives s'accroissent avec l'âge.<sup>123</sup>

La distribution des lymphocytes T mémoires entre ces différentes sous-populations varie selon la nature de l'agent infectieux, notamment en fonction du type d'antigène, de la charge antigénique et de sa persistance dans l'organisme<sup>134</sup>. Dans le cas des virus du groupe *herpes*, responsables d'infections chroniques susceptibles d'être présents chez les donneurs, le virus EB induit principalement des cellules de type T<sub>EM</sub>, sauf contre son antigène lytique où il s'agit de cellules de type T<sub>TD</sub>. Le CMV induit principalement des cellules mémoires de type T<sub>EM</sub> et T<sub>TD</sub>, CD28<sup>neg</sup> y compris au sein du compartiment CD4<sup>+</sup>.<sup>134 126 128 135 130</sup>

## Coopération Ly T / CD et polarisation de la réponse immunitaire

En dehors de leur rôle sentinelle, les CD jouent le rôle de chef d'orchestre de la réponse immune, contrôlant ainsi son orientation et son devenir. La CD se caractérise par une propriété de plasticité majeure, lui permettant de décoder les signaux micro-environnementaux et de les traduire pour une modulation de la réponse T. En fonction des stimuli reçu, les CD activées sont capables de produire un grand nombre de cytokines comme l'IL-1, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-15, l'IL-16, l'IL-17, le TNF $\alpha$ , l'IFN $\alpha$  et l'IFN $\gamma$ <sup>136</sup>. Dans cette plasticité par ailleurs très complexe, certains facteurs jouent un rôle décisifs tel que certains facteurs qui sont les cytokines pro-inflammatoires et le type d'antigène<sup>137</sup>. Bien que les Ags issus de pathogènes se situent le plus souvent dans les tissus non lymphoïdes, l'initiation des réponses immunitaires T et B a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS)(ganglions lymphatiques, rate, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses)<sup>138</sup>.

Dans les tissus les TNs recirculent dans les zones T. les CD dotés de grandes capacités viennent au contact des TNs avec lesquels ils coopèrent. L'une des signatures de la coopération entre le lymphocyte T et la CD (ou toute autre CPA) est la formation d'une synapse immunologique entre les 2 variétés de cellules (fig 6).<sup>139</sup>

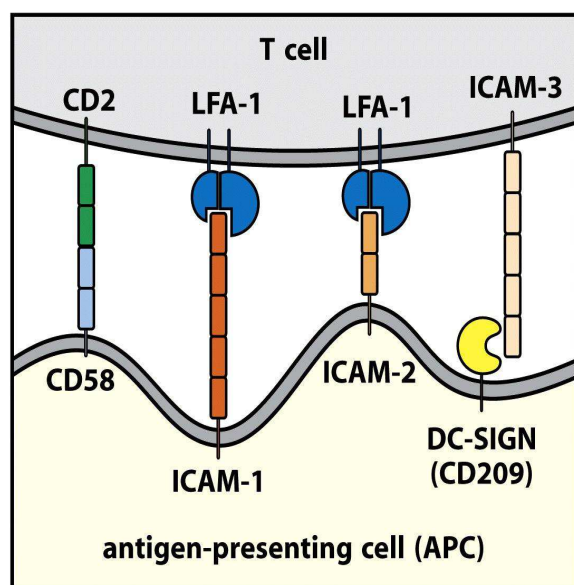
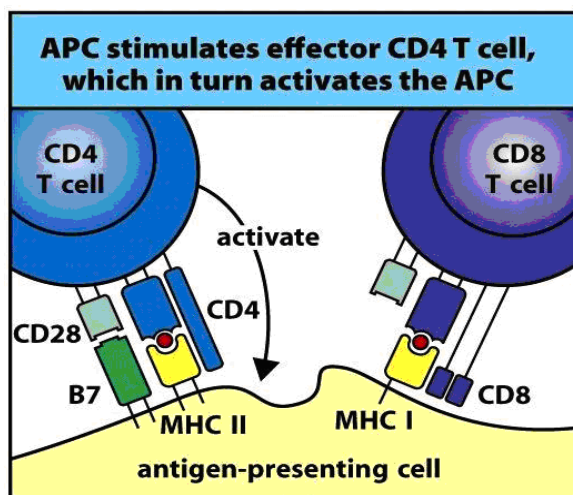


Figure 8-17 Immunobiology, 7ed, (© Garland Science 2008)

**Figure 6:** Représentation constituée par une synapse immunologique entre le Ly T et la CD. (D'après Immunobiology, 7<sup>ème</sup> édition Galand Science 2008).

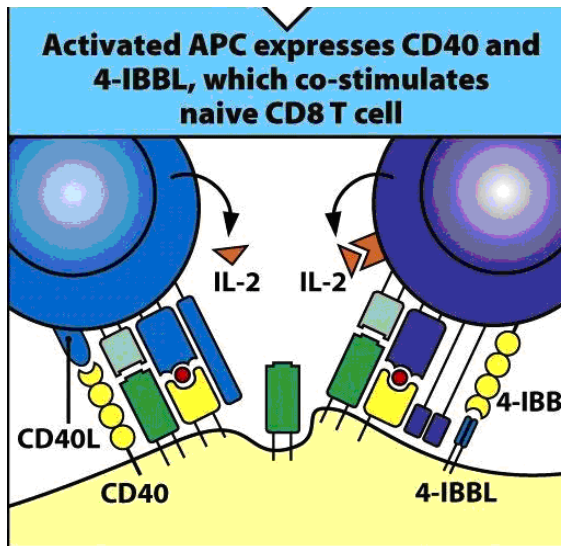
En interagissant avec les TNs, la CD induit selon le cas soit des lymphocytes effecteurs soit des lymphocytes tolérants. Les cytokines sécrétées dans le microenvironnement et le type de molécules de co-stimulation sollicitées lors de cette interaction contribuent au devenir des Ly. En retour ces dernières reçoivent des signaux d'activation qui passent pour la plupart par des molécules de la superfamille du TNF comme les molécules CD40 et RANK qui ont comme ligand le CD40L (CD154) ou TRANCE (TNrelated activation induced cytokine)<sup>140</sup> (fig 7).



**Figure 7:** La CPA qui présente l'Ag aux ly TCD4, reçoit au retour des signaux d'activation. L'activation des TCD8 requière une aide supplémentaire provenant des TCD4 effecteurs reconnaissant les mêmes Ags. (D'après Immunobiology, 7<sup>ème</sup> édition Galand Science 2008).

Suite à ces stimulations la survie des CD4 matures est majorée ainsi par l'expression par ces cellules de molécules de co-stimulation comme B7-2 (CD86), par la production de chimiokines et de cytokines<sup>141</sup>.

Il est néanmoins important de préciser que, les CD4 au stade mature favorisent la réponse T CD4+ et TCD8+, alors qu'à l'état immature elles sont tolérogènes du fait d'une plus faible expression des molécules de co-stimulations et une faible sécrétion de cytokines inflammatoires elles sont incapables d'activer les Ly T et dotées d'un pouvoir de phagocytose (fig 8).<sup>142</sup>.<sup>143</sup>.



**Figure 8:** En se liant à CD40L la molécule CD40 exprimée par la CPA induit l'expression par celle-ci des molécules CD80/CD86 (B7). Le Ly TCD4 contribue aussi à la différenciation du TCD8 par le biais de l'IL2. (D'après Immunobiology, 7<sup>ème</sup> édition Galand Science 2008).

La stimulation des CD8 via le CTLA-4Ig entraîne une libération de l'indolamine 2,3-dioxygénase (IDO) et la déplétion du tryptophane inhibant ainsi la prolifération T (fig9). Les Tregs profondément impliquées dans le contrôle des réponses immunitaires adaptatives peuvent entraver la maturation des CD8<sup>144</sup>. La maturation des CD8 plasmacytoïdes (CD8p) via le CD40L entraîne la polarisation des T CD4+ vers le profil Th2 avec libération de l'IL-4 et de l'IL-5<sup>145</sup>.

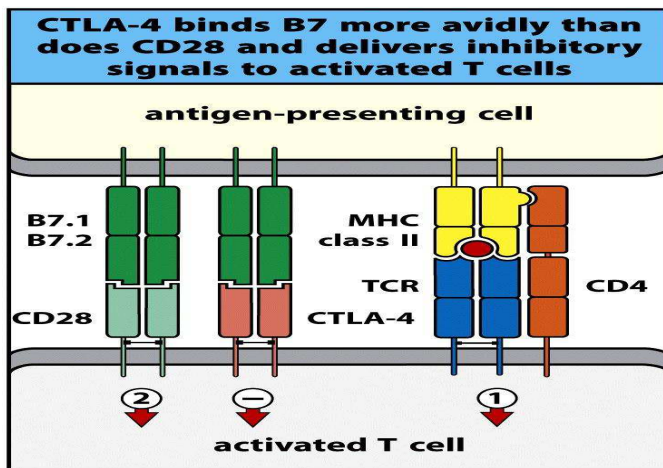


Figure 8-22 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

**Figure 9:** Le signal d'expansion et de prolifération des Ly T naïfs est induit via la molécule de co-stimulation CD28 suite à son interaction avec la molécule B7 exprimées sur la CPA. Une fois activées, les cellules T expriment le CTLA4 à la membrane qui délivre un signal négatif à la cellule (feed back). (D'après Immunobiology, 7<sup>ème</sup> édition Galand Science 2008).

Un nombre croissant d'outils thérapeutiques ciblant ces échanges est actuellement utilisé dans le domaine de la thérapie cellulaire. La compréhension fine des mécanismes moléculaires inducteurs d'anergie des lymphocytes T (rôle de la voie NFAT, des Diacyl-Glycerol Kinase...) laisse entrevoir la possibilité de développer de nouvelles armes thérapeutiques.

### **3) Les lymphocytes T naïfs et T<sub>CM</sub> sont les principaux responsables de l'induction d'une GVH expérimentale.**

Des expériences du transfert adoptif menées chez la souris par Adams et al.<sup>129</sup> en 2003 ont montré qu'au-delà d'un seuil ( $10^5$  cellules), des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires accumulés suite à diverses infections virales ou une première allogreffe étaient capables de s'opposer à l'établissement d'une tolérance à une allogreffe de peau. De manière surprenante, les cellules T CD8<sup>+</sup> impliquées dans ce processus possèdent les caractéristiques phénotypiques de cellules mémoires centrales (CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) et non de cellules mémoires effectrices (CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>neg</sup>).

L'année suivante, Zhang et al.<sup>146</sup> ont rapporté une expérience également chez la souris où ils démontrent que la population T CD8<sup>+</sup> à forte expression de CD44, contrairement à la population naïve CD44<sup>neg</sup>, était incapable de déclencher une GVHD mais gardait sa capacité d'induire un effet GVL.

Des travaux, conduits chez la souris par Anderson et al. ont montré que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires CD62L<sup>neg</sup> n'étaient pas impliqués dans la survenue de GVH.<sup>147</sup> Dans un autre modèle, Chen et al.<sup>148</sup> ont montré qu'un transfert adoptif des lymphocytes T CD62L<sup>neg</sup> n'induisait pas de GVH, mais gardait la possibilité d'exercer un effet GVL Cette différence a été attribuée au fait que les lymphocytes T CD62L<sup>neg</sup> n'entraînaient qu'une réponse allogénique abortive.<sup>149</sup> Le potentiel alloréactif des lymphocytes T avec un profil naïf CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>hi</sup> encore une fois a été mis en avant dans un modèle de GVH chez le rat<sup>150</sup>

#### 4) La reconstitution immunitaire post allogreffe

Les compartiments lymphocytaires B et T restent lourdement affectés dans les mois qui suivent une l'allogreffe, alors que l'immunité innée se reconstitue beaucoup plus précocement <sup>151</sup>, la reconstitution du compartiment T périphérique s'étale fait sur douze à vingt-quatre mois et emprunte deux voies principales. La première implique l'expansion post-thymique des lymphocytes T matures du donneur et des lymphocytes T résiduels du receveur <sup>152</sup> (fig 10) alors que la seconde est assurée par les CSH du donneur, emprunte le thymus du receveur et les cellules environnementales de la moelle osseuse pour les lymphocytes B.

Les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des lymphocytes de ces deux voies comportent de multiples différences. Les lymphocytes T résiduels du receveur, minoritaires, jouent un rôle marginal dans la reconstitution du compartiment T, en fait, les acteurs majeurs de cette reconstitution sont les lymphocytes T matures du donneur injectées avec le greffon. Cette reconstitution varie avec l'âge du patient, plus de 6 mois pour les sujets âgés de moins 30 ans (tout particulièrement les enfants et adolescents), et plus de 12 mois, pour les autres.

Les lymphocytes, issus de la voie dite thymo-indépendante, sont majoritairement T CD8+; ils ont un répertoire restreint, ne sont pas tolérants vis-à-vis des antigènes du receveur et comportent des fractions oligoclonales, voire clonales, qui sont probablement le fruit de stimulations allogéniques ou médiées par des agents infectieux (CMV, EBV...). Ils sont en revanche non tolérants vis-à-vis des antigènes de l'hôte, agressent les tissus du receveur et induisent une GVHD (*graft versus host disease*).

La déplétion du greffon en lymphocytes T prévient la GVHD, mais expose au risque de complications infectieuses sévères (que majore par ailleurs le traitement immunosuppresseur) et de récurrence tumorale par perte de l'effet GVT. Concernant les lymphocytes issus de la voie thymo-dépendante, ces cellules proviennent des progéniteurs hématopoïétiques du donneur, elles s'expandent d'abord dans la MO puis dans le thymus du receveur, où elles se différencient et bénéficient d'une éducation assurée par les cellules épithéliales thymiques (TEC) ainsi que par les CPA du receveur et du donneur.

Ainsi, les lymphocytes T néoformés TREC+ ne sont généralement détectés qu'après le 3e mois post-allogreffe. Ils donnent naissance à des lymphocytes T naïfs CD4+ ou CD8+, fonctionnels, exprimant le TCR  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ , au répertoire diversifié. Ils sont tolérants à l'égard des antigènes de l'hôte et du greffon. Le thymus génère aussi des Treg qui contribuent à la

régulation de la réponse immunitaire ainsi qu'à la prévention des manifestations auto-immunes et probablement du rejet de greffe. De nombreux facteurs influent sur la néogénération de lymphocytes T, donc sur la voie thymodépendante:

La richesse du greffon en progéniteurs médullaires, notamment en cellules de phénotype BM Lin-/Sca-1+/c-kit+/Flt3hi,

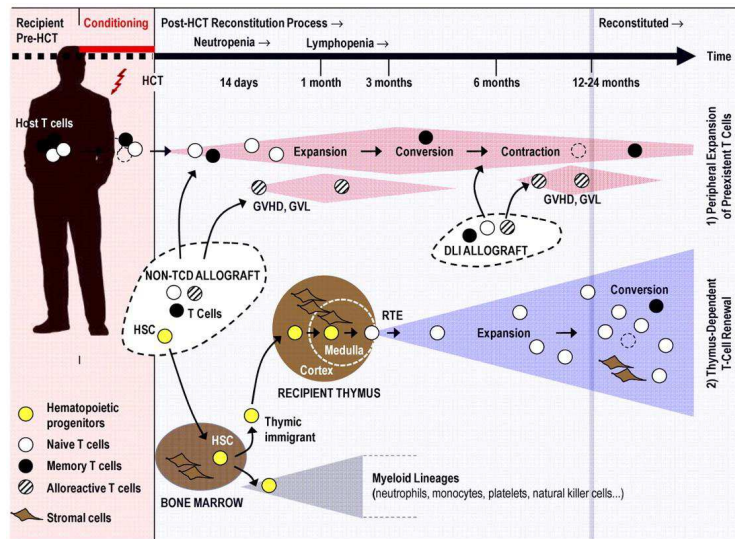
L'âge du patient (la reconstitution est ralentie entre 50 et 60 ans, et particulièrement faible après 60 ans),

Le conditionnement,

La GVHD <sup>153</sup>.

En fait, certains de ces facteurs, notamment les traitements de conditionnement, altèrent la qualité du microenvironnement médullaire et thymique <sup>154</sup>. Ainsi, la radiothérapie engendre des lésions de la matrice intercellulaire et induit une apoptose des TEC par un mécanisme p53-dépendant. Elle lèse aussi la composition, l'architecture et les fonctions de l'épithélium thymique, contribuant lourdement au défaut de maturation des thymocytes doublement positives (DP) et doublement négatives (DN). Une baisse marquée du niveau d'expression des transcrits d'IL-7 est observée jusqu'au 28e jour post-allogreffe.

Chez l'Homme, un essai de phase I testant l'administration d'une forme recombinante de l'IL-7 humaine (rhIL-7) a induit, chez cinq des six patients analysés, une augmentation des TREC, ainsi que des lymphocytes de phénotype T CD4 et CD8 aussi bien naïfs et mémoires <sup>155</sup>. Divers désordres, autres que ceux induits par le conditionnement, entravent la reconstitution optimale de l'immunité T notamment la GVH aiguë <sup>156</sup>. Toujours chez la souris, l'IL-11 préviendrait la GVHD et favoriserait la lymphopoïèse T et l'inhibition de l'IL-6 à l'aide d'un anticorp spécifique préviendrait la GVHD tout en préservant l'effet GVT <sup>157</sup>. Divers désordres immunologiques, notamment auto-immuns, sont observés après allogreffe de CSH, notamment en cas de GVH chronique <sup>158</sup>. Plusieurs mécanismes sont mis en cause dans leur survenue, parmi lesquels la perte progressive de l'expression du gène *AIRE* par les mTEC à laquelle s'associe une altération du répertoire des lymphocytes T conventionnels et du développement des Treg, autant de caractéristiques qui marquent le passage de la forme aiguë à la forme chronique de la GVHD <sup>48</sup>.



**Figure 10** Représentation schématique de la reconstitution du compartiment lymphocytaire T après allogreffe de CSH. Deux voies principales concourent à cette reconstitution. La voie thymo-indépendante est empruntée par les lymphocytes T résiduels du receveur et les lymphocytes T matures du donneur. Les premiers peuvent induire un rejet de greffe et les seconds une réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) susceptible d'entraver la thymopoïèse. Ces derniers, de diversité restreinte et majoritairement composés de lymphocytes T CD8+, exercent aussi un effet antitumoral (GVT). La voie thymodépendante, différée dans le temps, génère des lymphocytes T au répertoire diversifié, tolérants vis-à-vis des antigènes du receveur et du donneur (Krenger W et al. Blood 2011;117:6768-6776).

## 5) La problématique « valeurs absolues et ratios » des sous population T et GVHD

La contenance 10 fois plus importante en lymphocytes T des greffons d'origine périphérique n'est pas obligatoirement associée à une recrudescence d'incidence de la GVH aiguë.<sup>159</sup> Beaucoup de divergences ont été rapportées, chez les rongeurs l'utilisation des CSP entraîne une diminution de l'incidence de la GVHD via leur polarisation TH2,<sup>160</sup> chez l'homme les résultats demeurent très controversés puisqu'on dispose seulement de deux essais randomisés publiés, le premier a permis de démontrer une incidence accrue de la GVHD aiguë<sup>161</sup> et le second en terme de GVHD chronique.<sup>162</sup> La contenance relative (proportion) des différentes sous populations semble avoir plus d'intérêt que la valeur absolue de chacune d'elles;<sup>163</sup> En effet dans certaines études réalisées sur des modèles murins les signes cliniques et les dommages des organes cibles semblent être liés non seulement au profil mais au ratio TH1/TH17.<sup>164</sup> Chez l'homme le ratio TH17/Treg a été incriminé dans la modulation de la GVHD aiguë et dans plusieurs types de maladies inflammatoires.<sup>165</sup>



### C) Axes de recherche dans notre laboratoire :

Entre 2003 et 2006, nous avons analysé la composition des greffons de moelle osseuse et de cellules souches périphériques mobilisées par G-CSF, immédiatement avant leur réinjection au receveur. Par ailleurs, nous avons suivi de façon prospective les receveurs afin de pouvoir rechercher les éventuelles relations entre la composition du greffon en lymphocytes T naïfs et mémoires, l'émergence des lymphocytes circulants chez le receveur et les événements post-greffe.

La comparaison de la composition du greffon et des événements post-greffe a été réalisée chez nos 62 premiers couples donneur/receveur et a été publiée en 2006. Nous avons pu démontrer qu'une proportion élevée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> dans le greffon était un facteur de risque indépendant de la survenue, la précocité et la sévérité de la GVH aiguë dans le cas des allogreffes à partir d'un donneur HLA-compatible. Nous avons pu, par ailleurs, confirmer ces résultats *in vitro* dans un modèle de culture mixte lymphocytaire unidirectionnelle.<sup>166</sup>

Nos résultats ont démontré pour la première fois la preuve de l'implication de la fraction lymphocytaire T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> (composée de lymphocytes T naïfs et de T<sub>CM</sub>) dans la GVH aiguë *in vivo* chez l'homme. L'abondance de cette fraction ne semble pas, par ailleurs, interférer sur les autres complications post-greffe notamment l'effet GVL.

Ces résultats, avec les données de la littérature,<sup>167 168 169 149 150 170 171</sup> apportent un support au concept attractif de greffes à partir d'un greffon pauvre ou spécifiquement appauvri en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> tout en perfusant des lymphocytes T mémoires CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>neg</sup> exposant moins au risque de déclencher une GVH aiguë mais dotés d'activité anamnestique antiinfectieuse.

Le maintien de l'effet antitumoral (GVL) malgré un greffon relativement pauvre en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> peut se justifier par le fait que la proportion de cellules naïves et mémoires CD4<sup>+</sup> est indépendante de la composition du greffon en cellules NK et autres cellules cytotoxiques (CD8<sup>+</sup>) plus impliquées dans l'effet GVL, même si un minimum de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> helper reste indispensable.

Nous estimons que le fait de recevoir un greffon contenant une proportion élevée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> est une condition nécessaire mais non suffisante pour le développement d'une GVH aiguë dans la mesure où près de 40% de patients ayant reçu une proportion très élevée de ces cellules n'ont pas développé de GVH aiguë et à l'inverse, aucun des malades ayant reçu une proportion faible < 65% (< 25<sup>e</sup> percentile) n'a présenté de GVH aiguë. Toutefois, le risque de développer une GVH aiguë reste proportionnel au pourcentage de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>.

Les lymphocytes T<sub>reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> jouent un rôle dans la tolérance à la greffe et devraient s'opposer à l'installation d'une GVH<sup>172</sup> notamment celles exprimant le récepteur CD62L ou CCR7.<sup>173 174 175 176</sup> Nous n'avons pas analysé dans les greffons les proportions des lymphocytes T<sub>reg</sub>. Une proportion élevée de ces dernières peut, en partie, expliquer l'absence de GVH aiguë chez certains patients avec un greffon riche en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>.

L'ensemble de ces données nous a conduit à émettre l'hypothèse que le contenu global du greffon en cellules T naïves, mémoires centrales et/ou mémoires effectrices pourrait influencer la survenue et la sévérité des complications post-greffe notamment la GVH aiguë.

Nos résultats, ont été confirmés par une étude chez l'homme.<sup>177</sup> Une autre étude chez la souris a démontré que l'absence de CCR7 était responsable d'une absence de l'alloréactivité dans le sens de la GVH tout en conservant un effet GVL contre une allogreffe d'une ligne tumorale.<sup>178</sup>

**Afin d'asseoir le concept d'allo-CSH à partir d'un greffon pauvre ou spécifiquement appauvri en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>, il nous a paru nécessaire :**

- (1) de confirmer nos résultats cliniques de l'impact de la composition du greffon sur les complications immunologiques post-greffe sur une cohorte plus importante de malades.
- (2) d'explorer *in vitro* l'alloréactivité propre à chaque S/ population lymphocytaire T dans un modèle de compatibilité HLA faisant intervenir des différences uniquement au niveau des antigènes mineurs.
- (3) de vérifier de l'absence d'altération de la réponse anti-infectieuse après déplétion.
- (4) enfin le maintien de l'immunité anti-tumorale (projet en perspectif pour notre laboratoire).

**Ces résultats ont fait l'objet de la rédaction de 3 manuscrits dont 2 sont sous presse et 1 qui est accepté pour publication.**

**- Le premier est soumis à Pathologie Biologie Paris et en révision mineure signée en 1<sup>er</sup> auteur.**

**- Le second soumis à European Journal of Hematology, et en cours de révision signée en 1<sup>er</sup> co-auteur.**

**- Le troisième article soumis à Bone Marrow Transplantation, et accepté et signée en 1<sup>er</sup> auteur.**

## **TRAVAUX PERSONNELS**

Nous allons présenter successivement nos travaux concernant :

- 1) L'impact de la composition du greffon en lymphocytes T naïfs et mémoires sur le devenir de la greffe (cohorte de confirmation)
- 2) L'alloréactivité propre de chaque sous-population lymphocytaire T in vitro dans une situation de compatibilité HLA
- 3) Maintien de de la réponse antivirale après déplétion partielle et sélective des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>.

## **A) Impact de la composition du greffon sur le devenir de l'allogreffe (cohorte de confirmation.**

Entre janvier 2008 et décembre 2010, nous avons analysé la composition des greffons de moelle osseuse et de cellules souches périphériques mobilisées par G-CSF, immédiatement avant leur réinjection au receveur. Par ailleurs, nous avons suivi de façon prospective les receveurs afin de pouvoir rechercher les éventuelles relations entre la composition du greffon en lymphocytes T naïfs et mémoires et les événements post-greffe.

### **1) Critères d'Inclusion / Exclusion**

#### **Donneurs**

- 1) Tous les donneurs consentants de CSH (MO ou CSP) sont inclus. Les analyses immunophénotypiques se font sur une aliquote de 1 mL prélevée sur la poche destinée au receveur. Pour les donneurs lillois, l'étude des sous-populations lymphocytaires T du sang périphérique est réalisée sur le prélèvement destiné à compléter le typage HLA au niveau allélique.
- 2) Sont exclus :
  - Les sangs placentaires

- Les greffons issus de donneur syngéniques
- Les greffons ayant été congelés
- Les greffons T-déplétés

### **Receveurs**

Tous les receveurs d'allo-CSH dont les greffons ont pu être analysés

## **2) Suivi Clinique**

Les patients sont suivis prospectivement, pendant deux ans, en particulier pour les données suivantes :

- Immunosuppression post-greffe
- Prise ou rejet de greffe (date de survenue, traitement, évolution...)
- GVH aiguë (date de survenue, grade maximum, traitement, évolution)
- GVH chronique (date de survenue, grade maximum, traitement, évolution)
- Rechute de la maladie sous-jacente (date, traitement, devenir)
- Infections graves (virus, parasites, infections fongiques..)

L'étude de suivi est conduite en considérant la survie globale (temps écoulé entre la greffe et le décès quelle qu'en soit la cause), la survie sans événements (survie depuis la greffe sans évidence de rechute) et la mortalité liée à la transplantation (décès sans évidence de rechute). L'analyse de la GVH aiguë porte sur le délai d'apparition (censure à 100 jours ou à la date de décès) et la sévérité (grade I à IV).<sup>179</sup> Les différences de probabilité de survie sont estimées par la méthode de Kaplan-Meier.<sup>180</sup> Pour chaque paramètre, les analyses univariées sont faites par test Log-Rank,<sup>181</sup> les analyses multivariées selon le modèle proportionnel de Cox.<sup>182</sup>

Ce projet a été examiné par le CCPPRB de Lille (CP03/86), qui a estimé que « cette étude n'entraînait aucune contrainte pour les patients puisqu'elle concernait des prélèvements déjà disponibles. Elle ne rentre donc pas dans le cadre de la loi Huriet ». Toutefois, les donneurs et les receveurs (ou les parents pour les mineurs) ont signé un formulaire de consentement éclairé avant l'inclusion dans l'étude.

### 3) Suivi biologique de routine

- Chimérisme sur lymphocytes T du sang périphérique
- Biologie standard
- Antigénémie CMV, PCR virales et antigénémie aspergillaire

### 4) Calendrier du suivi immunologique

#### Lors de l'allogreffe de CSH :

Un échantillon de 1 mL de la poche injectée (au maximum 2% du volume) est expédié au laboratoire pour immunophénotypage.

L'ensemble des prélèvements est acheminé à température ambiante et analysé au laboratoire d'Immunologie dans les 24h.

### 5) Etude immunologique

- Les analyses sont effectuées sans étape d'isolement des cellules mononucléées, pour éviter l'introduction d'un biais dans la distribution des sous-populations lymphocytaires.<sup>183</sup>

- Tous les échantillons sont étudiés sans dilution préalable à l'exception des CSP qui sont étudiées après une dilution au 1/10° avec du tampon phosphate salin.

### 6) Choix des marqueurs :

L'expérience du laboratoire nous conduit à préférer la combinaison des marqueurs CD45RA et CCR7. L'expression de CD62L sur les cellules T<sub>CM</sub> et T<sub>EM</sub> est en effet plus hétérogène puisque certaines lymphocytes CD45RA<sup>neg</sup>CCR7<sup>+</sup> peuvent avoir perdu l'expression du CD62L et, inversement, certains lymphocytes CCR7<sup>neg</sup> peuvent encore garder l'expression du CD62L.<sup>114 120</sup> Ces marqueurs sont combinés avec l'étude du récepteur CD28. La perte d'expression du marqueur CD28 est particulièrement associée aux fonctions cytotoxiques.<sup>98 125 126</sup>

## 7) Manuscrit #1

**Impact de la composition du greffon sur le devenir des patients après une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques : corrélation entre proportion des lymphocytes T CD4+ du greffon exprimant le CCR7 et la survenue d'une GVH aiguë.**

**Cet article a été soumis à la revue Pathologie-Biologie. Il a été accepté.**

\* Les références citées dans l'article sont listées à la fin de l'article et non pas à la fin de la thèse.



## **Impact de la composition du greffon sur le devenir des patients après une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques : corrélation entre proportion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> du greffon exprimant le CCR7 et la survenue d'une GVH aiguë.**

Bachra Choufi<sup>1-2</sup>, Stéphanie Thiant<sup>1</sup>, Jacques Trauet<sup>1</sup>, Manuel Cliquennois<sup>1-4</sup>, Mathilde Cherrel<sup>1</sup>, Florence Boulanger<sup>3</sup>, Valérie Coiteux<sup>4</sup>, Leonardo Magro<sup>4</sup>, Myriam Labalette<sup>1</sup>, Ibrahim Yakoub-Agha<sup>1-4</sup>.

## **The impact of donor naive and memory T cell subsets on patient outcome following allogeneic stem cell transplantation: Relationship between infused donor CD4<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T cell subsets and acute graft-versus-host disease:**

- 1- Laboratoire d'immunologie, EA2686, CHRU de Lille, France,
- 2- Service d'Hématologie, CH de Boulogne sur mer, France,
- 3- EFS nord de France, Lille, France,
- 4- Maladies du Sang, CHRU de LILLE, France

### **Auteur correspondant:**

Prof. Ibrahim Yakoub-Agha, MD, Ph.D

UAM allogreffes de CSH

CHRU de Lille

F-59037 Lille CEDEX

France.

Tel : ++333(0)20.44.55.51

Fax : ++333(0)20.44.40.94

E-mail : [sfgm-tc-iya@live.fr](mailto:sfgm-tc-iya@live.fr)

**Mots clés :** Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, GVH aiguë, lymphocytes T, CCR7.

**Key words:** allogeneic stem cell transplantation, Acute GVHD, T cells, CCR7.

### **Résumé**

Dans une précédente étude prospective portant sur 62 couples donneur/receveur nous avons pu étudier l'impact de la composition du greffon en cellules T de phénotypes naïfs et mémoires sur le devenir des receveurs d'allogreffes à partir d'un donneur HLA-identique apparenté ou non; et nous avons pu démontrer qu'une proportion élevée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> dans le greffon était un facteur de risque de la survenue, la précocité et la sévérité de la GVH aiguë, sans influence sur la GVH chronique ou la rechute.

Nous confirmons dans cette seconde étude nos résultats cette fois-ci sur une cohorte de 137 malades consécutifs et suivis de façon prospective.

Nos résultats constituent une étape importante soutenant le concept d'une T déplétion partielle et sélective du greffon en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> dans le but de réduire le risque de GVH

aiguë sans diminuer le potentiel d'effet GVL du greffon notamment chez les donneurs présentant un taux élevé de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs et/ou mémoires centrales .

## **Abstract**

In a previous prospective study on 62 patients who underwent an HLA-matched allogeneic stem cell transplantation we have observed that proportion of donor-derived CCR7<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cells in the graft provided a predictive indicator of acute GVHD without interfering on chronic GVHD and relapse rate. Here we present our results on a confirmatory cohort of 137 consecutive patients. Indeed, patients who received more than 76% of CCR7<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cells in the graft developed more often acute GVHD be it of low or high grade than those how did not.

Determination of the CCR7<sup>+</sup>/CCR7<sup>neg</sup> ratio of CD4<sup>+</sup> T cells in the graft provides a predictive indicator of acute GVHD and could help to define strategies of partial selective T-cell depleted transplantation.

## **Introduction**

L'allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (allo-CSH) est le seul traitement curatif d'un certain nombre de maladies hématologiques malignes. Véritable immunothérapie adoptive, cette approche est destinée à prévenir la rechute d'une hémopathie maligne grâce à la réponse immunologique du greffon contre la maladie (effet GVL, Graft Versus Leukemia), dans lequel les lymphocytes T apportés par le greffon sont déterminants.[1-4] Ces derniers peuvent aussi compromettre le devenir du patient, en induisant une réaction du greffon contre l'hôte (GVH, Graft Versus Host). Toutes ces réactions immunologiques impliquent les lymphocytes T du donneur et sont interdépendantes entre elles.

L'analyse des populations lymphocytaires intervenant dans la GVL, la GVH et la prise de greffe doit prendre en compte l'état de maturation et de différenciation des cellules présentes dans les greffons. Les données de la littérature actuellement disponibles portent essentiellement sur le rôle respectif des populations lymphocytaires T majeures (lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) dans la survenue de la GVH et/ou la prise de greffe [5-7] mais sans différencier le rôle des cellules T naïves ou mémoires. On peut, en effet, se demander si ces deux catégories de cellules (naïves et mémoires) ont le même potentiel d'alloréactivité et si ce potentiel diffère selon qu'on considère le compartiment CD4<sup>+</sup> ou le compartiment CD8<sup>+</sup>.

Du point de vue de leurs immunophénotypes respectifs, la caractérisation est plus difficile. Il est nécessaire d'associer au marqueur classique CD45RA d'autres marqueurs membranaires, parmi lesquels des récepteurs de trafic cellulaire et domiciliation (CCR7 et CD62L) ont été les plus utilisés.[8] Les travaux de Sallusto, de Callan et de Farber,[8-10] indiquent que les lymphocytes T naïfs se définissent par leur coexpression de l'isoforme CD45RA, de CCR7 (et CD62L) et de CD28 (et CD27) en l'absence d'expression de récepteurs de chimiokines inflammatoires tels que CXCR3 ou CCR4. A côté des lymphocytes naïfs, on dénombre au moins trois sous-populations de cellules non naïves à savoir les cellules T "mémoire centrale" (T<sub>CM</sub>), les cellules T "mémoire effectrice" (T<sub>EM</sub>) et les cellules T de "différenciation terminale" (TTD T<sub>TD</sub>).

Suite à une première étude (cohorte exploratoire) de 62 allogreffes réalisées dans le service des Maladies du Sang, nous avons pu étudier l'impact de la composition du greffon en cellules T de phénotypes naïfs et mémoires sur le devenir des receveurs d'allogreffes à partir d'un donneur HLA-identique apparenté ou non et nous avons pu démontrer qu'une proportion élevée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> dans le greffon était un facteur de risque de la survenue, la précocité et la sévérité de la GVH aiguë, sans influence sur la GVH chronique ou

la rechute. A noter que les valeurs absolues des sous-populations lymphocytaires T n'avaient aucun impact sur le devenir des patients notamment sur le développement de la GVH aiguë.[11]

Dans une autre étude, nous avons montré que la proportion de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> présentait une grande variabilité interindividuelle, mais que les caractéristiques démographiques et le statut sérologique du donneur n'avaient pas d'influence notable sur la richesse du greffon en lymphocytes CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>. [12]

Afin de confirmer notre première étude, nous avons conduit une seconde étude sur une nouvelle cohorte de 137 malades consécutifs et suivis de façon prospective (cohorte de confirmation).

Notre but étant de valider à terme le concept d'une T déplétion CD4<sup>+</sup> partielle et sélective. Cette dernière approche est basée sur l'hypothèse est qu'une simple réduction du pourcentage des lymphocytes expriment le CCR7<sup>+</sup> au sein des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> du greffon pourrait suffire à réduire le risque de GVH aiguë sans diminuer le potentiel GVL du greffon notamment dans le cas des donneurs chez qui les proportions des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs et/ou mémoires centrales sont abondantes.

## Patients et Méthodes

Entre janvier 2008 et décembre 2010, nous avons analysé la composition des greffons de moelle osseuse (MO) et de cellules souches périphériques mobilisées par G-CSF (CSP), immédiatement avant leur réinjection chez 137 receveurs. Par ailleurs, nous avons suivi de façon prospective les receveurs afin de pouvoir rechercher les éventuelles relations entre la composition du greffon en lymphocytes T naïfs et mémoires, les événements post-greffe.[13, 14] Ce projet a été approuvé par le CCPPRB de Lille (CP03/86), et tous les receveurs (ou les parents pour les mineurs) ont signé un formulaire de consentement éclairé avant la greffe. Afin d'avoir une population la plus homogène possible nous avons exclu de l'étude les patients ayant reçu du sang placentaire, les greffons issus de donneur syngénique, les greffons ayant été congelés et les greffons T-déplétés *ex-vivo*. Les caractéristiques des patients et donneurs sont résumé dans le tableau 1.

Un échantillon de 1 mL de la poche injectée (au maximum 2% du volume) est expédié au laboratoire à température ambiante et analysé dans les 24h. Les analyses sont effectuées sans étape d'isolement des cellules mononucléées, pour éviter l'introduction d'un biais dans la distribution des sous-populations lymphocytaires.[15] Tous les échantillons sont étudiés sans dilution préalable à l'exception des CSP qui sont étudiées après une dilution au 1/10<sup>o</sup> avec du tampon phosphate salin. L'expérience du laboratoire nous conduit à préférer la combinaison des marqueurs CD45RA et CCR7. L'expression de CD62L sur les cellules T<sub>CM</sub> et T<sub>EM</sub> est en effet plus hétérogène puisque certains lymphocytes CD45RA<sup>neg</sup>CCR7<sup>+</sup> peuvent avoir perdu l'expression du CD62L et, inversement, certains lymphocytes CCR7<sup>neg</sup> peuvent encore garder l'expression du CD62L.[8, 10] Tous les immunomarquages lymphocytaires ont été réalisés sur sang total et analysés dans les 24h suivant le prélèvement. Les immunophénotypes ont été réalisés par immunomarquage multiple (voir tableau 2) avec les anticorps suivants : anti-CD45 (Pc7), anti-CD3, anti-CD4 (Fitc), anti-CD8 (APc), anti-CD19 (Pc5), anti-CD56 (Pe), anti-CD3 (Fitc), anti-CD16 (Pe), anti-CD45RA (Fitc) de la Société Beckman-Coulter, anti-CD3 (Pc7), anti-CD56 (Fitc) et anti-CD4 (Pc7) de la Société Becton Dickinson et l'anticorps anti-CCR7 (Pe) de la Société R&D. Pour les CSP, après incubation de 100 µL de l'échantillon avec les anticorps pendant 10 minutes, une lyse automatisée à l'aide d'un automate TQ-Prep<sup>TM</sup> – Coulter (Solution ImmunoPrep<sup>TM</sup> Reagent System, Beckman Coulter) est effectuée. Pour les prélèvements médullaires, en raison d'une fragilité cellulaire, la lyse des

globules rouges a été faite par 1 mL de Versalyse (Beckman-Coulter) suivi par une agitation de 30 secondes (vortex) puis une incubation de 20 min à température ambiante. Après cette étape de lyse, deux lavages en tampon isotonique sont nécessaires avant lecture au cytomètre en flux (FC500, Beckman Coulter).

## **Analyses statistiques**

L'étude de suivi est conduite en considérant la survie globale (temps écoulé entre la greffe et le décès quelle qu'en soit la cause), la survie sans événements (survie depuis la greffe sans évidence de rechute) et la mortalité liée à la transplantation (décès sans évidence de rechute). L'analyse de la GVH aiguë porte sur le délai d'apparition (censure à 100 jours ou à la date de décès) et la sévérité (grade I à IV ou grade II-IV).[16] Les différences de probabilité de survie sont estimées par la méthode de Kaplan-Meier. Pour chaque paramètre, les analyses univariées sont faites par test Log-Rank, Mis à part la population lymphocytaire T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> qui a été systématiquement incluse, seuls les facteurs avec une valeur de  $p < 0.15$  en univariées, ont été considérés pour les analyses multivariées. Ces dernières ont été effectuées selon le modèle proportionnel de Cox.[17]Le logiciel IBM SPSS statistics v19 a été utilisé.

## **Résultats :**

### ***Etude des greffons***

Le tableau 3 représente la répartition des sous populations lymphocytaires T en valeurs absolues et pourcentages pour l'ensemble des greffons puis en fonction du type du greffon à savoir les greffons médullaires et les CSP. Alors la quantité des lymphocytes T prélevée dans les CSP était très supérieure à celle prélevée avec les greffons médullaires, il n'y avait pas de différence qualitative entre les deux types de greffons lorsque l'on a comparé les pourcentages.

### ***Devenir des patients***

A la date de l'analyse, les taux de survie globale, survie sans événement, rechute étaient respectivement de 65%, 53% et 27%. Cinquante-deux patients (38%) ont développé une GVH aiguë dont 44 patients (32%) de grade II-IV et 20 patients (15%) de grade III-IV. Trente-sept patients (27%) ont rechuté après la greffe.

### ***Analyses univariées***

Le tableau 4 résume les résultats des analyses univariées en terme de survie globale, survie sans événement, rechute, GVH aiguë de grade I-IV ou II-IV.

Tous les facteurs suivants n'avaient pas d'impact sur le devenir des patients à savoir âge du receveur, le diagnostic de l'hémopathie sous-jacente, l'origine du greffon, le type de conditionnement et l'utilisation du sérum anti-lymphocytaire.

Alors que le statut à la greffe influençait la survie globale ( $p=0.03$ ), la survie sans événement était influencée par le type de conditionnement ( $p=0.02$ ). Aucun facteur n'a été identifié pour influencer l'incidence de la rechute. L'incidence de la GVH aiguë était influencée par le sexe du receveur et le type de donneur (apparenté versus non-apparenté) et surtout par la présence d'une proportion  $> 76\%$  de cellules lymphocytaire T CCR7<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> dans le greffon ( $p=0.05$  et  $0.022$  respectivement pour la GVH aiguë de grade I-IV et II-IV). A noter que nous n'avons pas trouvé d'impact sur la GVH aiguë des sous populations CD4<sup>+</sup> naïve et T<sub>CM</sub> lorsque ces deux populations ont été étudiées séparément.

### ***Analyses multivariées***

Le tableau 4 résume les résultats des analyses multivariées en terme de survie globale, survie sans événement, GVH aiguë de grade I-IV ou II-IV. Aucun facteur n'a été retrouvé pour influencer l'incidence de la rechute de la maladie sous-jacente.

La survie globale était influencée par le statut de la maladie à la greffe ( $p=0.028$ ), la survie sans événement était meilleure chez les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif ( $p=0.013$ ). Une proportion élevée de lymphocytes T CCR7<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> ainsi que le donneur non apparenté étaient les deux facteurs influençant négativement la survenue d'une GVH aiguë de grade I-IV. La proportion des lymphocytes T CCR7<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> n'avait aucun impact sur le devenir des patients par ailleurs notamment sur le risque de rechute.

### **Discussion**

Nous avons déjà observé dans une première étude exploratrice qu'une proportion élevée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> dans le greffon était un facteur de risque indépendant de la survenue, la précocité et la sévérité de la GVH aiguë dans le cas des allogreffes à partir d'un donneur HLA-compatible.[18] Nous avons pu, par ailleurs, confirmer ces résultats *in vitro* dans un modèle de culture mixte lymphocytaire unidirectionnelle. Cette nouvelle étude de confirmation, valide nos premiers résultats dans une plus grande série de malades. Nos résultats apportent pour la première fois, à notre connaissance, la preuve de l'implication de la fraction lymphocytaire T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> (composée de lymphocytes T naïfs et de T<sub>CM</sub>) dans la GVH aiguë *in vivo* chez l'homme. Un pourcentage élevé de cette fraction au sein des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ne semble pas, par ailleurs, interférer sur les autres complications post-greffe notamment l'effet GVL. A noter que les valeurs absolues des sous-populations lymphocytaires T, n'avaient pas d'impact sur le devenir des patients notamment en terme de GVH aiguë confirmant notre constatations initiale.[18]

Nos résultats, ont été confirmés par une autre étude chez la souris qui a démontré que le manque de CCR7 était responsable d'une absence de l'alloréactivité dans le sens de la GVH tout en conservant un effet GVL contre une allogreffe d'une lignée tumorale.[19]

Bien que la GVH puisse avoir un effet adjuvant sur la GVL,[20] certaines données cliniques et expérimentales laissent à penser que ces deux effets sont médiés par des clones T différents.[21-23]

Afin de dissocier l'effet GVL de la GVH, plusieurs approches ont été essayées. Ainsi, l'équipe de Besançon a déjà publié son expérience en testant la T-déplétion conditionnelle *in vivo* en présence de GVH.[24] D'autres équipes ont rapporté les résultats d'une déplétion spécifique *ex vivo* des lymphocytes T alloréactifs dans le cadre des allo-CSH[25] ou d'induction d'une anergie.[26] Les deux populations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> sont très hétérogènes et peuvent être divisées schématiquement en lymphocytes naïfs et lymphocytes mémoires. D'un point de vue conceptuel, la définition des lymphocytes T naïfs est claire : il s'agit de lymphocytes T libérés par le thymus, ensemencant le compartiment lymphoïde périphérique et y circulant en permanence dans l'attente d'une stimulation antigénique par des cellules dendritiques matures dans les organes lymphoïdes secondaires. L'ensemble de ces données nous a conduit à émettre l'hypothèse que le contenu global du greffon en cellules T naïves, mémoires centrales et/ou mémoires effectrices pourrait influencer la survenue des complications post-greffe notamment la GVH aiguë.

Nos résultats, avec les données de la littérature,[26-31] apportent un support au concept attractif de greffes à partir d'un greffon pauvre ou spécifiquement appauvri en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> tout en perfusant des lymphocytes T mémoires T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>neg</sup> exposant moins au risque de déclencher une GVH aiguë mais dotés d'activité de mémoire anti-infectieuse.

La raison pour laquelle les lymphocytes T mémoires CCR7<sup>neg</sup> seraient moins aptes à déclencher une GVH aiguë n'est pas clairement établie. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées essentiellement, l'absence d'expression de molécules de domiciliation telles que le CCR7 et le CD62L, garants du trafic cellulaire entre le sang périphérique et les organes lymphoïdes secondaires (OLS), peut en partie expliquer le défaut de déclenchement du processus de GVH aiguë par les lymphocytes T naïfs et T<sub>CM</sub>. [32-37] Un répertoire clonogénique plus restreint des lymphocytes T mémoires CCR7<sup>neg</sup> peut également expliquer l'incapacité de ces derniers à déclencher une GVH aiguë en dehors de l'immunité hétérologue. Arstila et al. [38] ont montré, chez l'homme, que les lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>neg</sup> ont un répertoire environ cent fois moins diversifié que les lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, mais cette étude n'a pas distingué les cellules CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>neg</sup> en T<sub>CM</sub> et en T<sub>EM</sub>. Enfin, une troisième possibilité, non exclusive des précédentes, serait que les lymphocytes CD4<sup>+</sup> mémoires CCR7<sup>neg</sup> aient un potentiel d'expansion clonale plus limité que les T<sub>CM</sub> et les lymphocytes naïfs, ce qui limiterait d'autant leur potentiel agressif chez le receveur. En effet, Sallusto et al. [8, 10] ont retrouvé des télomères plus raccourcis dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>neg</sup>. Ceux-ci peuvent être conduits vers la sénescence répliquative sous l'influence des stimulations antigéniques répétées liées aux infections virales chroniques. [39, 40] Au contraire, les lymphocytes T<sub>CM</sub> conservent un potentiel répliquatif conséquent surtout en présence de CD qui potentialise leur capacité de réponse. [41, 42]

Le maintien de l'effet antitumoral malgré un greffon relativement pauvre en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> peut se justifier par le fait que la proportion de cellules naïves et mémoires CD4<sup>+</sup> est indépendante de la composition du greffon en cellules NK et autres cellules cytotoxiques (CD8<sup>+</sup>) plus impliquées dans l'effet GVL, même si un minimum de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> helper reste indispensable. Nos résultats ont également été vérifiés in vitro dans un modèle murin où non seulement la diminution de l'incidence de la GVH a été observée mais aussi la préservation de l'effet anti-tumoral malgré l'utilisation des greffons provenant des souris KO pour le CCR7. [19]

Nous estimons que le fait de recevoir un greffon contenant une proportion élevée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> est une condition nécessaire mais non suffisante pour le développement d'une GVH aiguë dans la mesure où près de 40% de patients ayant reçu une proportion très élevée de ces cellules n'ont pas développé de GVH aiguë et à l'inverse, aucun des malades ayant reçu une proportion faible < 65% (< 25<sup>o</sup> percentile) n'a présenté de GVH aiguë. Toutefois, le risque de développer une GVH aiguë reste proportionnel au pourcentage de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>.

Les lymphocytes T régulateurs (T<sub>reg</sub>) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> jouent un rôle dans la tolérance à la greffe et devraient s'opposer à l'installation d'une GVH [19] notamment ceux exprimant le récepteur CD62L ou CCR7. [43-45] Nous n'avons pas analysé dans les greffons les proportions des lymphocytes T<sub>reg</sub>. Une proportion élevée de ces dernières peut, en partie, expliquer l'absence de GVH aiguë chez certains patients avec un greffon riche en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>.

## **Remerciements :**

Nous remercions tous les patients, les donneurs et leurs familles d'avoir accepté de participer à cette recherche. Nous remercions également l'association Capucine qui a financé en partie ce travail de recherche.

Table 1: Caractéristiques des donneurs et receveurs

<b>Caractéristiques</b>	
<b>Age du receveur à la greffe, médian ans (extrêmes)</b>	48 (7-67)
<b>Diagnostic nombre (%)</b>	
Leucémie aiguë	66 (48)
Syndrome myéloprolifératif	19 (13)
Syndrome Lymphoprolifératif	52 (37)
<b>Sexe match, no (%)</b>	
D masculin – R masculin	52 (38)
D masculin – R féminin	28 (20)
D féminin – R masculin	28 (20)
D féminin – R féminin	26 (19)
<b>Type du donneur, no. (%)</b>	
Fratricie HLA-compatible	71 (52)
Non-apparenté HLA-compatible (10/10)	56 (41)
Non-apparenté HLA-différent (9/10)	10 (7)
<b>Sérologie CMV (%)</b>	
D positif – R positive	28 (20)
D positif – R négatif	24 (18)
D négatif – R positif	25 (18)
D négatif – R négatif	60 (44)
<b>Greffon, no. (%)</b>	
Moelle osseuse	105 (77)
Cellules souches périphériques	32 (23)
<b>Type de Conditionnement, no. (%)</b>	
Myéloablatif	80 (68)
Atténué	58 (42)
<b>Sérum anti-lymphocytaire, no. (%)</b>	
Oui	24 (18)
non	113 (82)
<b>Irradiation Corporelle Totale</b>	
Oui	55 (40)
Non	82 (60)

**Tableau 2.** Définitions des sous-populations lymphocytaires.

<b>Sous population</b>	<b>Marqueur repère*</b>	<b>Marqueurs complémentaires</b>
<b><u>Populations générales</u></b>		
T Totale	CD45 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>
T CD4 <sup>+</sup>	CD45 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>neg</sup>
T CD8 <sup>+</sup>	CD45 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>neg</sup> CD8 <sup>bright</sup>
T CD56 <sup>+</sup>	CD45 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> /CD16 <sup>neg</sup>
Natural killer	CD45 <sup>+</sup>	CD3 <sup>neg</sup> CD56 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> /CD16 <sup>neg</sup>
Lymphocytes B	CD19 <sup>+</sup>	
<b><u>Population CD4<sup>+</sup></u></b>		
Naïve	CD4 <sup>+</sup>	CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup>
Mémoires centrales (T <sub>CM</sub> )	CD4 <sup>+</sup>	CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>neg</sup>
Mémoires effectrices (T <sub>EM</sub> )	CD4 <sup>+</sup>	CCR7 <sup>neg</sup> CD45RA <sup>neg</sup>
Différenciation terminale (T <sub>TD</sub> )	CD4 <sup>+</sup>	CCR7 <sup>neg</sup> CD45RA <sup>+</sup>
<b><u>Population CD8<sup>+</sup> **</u></b>		
Naïve	CD8 <sup>bright</sup>	CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup>
Mémoires centrales (T <sub>CM</sub> )	CD8 <sup>bright</sup>	CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>neg</sup>
Mémoires effectrices (T <sub>EM</sub> )	CD8 <sup>bright</sup>	CCR7 <sup>neg</sup> CD45RA <sup>neg</sup>
Différenciation terminale (T <sub>TD</sub> )	CD8 <sup>bright</sup>	CCR7 <sup>neg</sup> CD45RA <sup>+</sup>

\* utilisé pour conditionner l'analyse sur les cellules d'intérêt, en association avec les paramètres de taille et de structure (Forward et side scatter) ;. \*\* Seulement les cellules exprimant un haut niveau de CD8 (CD8<sup>bright</sup>) ont été considérées comme des lymphocytes T ; † CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> naïves et mémoires ont été subdivisés en CD28<sup>+</sup> et CD28<sup>neg</sup>.



**Table 3.** Numération et répartition en pourcentage des sous-populations selon l'origine du greffon

	Population générale médiane (IQR, 25-75%)	Moelle osseuse médiane (IQR, 25-75%)	SCP médiane (IQR, 25-75%)	<i>p</i>
<b>CD34<sup>+</sup> cells (10<sup>6</sup>/kg du receveur)</b>	3.8 (2.7-5.2)	3.8 (2.6-4.5)	5 (3.1-6.3)	
<b>Lymphocyte</b> Numération (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> ) Valeur 10 <sup>6</sup> /par kg du poids du receveur	4.4 (1.7-69.7) 53.7 (29.4-181.1)	2,0 (1,6-24,8) 28,1(28– 109,9)	306,2(3,2-442,6) 697,5(50,9-1085,9)	<0.001 <0.001
<b>Lymphocytes CD3<sup>+</sup></b> Valeur 10 <sup>6</sup> /par kg du poids du receveur Pourcentage	37.0 (20.1-123.1) 72 (66-75)	19,6 (18,5-77) 71,5 (66-75)	517,1 (30,1-793,2) 75 (68-78)	0.001 0.191
<b>Lymphocytes CD4<sup>+</sup></b> Valeur 10 <sup>6</sup> /par kg du poids du receveur Pourcentage	13.8 (8.0-56.1) 41 (35-45)	7,8 (7,3-29,3) 40 (35-44)	235,3 (115-376,6) 43 (36-48)	<0.001 0.244
<b>Sous-population %</b>				
CCR7 <sup>+</sup>	76.0 (69.4-82.2)	80,8 (67,9-80,7)	71 (70-83,3)	0.350
Naïve	45.0 (34.7-55.7)	50,5 (35,4-55,2)	37 (33,5-55,1)	0.552
T <sub>CM</sub>	29.3 (21.4-35.6)	29,7 (21-35,4)	34 (24,5-38,7)	0.214
CCR7 <sup>neg</sup>	24.0 (18.0-31.0)	19,5 (19,7-33,1)	29,5 (16,7-30)	0.280
T <sub>EM</sub>	21.5 (15.0-27.8)	17,5 (16,2-9,1)	25,5 (13-26,8)	0.258
T <sub>TD</sub>	1.8 (1.0-3.0)	1,5 (1-3)	3,5 (0,8-2,2)	0.075
<b>Lymphocytes CD8<sup>+</sup></b> Valeur 10 <sup>6</sup> /par kg du poids du receveur Pourcentage	11.5 (6.2-42.7) 32 (27-36)	6,5 (5,7-25) 33 (27-37)	153,2 (9,3-253,1) 40 (28-35)	<0.001 0.572
<b>Sous-population (%)</b>				
CCR7 <sup>+</sup>	48.6 (35.8-28.0)	47(31,6-57)	46,6(39,6-58,8)	0.192
Naïve	42.0 (28.9-53.3)	39,4(26,9-51,8)	39,4(32,3-53,9)	0.441
T <sub>CM</sub>	5.2 (2.7-9.3)	8,6(2,6-8,4)	7,2(3,6-12,1)	0.077
CCR7 <sup>neg</sup>	51.4 (42.0-64.2)	53,1(42,3-68,4)	53.5 (41,3-60,4)	0.192
T <sub>EM</sub>	24.8 (15.0-15.5)	31,7(15-35,8)	18,6(13-33,6)	0.274
T <sub>TD</sub>	24.2 (14.9-34.4)	21,1(16,6-33,9)	34,9(13,7-34,1)	0.315

Abbréviation : T<sub>CM</sub> : central mémoire ; T<sub>EM</sub> : effecteur mémoire ; T<sub>DD</sub> : différenciation terminale.

**Tableau 4. Analyses univariées. Pourcentages et valeurs du test Log-Rank**

Caractéristiques initiales	N de pts	Survie Globale		Survie sans événement		Rechute		GVH aiguë 1-4		GVHD aiguë 2-4	
		%	p	%	p	%	p	%	p	%	p
<b>Âge du malade</b>											
≤ 48 ans	67	70	.32	56	.66	32	.23	36	.20	26	.17
> 48 ans	69	70		51		22		43		38	
<b>Sexe du receveur</b>											
Masculin	82	86	.15	49	.23	30	.22	44	0.09	39	<b>.05</b>
Féminin	54	66		60		32		29		22	
<b>Diagnostic</b>											
Syndromes myéloprolifératifs *	59	70	.11	57	.11	28	.46	35	.46	30	.63
Syndromes Lymphoprolifératifs **	77	62		51		26		40		34	
<b>Type de donneur</b>											
apparenté	70	70	.34	54	.99	27	.93	31	<b>.05</b>	24	<b>.019</b>
non-apparenté 10/10	66	60		53		27		45		41	
<b>Origine du greffon</b>											
MO	104	64	.34	51	.19	29	.30	38	.69	33	.46
CSP	32	72		63		28		37		28	
<b>Statut à la greffe</b>											
Répondeurs	89	71	<b>.03</b>	58	.07	27	.45	37	.70	22	.96
Progressifs	47	55		45		28		40		22	
<b>Conditionnement</b>											
Myéloablatif	80	71	.07	61	<b>.02</b>	25	.22	28	.96	32	1.00
Atténué	58	59		43		29		28		33	
<b>Sérum anti-lymphocytaire</b>											
Non	113	68	.19	53	.99	32	.09	40	0.52	33	.92
Oui	24	54		54		4		29		29	
<b>Composition du greffon</b>											
Ratio TCD4 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> /TCD4CCR7 <sup>neg</sup>											
≤ 76	69	65	.80	51	.53	29	.62	29	<b>.05</b>	22	<b>.022</b>
> 76	65	66		56		26		47		42	

GVHD: Graft-Versus-Host Disease; \* Syndromes myéloprolifératifs incluant les leucémies aiguës myéloïdes, myélodysplasies et l'ensemble des Sd myéloprolifératifs chroniques. \*\* Syndromes lymphoprolifératifs incluant les leucémies aiguës lymphoblastiques et l'ensemble des syndromes lymphoprolifératifs chroniques. SCP : cellules souches périphériques. MO : Moelle osseuse.

**Tableau 5. Analyses multivariées.**

	Survie Globale		Survie sans événement		GVH aiguë 1-4		GVHD aiguë 2-4	
	RR [95%CI]	p	RR [95%CI]	p	RR [95%CI]	p	RR [95%CI]	p
Statut à la greffe								
Répondeur	1		-		-		-	
Progressif	1.92 [1.07-3.44]	0.028						
Conditionnement								
Myéloablatif	-		1		-		-	
Atténué			1.87 [1.14-3.08]	0.013				
Type de donneur								
intrafamilial	-		-		-		1	
Fichier							1.82 [0.98-3.36]	0.057
Composition du greffon								
CD4+CCR7+	-		-		1	0.057	1	0.041
< 76%					1.73 [0.98-3.03]		1.93 [1.03-3.62]	
≥ 76%								

RR: risque relatif.

## REFERENCES

- Hessner, M.J., Edean, D.J., Casper, J.T., Horowitz, M.M., Keever-Taylor, C.A., Roth, M. et al. Use of unrelated marrow grafts compensates for reduced graft-versus-leukemia reactivity after T-cell-depleted allogeneic marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1995, 86(10), 3987-3996.
- Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Goldman, J.M., Kersey, J., Kolb, H.J. et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, 1990, 75(3), 555-562.
- Lee, S.J., Klein, J.P., Barrett, A.J., Ringden, O., Antin, J.H., Cahn, J.Y. et al. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood*, 2002, 100(2), 406-414.
- Weiden, P.L., Flournoy, N., Thomas, E.D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C.D. and Storb, R. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med*, 1979, 300(19), 1068-1073.
- Robinet, E., Lapierre, V., Tayebi, H., Kuentz, M., Blaise, D. and Tiberghien, P. Blood versus marrow hematopoietic allogeneic graft. *Transfus Apheresis Sci*, 2003, 29(1), 53-59.
- Storek, J., Dawson, M.A., Storer, B., Stevens-Ayers, T., Maloney, D.G., Marr et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood*, 2001, 97(11), 3380-3389.
- Yakoub-Agha, I., Saule, P., Magro, L., Cracco, P., Duhamel, A., Coiteux, V. et al. Immune reconstitution following myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: the impact of expanding CD28negative CD8+ T cells on relapse. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009, 15(4), 496-504.
- Sallusto, F., Geginat, J. and Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22, 745-763.
- Amyes, E., McMichael, A.J. and Callan, M.F. Human CD4+ T cells are predominantly distributed among six phenotypically and functionally distinct subsets. *J Immunol*, 2005, 175(9), 5765-5773.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999, 401(6754), 708-712.
- Yakoub-Agha, I., Saule, P., Depil, S., Micol, J.B., Grutzmacher, C., Boulanger-Villard et al. A high proportion of donor CD4+ T cells expressing the lymph node-homing chemokine receptor CCR7 increases incidence and severity of acute graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancy. *Leukemia*, 2006, 20(9), 1557-1565.
- Yakoub-Agha, I., Saule, P., Depil, S., Grutzmacher, C., Boulanger, F., Magro, L. et al. Comparative analysis of naive and memory CD4+ and CD8+ T-cell subsets in bone marrow and G-CSF-mobilized peripheral blood stem cell allografts: impact of donor characteristics. *Exp Hematol*, 2007, 35(6), 861-871.
- Bay, J.O., Peffault de Latour, R., Bruno, B., Coiteux, V., Guillaume, T., Hicheri, Y. et al. [Diagnosis and treatment of CMV and EBV Reactivation as well as Post-transplant Lymphoproliferative Disorders following Allogeneic Stem Cell Transplantation: An SFGM-TC report]. *Pathol Biol (Paris)*, 61(4), 152-154.
- Deconinck, E., Dalle, J.H., Berceanu, A., Chevallier, P., Dulery, R., Garnier, A. et al. [How I manage respiratory syncytial virus, human herpesvirus 6 and adenovirus reactivation or infection after allogeneic stem cell transplantation: A report of the SFGM-TC]. *Pathol Biol (Paris)*, 61(4), 149-151.
- Appay, V., Reynard, S., Voelter, V., Romero, P., Speiser, D.E. and Leyvraz, S. Immuno-monitoring of CD8+ T cells in whole blood versus PBMC samples. *J Immunol Methods*, 2006, 309(1-2), 192-199.

- 16 Przepiorka, D., Weisdorf, D., Martin, P., Klingemann, H.G., Beatty, P., Hows, J. and Thomas, E.D. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*, 1995, 15(6), 825-828.
- 17 Cox, D. Regression models and life tables (with discussion). *J R Stat Soc*, 1972, 34, 187-220.
- 18 Yakoub-Agha, I., Mesnil, F., Kuentz, M., Boiron, J.M., Ifrah, N., Milpied, N. et al. Allogeneic marrow stem-cell transplantation from human leukocyte antigen-identical siblings versus human leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors (10/10) in patients with standard-risk hematologic malignancy: a prospective study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy. *J Clin Oncol*, 2006, 24(36), 5695-5702.
- 19 Coghill, J.M., Carlson, M.J., Panoskaltis-Mortari, A., West, M.L., Burgents, J.E., Blazar, B.R. and Serody, J.S. Separation of graft-versus-host disease from graft-versus-leukemia responses by targeting CC-chemokine receptor 7 on donor T cells. *Blood*, 2010, 115(23), 4914-4922.
- 20 Chakraverty, R., Cote, D., Buchli, J., Cotter, P., Hsu, R., Zhao, G. et al. An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. *J Exp Med*, 2006, 203(8), 2021-2031.
- 21 Fujiwara, H., Sconocchia, G., Melenhorst, J., Eniafe, R., Nakamura, R., Hensel, N. and Barrett, A.J. Tissue-restricted T cell alloresponses across HLA barriers: selection and identification of leukemia-restricted CTL in HLA-mismatched stimulator-responder pairs. *Bone Marrow Transplant*, 2003, 32(4), 371-378.
- 22 Michalek, J., Collins, R.H., Durrani, H.P., Vaclavkova, P., Ruff, L.E., Douek, D.C. and Vitetta, E.S. Definitive separation of graft-versus-leukemia- and graft-versus-host-specific CD4+ T cells by virtue of their receptor beta loci sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(3), 1180-1184.
- 23 Yang, Y.G., Qi, J., Wang, M.G. and Sykes, M. Donor-derived interferon gamma separates graft-versus-leukemia effects and graft-versus-host disease induced by donor CD8 T cells. *Blood*, 2002, 99(11), 4207-4215.
- 24 Tiberghien, P. Use of suicide gene-expressing donor T-cells to control alloreactivity after haematopoietic stem cell transplantation. *J Intern Med*, 2001, 249(4), 369-377.
- 25 Andre-Schmutz, I., Le Deist, F., Hacein-Bey, S., Hamel, Y., Vitetta, E., Schindler, J. 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), 2927-2928.
- 26 Anderson, B.E., McNiff, J., Yan, J., Doyle, H., Mamula, M., Shlomchik, M.J. and Shlomchik, W.D. Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease. *J Clin Invest*, 2003, 112(1), 101-108.
- 27 Adams, A.B., Williams, M.A., Jones, T.R., Shirasugi, N., Durham, M.M., Kaech, S.M. et al. Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest*, 2003, 111(12), 1887-1895.
- 28 Bondanza, A., Valtolina, V., Magnani, Z., Ponzoni, M., Fleischhauer, K., Bonyhadi, M. et al. Suicide gene therapy of graft-versus-host disease induced by central memory human T lymphocytes. *Blood*, 2006, 107(5), 1828-1836.
- 29 Chen, B.J., Deoliveira, D., Cui, X., Le, N.T., Son, J., Whitesides, J.F. and Chao, N.J. Inability of memory T cells to induce graft-versus-host disease is a result of an abortive alloresponse. *Blood*, 2006.
- 30 Foster, A.E., Marangolo, M., Sartor, M.M., Alexander, S.I., Hu, M., Bradstock, K.F. and Gottlieb, D.J. Human CD62L- memory T cells are less responsive to alloantigen stimulation than CD62L+ naive T cells: potential for adoptive immunotherapy and allodepletion. *Blood*, 2004, 104(8), 2403-2409.
- 31 Xystrakis, E., Bernard, I., Dejean, A.S., Alsaati, T., Druet, P. and Saoudi, A. Alloreactive CD4 T lymphocytes responsible for acute and chronic graft-versus-host disease are contained within the CD45RChigh but not the CD45RClow subset. *Eur J Immunol*, 2004, 34(2), 408-417.
- 32 Beilhack, A., Schulz, S., Baker, J., Beilhack, G.F., Wieland, C.B., Herman, E.I. et al. In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood*, 2005, 106(3), 1113-1122.
- 33 Dutt, S., Ermann, J., Tseng, D., Liu, Y.P., George, T.I., Fathman, et al. L-selectin and beta7 integrin on donor CD4 T cells are required for the early migration to host mesenteric lymph nodes and acute colitis of graft-versus-host disease. *Blood*, 2005, 106(12), 4009-4015.
- 34 Kim, Y.M., Sachs, T., Asavaroengchai, W., Bronson, R. and Sykes, M. Graft-versus-host disease can be separated from graft-versus-lymphoma effects by control of lymphocyte trafficking with FTY720. *J Clin Invest*, 2003, 111(5), 659-669.
- 35 Li, B., New, J.Y., Tay, Y.K., Goh, E., Yap, E.H., Chan, S.H. and Hu, H.Z. Delaying acute graft-versus-host disease in mouse bone marrow transplantation by treating donor cells with antibodies directed at L-selectin and alpha4-integrin prior to infusion. *Scand J Immunol*, 2004, 59(5), 464-468.
- 36 Sasaki, M., Hasegawa, H., Kohno, M., Inoue, A., Ito, M.R. and Fujita, S. Antagonist of secondary lymphoid-tissue chemokine (CCR ligand 21) prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice. *J Immunol*, 2003, 170(1), 588-596.
- 37 Wysocki, C.A., Panoskaltis-Mortari, A., Blazar, B.R. and Serody, J.S. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*, 2005.

- 38 Arstila, T.P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J. and Kourilsky, P. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science*, 1999, 286(5441), 958-961.
- 39 Macallan, D.C., Wallace, D., Zhang, Y., De Lara, C., Worth, A.T., Ghattas, H. et al. Rapid Turnover of Effector-Memory CD4+ T Cells in Healthy Humans. *J Exp Med*, 2004, 200(2), 255-260.
- 40 Rufer, N., Zippelius, A., Batard, P., Pittet, M.J., Kurth, I., Cortes, P. et al. Ex vivo characterization of human CD8+ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. *Blood*, 2003, 102(5), 1779-1787.
- 41 Geginat, J., Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory and effector memory CD4+ T cells. *Pathol Biol (Paris)*, 2003, 51(2), 64-66.
- 42 Maus, M.V., Kovacs, B., Kwok, W.W., Nepom, G.T., Schlienger, K., Riley, J.L. et al. Extensive replicative capacity of human central memory T cells. *J Immunol*, 2004, 172(11), 6675-6683.
- 43 Ermann, J., Hoffmann, P., Edinger, M., Dutt, S., Blankenberg, F.G., Higgins, J.P. et al. Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood*, 2005, 105(5), 2220-2226.
- 44 Huehn, J., Siegmund, K., Lehmann, J.C., Siewert, C., Haubold, U., Feuerer, M. et al. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med*, 2004, 199(3), 303-313.
- 45 Taylor, P.A., Panoskaltsis-Mortari, A., Swedin, J.M., Lucas, P.J., Gress, R.E., Levine, B.L. et al. L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4+25+ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. *Blood*, 2004, 104(12), 3804-3812.

## **B) L'alloréactivité propre de chaque sous-population lymphocytaire T in vitro dans une situation de compatibilité HLA**

### **1) Justification de l'étude :**

L'analyse des complications cliniques survenues chez les receveurs d'allogreffes de SCH au regard de la composition en cellules T des greffons (MO ou PBSC) a montré une incidence et une sévérité accrues des réactions de GVH aiguës lorsque la proportion en cellules T  $CD4^+CCR7^+$  du greffon était élevée.<sup>184</sup> Par leur expression du récepteur de chimiokine CCR7, ces cellules peuvent correspondre soit à des cellules T  $CD4^+$  naïves soit à cellules T mémoires centrales. Nos résultats concluent à l'influence globale de ces cellules T, mais n'individualisent pas à ce jour un rôle préférentiel de l'une de ces deux sous-populations T.

Si nous voulons à terme moduler l'intensité de la réaction alloréactive gouvernée par les cellules T  $CD4^+CCR7^+$  dans la perspective de mieux contrôler la réaction de GVH, nous devons démontrer clairement l'alloréactivité accrue exercée par ces contingents lymphocytaires T et rechercher si elle concerne préférentiellement les lymphocytes T naïfs ou  $T_{CM}$ . Dans notre étude clinique, il s'agissait dans la quasi-totalité des cas d'allogreffes HLA-identiques, ce qui laisse supposer que le mécanisme des réactions de GVH aiguës reposait majoritairement si non exclusivement sur une activation des cellules T alloréactives du donneur déclenchée par l'allorecognition des antigènes mineurs du receveur présentables par ses allèles HLA.

Notre premier objectif est ainsi d'évaluer l'impact d'une réduction de la proportion de cellules T  $CD4^+CCR7^+$  sur l'intensité de la réponse alloréactive dans un modèle de réaction lymphocytaire mixte allogénique (MLR) primaire *in vitro*. Plusieurs raisons nous conduisent à privilégier cette approche :

- l'utilisation d'un modèle murin ne permettrait pas une évaluation facilement transposable du potentiel des cellules T  $CD4^+CCR7^+$  en raison de l'absence d'une bonne concordance entre la classification phénotypique des sous-populations T naïves

et mémoires centrales chez l'Homme et chez la souris et des différences entre la GVH aiguë humaine et murine expérimentale.

- la réaction lymphocytaire mixte implique majoritairement l'activation directe des cellules T CD4<sup>+</sup> et c'est cette réactivité directe en fonction de l'état de différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> que nous voulons comparer.
- la corrélation établie entre les proportions de cellules T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> dans le sang veineux périphérique et le prélèvement médullaire ou de CSP mobilisées par G-CSF d'un même sujet légitime une étude à partir des cellules T du sang périphérique
- enfin, quelle que soit la méthodologie employée pour mesurer la réponse alloréactive, la pertinence de notre étude *in vitro* exige de nous placer en situation de parfaite compatibilité HLA.

Nous n'ignorons pas les difficultés inhérentes à une telle approche méthodologique. Détecter une réponse alloréactive *in vitro* entre deux sujets HLA-identiques pose un véritable problème. La fréquence des cellules T alloréactives susceptibles d'être activées par les mHA est faible et généralement insuffisante pour entraîner une réponse alloréactive primaire facilement décelable contrairement aux cultures mixtes lymphocytaires classiques HLA-discordantes.<sup>185 186</sup>

Pour être capable de mesurer une réponse T alloréactive vis-à-vis des antigènes mineurs, nous devons disposer d'un modèle de MLR plus sensible. Plusieurs données de la littérature permettent d'envisager son développement :

- l'utilisation de cellules dendritiques matures stimulantes à la place de cellules mononucléées du sang périphérique dans des combinaisons HLA-identiques a été testée pour faciliter la présentation et la reconnaissance de mHA.<sup>187</sup> Dans ces conditions, il est possible d'obtenir pour certaines paires de cellules répondeuses/stimulantes une réponse primaire détectable *in vitro*, d'intensité proportionnelle au nombre de CD stimulantes, même si on ne peut exclure la présentation d'auto-Ag.
- la caractérisation des antigènes mineurs présentables par les cellules stimulantes est aujourd'hui possible. La séquence des amorces pour déterminer par PCR-SSP les antigènes mineurs est disponible<sup>188</sup> et l'algorithme développé par l'équipe de Goulmy (base de données : <http://www.lumc.nl/dbminor>) permet de déterminer quels sont les antigènes mineurs présentables dans le contexte HLA d'un couple donneur/receveur.

Pour mener à bien notre projet, nous avons conduit une étude *in vitro* dont le but est d'avoir une meilleure appréciation des risques d'alloreconnaissance entre deux sujets HLA compatibles. Nous avons étudié 6 couples D/R ayant des incompatibilités en antigènes mineurs. Nous nous sommes intéressés tout particulièrement aux antigènes mHA présents sur le chromosome Y car certains d'entre eux sont présentables par les molécules CMH de classe II. Nous avons privilégiés donc pour notre étude les couples donneurs féminins/receveurs masculins HLA-identiques. Les receveurs HLA-DQB1\*0502/01 sont a priori de bons candidats.<sup>189</sup>

Afin d'induire une réponse primaire détectable entre deux sujets HLA-identiques, nous avons utilisé en tant que cellules stimulantes des CDs dérivées de monocytes.<sup>190</sup> Le manuscrit ci-après détaille la méthode de culture employée ainsi que les résultats.



2) Manuscrit #2

**Naïve subset develops the most important alloreactive response among human CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in HLA-identical related setting.**

**Ce travail a été soumis à la revue European Journal of Hematology. Il a été accepté**

\* Les références citées dans l'article sont listées à la fin de l'article et non pas à la fin de la thèse.

**Naïve subset develops the most important alloreactive response among human CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in HLA-identical related setting.\***

Mathilde Chérel,<sup>1,2\*</sup> Bachra Choufi,<sup>1,3</sup> Jacques Trauet,<sup>1,2\*</sup> Pascale Cracco,<sup>2</sup> Jean-Paul Dessaint,<sup>1,2</sup> Ibrahim Yakoub-Agha,<sup>1,4</sup> Myriam Labalette<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'Immunologie, EA2686, Université Lille 2, France

<sup>2</sup> Institut d'Immunologie, CHRU Lille, France

<sup>3</sup> Service d'Hématologie, CH Boulogne Sur Mer, France

<sup>4</sup> Service des Maladies du Sang, CHRU Lille, France

Mathilde Chérel and Bachra Choufi contributed equally to this study.

Correspondence: Myriam Labalette, MD, PhD. Institut d'Immunologie, Centre de Biologie Pathologie, CHRU, 59037 Lille cedex, France.

Phone: +33 320 44 40 87 Fax: +33 320 44 69 54

E-mail: [myriam.labalette@chru-lille.fr](mailto:myriam.labalette@chru-lille.fr)

Short title: CD4<sup>+</sup> naïve T-cells and alloreactivity

\* This study was supported by grants from the University of Lille 2, EA 2686.

## **ABSTRACT**

In longitudinal clinical studies, receiving a high percentage of allogeneic donor-derived CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T cells which include naïve and central memory subsets has been correlated with increased incidence and severity of acute GVHD. Whether naïve and central memory CD4<sup>+</sup> T cell subsets contribute more or equally to alloimmune responses is still unclear in human. The aim of the present study was to investigate in vitro the alloreactive response of purified naïve, central memory, and effector memory CD4<sup>+</sup> T cell subsets in HLA identical setting. By coculturing monocyte-derived dendritic cells and purified CD4<sup>+</sup> T cell subsets, from healthy HLA-identical male and female sibling pairs, we found that naïve CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T cells developed the highest proliferative response upon stimulation by minor histocompatibility antigens and were progressively driven to produce high levels of interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor, and interleukin-6. Comparatively, the central memory CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>neg</sup> subset proliferated to a lower extent and produced very low amounts of pro-inflammatory cytokines while the CCR7<sup>neg</sup> effector memory CD4<sup>+</sup> subset was unresponsive.

This study demonstrates the superior capacity of naïve CD4<sup>+</sup> T cells to mount a primary alloreactive response as compared to central memory T cells. Their proliferative response associated with a pro-inflammatory differentiation makes them potential acute GVHD inducers. These in vitro results in line with what we have observed in clinical studies and may also lend support to approaches of partial selective T cell depletion for GVHD prevention.

**KEY WORDS:** Naïve T-cells, alloreactivity, GVHD, allogeneic stem cell transplantation, HLA-identical sibling.

## INTRODUCTION

Despite human leukocyte antigen (HLA) matching with the donor, many stem cell allograft recipients develop acute graft-versus-host disease (GVHD), in large part due to minor histocompatibility antigens (mHAgs) disparities.[1, 2] In this setting, mature donor T cells are the primary cellular mediators of GVHD, but they are also essential for successful engraftment and the curative graft-versus-leukemia (GVL) effect. A critical step in the initiation of GVHD is the presentation of alloantigens by host dendritic cells (DCs) [3] that migrate into secondary lymphoid organs.[4] Naïve ( $T_N$ ) and central memory T-cells ( $T_{CM}$ ) lack immediate effector function, but their expression of the lymph node homing receptors L-Selectin (CD62L) and CC-chemokine receptor 7 (CCR7) allows them to colocalize with, and respond to, DCs within lymphoid organs, while effector memory cells ( $T_{EM}$ ) are immediate potent effectors which can migrate through extralymphoid tissues.[5]

Experimental studies have associated the ability to induce GVHD with the  $CD62L^+$  T-cell subsets [6-8] and their efficient access to secondary lymphoid organs.[4, 9, 10] In humans, two prospective studies sustain these experimental findings. In a 9/10 to 10/10 HLA-matched setting, we demonstrated that the incidence and severity of acute GVHD increased with the relative proportion of  $CD4^+CCR7^+$  T cells infused, while influencing neither relapse rates nor other transplantation-related events.[11] Chang et al. confirmed recently that receiving a high dose of  $CD4^+CD62L^+CD45RA^+$  T cells increased the incidence of acute GVHD.[12] Detailed information is missing on the relative frequency of  $CD4^+$  T cells capable of responding to mHAgs disparities within the naïve and the memory T-cell subsets, however. Using monocyte-derived DCs derived from HLA-identical sibling volunteers as stimulators, we assessed comparatively the proliferative and functional response of individual  $CD4^+$  T cell subsets.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Healthy HLA-identical sibling pairs**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from six healthy HLA-identical sibling pairs were collected after they signed informed consent forms approved by our institutional review board. HLA identity was determined in our Tissue Typing Laboratory at the generic level for class I and at the allelic level for class II, using sequence-specific oligonucleotide hybridization.

### **Generation of dendritic cells (DCs) from monocytes**

Monocytes were purified from total PBMCs by negative selection (Dynabeads Mypure Monocyte, Dynal, Invitrogen) and then cultured in complete medium (HEPES-buffered RPMI-1640 with 10% heat-inactivated pool of human AB serum, 2 mM L-Glutamine, and antibiotics) supplemented with rh IL-4 (15 ng/mL, Immunotools) and rh GM-CSF (25 ng/mL, Immunotools). After 5 days, rh TNF- $\alpha$  (10 ng/mL, Immunotools), rh IL-1 $\beta$  (10 ng/mL, PeproTech), rh IL-6 (10 ng/mL, PeproTech) and prostaglandin E2 (1  $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich) were added for 3 days to mature the cells fully. Maturation of DCs was controlled by immunophenotyping by their lack of CD14 expression and their high expression of CD40 (Beckman Coulter), HLA-DR, CD80, and CD83 (Becton Dickinson).

### **Cell sorting of CD4<sup>+</sup> T-cell subsets**

PBMCs were first depleted of CD8<sup>+</sup> cells (Dynabeads CD8, Dynal, Invitrogen). The remaining cells were labelled with anti-CD4-PC5, anti-CD45RA-FITC (Beckman Coulter), and anti-CCR7-PE (R&D systems) and sorted out by a FACS ARIA (Becton Dickinson). Purities of CD4<sup>+</sup> naive (T<sub>N</sub>, CCR7<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>), central memory (T<sub>CM</sub>, CCR7<sup>+</sup> CD45RA<sup>neg</sup>), and effector memory (T<sub>EM</sub>, CCR7<sup>neg</sup> CD45RA<sup>neg</sup>) T-cell subsets were > 99% as determined by reanalysis immediately after sorting.

### **One-way Mixed Lymphocyte Dendritic Cell (MLDC) Reactions**

Purified CD4<sup>+</sup> T<sub>N</sub>, T<sub>CM</sub>, and T<sub>EM</sub> subsets (1 x 10<sup>5</sup> cells/well) used as responders were cocultured with stimulator mature DCs from the other HLA-identical sibling (1 x 10<sup>4</sup> cells/well) in complete RPMI medium in U-bottom 96-well plates (BD Biosciences) for increased sensitivity to low precursor frequencies. Autologous DCs were used in control cocultures run in parallel. After 5 or 10 days, MLDC cultures were pulsed for the last 18 hrs with .5 μCi/well (18.5 kBq/well) of [<sup>3</sup>H]-thymidine and then harvested for microbeta scintillation counting (PerkinElmer, Waltham). Fresh allogeneic stimulators derived from the same donor as original stimulator were, or were not, added on day 5 of MLDC reactions run in parallel for a further 5 days.

### **Measurement of cytokine production**

For interferon-γ enzyme-linked immunosorbent spot assays (IFN-γ ELISPOT), MLDC cultures were initiated with 1.5 x 10<sup>5</sup> T cells of each subset and harvested after 5 and 10 days with or without add-back of allogeneic stimulators on day 5. Cells were washed twice and 1 x 10<sup>5</sup> viable cells were returned to culture for an additional 20 hr in immunospot plates coated with a monoclonal antibody to IFN-γ, without addition of fresh stimulator cells. IFN-γ spots were enumerated following the manufacturer's instructions by using TB Scan software (TB-SPOT TB, Oxford Immunotech).

For measurement of IFN-γ, IL-10, IL-17A, IL-2, IL-4, IL-6 and TNF in day 5 and 10 supernatants of MLDC cultures, BD Cytometric Bead Arrays (Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, BD Biosciences) were used.

### **STATISTICS**

The results are expressed as medians (range). The Friedman two-way analysis on ranks was used to analyze results of cocultures as a complete block design. In case of significance, the least significant difference in ranks was calculated to compare allogeneic and

autologous responses and then the response of CD4<sup>+</sup> T cell subsets across the allogeneic MLDC cultures tested. The Kruskal-Wallis test was used to compare the response of naïve CD4<sup>+</sup> T cells over sequential time points. SPSS software (SPSS, Chicago, IL, v19) was used for all calculations.

## RESULTS

### **Naïve CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-cells develop the highest allogeneic proliferative response.**

The proliferative response of purified CD4<sup>+</sup> naïve, central memory and effector memory T cell subsets was determined individually in primary one-way MLDC reactions among HLA-identical sibling pairs. Five of the donor pairs were brothers and sisters positive for one known HY-restricting HLA class II alleles (Table 1).[13-15] T-cell subsets were purified from the sister and DCs were derived from her HLA-identical brother, whereby stimulator DCs could present at least unmatched HY to responder T cells. Overall, proliferative alloresponses were induced in four of these five pairs (Figure 1). In these responsive pairs, naïve CD4<sup>+</sup> T-cells were consistently found to be the best responders; their stimulation indices ranged between 1.75 and 3.85, with low variability among the triplicates (median coefficient of variation 12.4%). CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> proliferated to a limited extent (median stimulation indices: 1.10 – 2.85), albeit never with higher alloresponses than the corresponding naïve subset. No proliferative response was observed with CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>. Absence of precocious expansion and overgrowth of memory cells was verified by daily microscopic examination of MLDC cultures. The naïve CD4<sup>+</sup> T-cells stimulated by HLA-identical DCs from a same-sexed sibling (MLDC #6, Figure 1) responded also, with a stimulation index of 1.96.

In all responsive sibling pairs, the naïve CD4<sup>+</sup> T-cell subset was still found to proliferate the most at day 10 in MLDC allogeneic cultures ( $P < .025$  versus T<sub>CM</sub>/T<sub>EM</sub>), with or

without add-back of allogeneic DCs on day 5 ( $P < .05$  versus  $T_{CM}/T_{EM}$ ; data not shown). Absence of proliferative response with the sibling pair #1 was neither attributable to a delayed alloresponse, since thymidine incorporation on day 10 remained the same as with autologous DCs, nor to insufficient maturation of stimulator DCs, as their expression of HLA-DR, CD40, CD80 and CD83 was as high as on DCs from the other donors. T-cell viability by the end of cocultures from pair #1 was also similar to that of the other MLDC cultures ( $> 90\%$  for all subsets, data not shown).

### **Responding naïve $CD4^+$ T-cells develop proinflammatory cytokine-producing capacities**

To evaluate whether the naïve T-cells that proliferated in MLDC cultures acquired functional capacities, IFN- $\gamma$ -producing cells were enumerated in parallel experiments. Viable cells harvested on day 5 from MLDC cultures initiated with naïve  $CD4^+$  T cells yielded no or only a few IFN- $\gamma$  spots, but  $CD4^+$   $T_{CM}$  or  $T_{EM}$  did not produce more IFN- $\gamma$ . The number of originally naïve IFN- $\gamma$ -producing cells increased from day 5 to day 10, while still very few were enumerated from the  $T_{CM}$  and  $T_{EM}$  MLDC cultures ( $P < .009$  at day 10) (Figure 2A).

We extended this functional analysis by measuring IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17A, IL-2, IL-4, IL-6 and TNF in supernatants of MLDC cultures. Overall, levels of IL-2, IL-4, IL-17A and IL-10 fell below the detection limits of the cytometric bead arrays (20 pg/mL). IFN- $\gamma$  was confirmed to accumulate in MLDC cultures of naïve  $CD4^+$  T-cells, together with TNF and IL-6 (Figure 2B). In supernatants of the  $T_{CM}$  and  $T_{EM}$  MLDC cultures, levels of these three cytokines remained at values of 20 pg/mL or lower, even after add-back of fresh allogeneic stimulators on day 5 of 10 days MLDC reactions (data not shown).

No cytokine production was detected in the MLDC culture #1 that did not respond by proliferating.



## DISCUSSION

The main finding of this study is that the naïve CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T cell subset displayed the most significant alloreactive response as compared to central CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>neg</sup> and effector CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>neg</sup>CD45RA<sup>neg</sup> T memory cell subsets. Their proliferative response associated with their pro-inflammatory differentiation makes naïve CD4<sup>+</sup> T cells potential GVHD and GVL inducers. To our knowledge, this is the first study investigated the alloreactive responses of human naïve T cells in HLA-identical settings. Our results are in line with what have been reported by others.[6, 16]

In order to make our experiments as close as possible to clinical conditions, we decided to use HLA-identical sibling pairs. In contrast to HLA-mismatched reactions, cultures of HLA-matched pairs led to weak allogenic responses. That is why we preferred monocyte-derived DCs as stimulator cells instead of the “classical” peripheral blood mononuclear cells, which include a small amount of DC. Indeed, DCs are regarded as the principal cells capable of inducing naïve T cell responses and as relevant stimulators for alloresponses in vivo.[3] Obtaining sufficient numbers of purified DCs would need drawing large volumes of blood from healthy volunteers. Monocyte-derived DCs were used as stimulators since these cells are known to highly express mHAg.[17] These latter are known to be involved in primary one-way MLDC reactions in HLA-identical cultures.

To ascertain at least one mHAg disparity, five opposite-sexed HLA-identical sibling pairs (# 1-5) positive for HLA-DRB1\*15:01 or HLA-DQB1\*05:02, which are known to process HY peptides, were tested in the female responder-to-male stimulator combination. T-cell subsets were purified from the sister and DCs were derived from her HLA-identical brother, whereby stimulator DCs could present at least unmatched HY to responder T-cells. Indeed, male-specific HY antigens are known to be processed by HLA-class II molecules[13-15] and are immunodominant mHAg, being clinically associated with higher rates of GVHD

but relative protection from relapse after HLA-matched female to male allografts.[18-20] No anti-HY blocking studies were performed, but autosomal mHAg may also be involved. Of note, a positive response was also obtained with a same-sexed pair (#6), suggesting that stimulator cells may express currently non identified HLA class II-restricted mHAg. This raises the possibility that our results may be generalized to at least some of the non-HY mHAg which are restricted to HLA class II.

One-way MLDC cultures were established without addition of exogenous growth factors, to recapitulate as much as possible cell interactions that lead to alloresponses in vivo, in which case the responding cells produce IL-2 and other growth factors by themselves. MLDC cultures were run for 5 days and 10 days (with or without add-back of allogeneic DCs on day 5), based on reports in HLA-disparate reactions showing that unfractionated CD4<sup>+</sup> T-cells undergo a proliferative burst across this time span [21] and cytokine production becomes evident after about 5 days.[22] Likewise, memory CD4<sup>+</sup> T-cell responses depend on the duration of the secondary stimulus.[23] Overall, in these culture conditions, stimulations indices of responsive pairs ranged similar to those reported using unfractionated T-cells in HLA-identical MLDC reactions.[24, 25] Using highly purified naïve CD4<sup>+</sup> T-cells, primary proliferative alloresponses were induced in 5 of 6 MLDC reactions. Not surprisingly, some variability in responsiveness between the HLA-identical pairs was observed, however with low variability among triplicates.

In five of the six responder/stimulator combinations tested, purified CD4<sup>+</sup> central memory cells were found to proliferate in response to mHAg presented by allogeneic DCs, albeit less than the corresponding naïve subset, and no proliferative response was detected with CD4<sup>+</sup> effector memory cells, consistent with the decreasing expansion potential from T<sub>CM</sub> to T<sub>EM</sub>. [5] Daily microscopic examination of MLDC cultures verified that the observed differences were not occasioned by precocious expansion and overgrowth of memory cells.

In contrast to what might be expected from memory subsets, both CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> and T<sub>EM</sub> cells produced low amounts of cytokines when exposed to disparate mHAGs. Inasmuch as less than 20 ng/mL of IFN- $\gamma$  and other cytokines accumulated in supernatants of MLDC cultures initiated with memory subsets harvested after 5 and 10 days, even after add-back of allogeneic DCs by day +5, this suggests that recall alloresponses were at most of low intensity, in contrast with ongoing alloresponses initiated with the naïve subset. The relative contribution of naïve and memory T-cells has only been tested with HLA-mismatched responder/stimulator cell combinations. Some reports concluded that human CD62L<sup>+</sup> T-cells contain much of the alloreactivity[16, 26], whereas others reported on comparable alloreactive frequencies in naïve and memory subsets.[27, 28] The limited number of HLA-identical sibling pairs tested does not allow ruling out that clinically relevant memory CD4<sup>+</sup> T-cells reactive to mHAGs can be found in some donors, but as regards the CD4<sup>+</sup> T-cell population, the evidence reported here conclusively shows that most of the alloreactivity resides within the naïve subset.

The challenge of allogeneic stem cell transplantation for treatment of hematologic malignancies is avoiding GVHD without losing the GVL effect. These opposite effects might depend critically on different thresholds of T-cell subsets.[11, 12] The evidence presented here that naïve and to a less extent the central memory CD4<sup>+</sup> T cells, contain most of the alloreactivity to mHAGs strengthens the idea that a partial selective depletion of CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T-cells from allografts that would transfer too much of this subset to the recipient might be clinically applicable to reduce the risk of acute GVHD, without compromising the immunologic efficacy of stem cell transplantation.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank all healthy volunteers who accepted to participate in this study and the association Capucine for their generous support to our clinical and basic research work.

**Table 1. HLA typing results of the 6 sibling pairs.** Five out of 6 sibling pairs (#1 to 5) were male/female (M/F) pairs carrying one of known HY-restricting HLA-DR or HLA-DQ alleles (underlined).

Sib Pair #	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR	HLA-DQ
<b>1</b>	<b>A01</b>	<b>B07</b>	<b>Cw07</b>	<u><b>DRB1*15:01</b></u>	<b>DQB1*06:02</b>
	<b>A29</b>	<b>B08</b>		<b>DRB1*09:01</b>	<b>DQB1*03:03</b>
<b>2</b>	<b>A02</b>	<b>B44</b>	<b>Cw05</b>	<b>DRB1*10:01</b>	<u><b>DQB1*05:01</b></u>
				<b>DRB1*11:01</b>	<b>DQB1*03:01</b>
<b>3</b>	<b>A01</b>	<b>B44</b>	<b>Cw16</b>	<u><b>DRB1*15:01</b></u>	<b>DQB1*06:02</b>
	<b>A30</b>	<b>B57</b>	<b>Cw06</b>	<b>DRB1*07:01</b>	<b>DQB1*02:02</b>
<b>4</b>	<b>A02</b>	<b>B27</b>	<b>Cw01</b>	<b>DRB1*01:01</b>	<u><b>DQB1*05:01</b></u>
	<b>A24</b>	<b>B62</b>	<b>Cw03</b>	<b>DRB1*13:01</b>	<b>DQB1*06:03</b>
<b>5</b>	<b>A03</b>	<b>B07</b>	<b>Cw07</b>	<u><b>DRB1*15:01</b></u>	<b>DQB1*06:02</b>
	<b>A24</b>	<b>B08</b>		<b>DRB1*03:01</b>	<b>DQB1*02:01</b>
<b>6</b>	<b>A24</b>	<b>B44, Bw4</b>	<b>Cw05</b>	<b>DRB1*01:01</b>	<b>DQB1*05:01</b>
	<b>A29</b>	<b>B60, Bw6</b>	<b>Cw03</b>	<b>DRB1*14:54</b>	<b>DQB1*05:03</b>

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Comparative analysis of the allogeneic proliferative response of naïve and memory CD4<sup>+</sup> T cell subsets.** (A) Flow sorting criteria for purification of the CD4<sup>+</sup> naïve (T<sub>N</sub>, CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), central memory (T<sub>CM</sub>, CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), and effector memory (T<sub>EM</sub>, CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>) subsets used as responder cells. (B) Proliferative response of individual CD4<sup>+</sup> T cell subsets measured at day 5 in MLDC allogeneic cocultures. For each of the five male/female sibling pairs (# 1 – 5), responder cells were purified from the sister and DCs were derived from her HLA-identical brother. For the female/female sibling pair, T-cell subsets from one sibling were tested against DCs from her HLA-identical sister (# 6). Data are graphed as stimulation index (ratio of cpm in individual allogeneic coculture wells to the median of cpm in triplicate autologous coculture wells (< 2000 cpm in all pair tested)). Histograms present the median and error bars: the smaller and larger stimulation indices of triplicate cocultures. P = .002 by Friedman test. A stimulation index higher than 1.38 was found to be significant at the .05 level in each pair tested by comparison of the allogeneic versus the autologous cultures and is depicted by a dashed line. Post hoc P values comparing proliferative alloresponses of the three subsets are shown.

**Figure 2. Comparative analysis of cytokine production of naïve and memory CD4<sup>+</sup> T cell subsets.** (A) Purified CD4<sup>+</sup> naïve, central memory, and effector memory subsets were cocultured with HLA-identical DCs from sibling donors for 5 and 10 days. The frequencies of alloreactive cells secreting IFN- $\gamma$  within individual subsets were evaluated by IFN- $\gamma$  ELISPOT after the indicated MLDC culture period. The results are expressed as number of spots from allogeneic coculture wells minus number of spots from autologous coculture wells. Median (range) is given for all allogeneic MLDC cultures tested P value by Friedman test. (B) Cytokine levels in supernatants of MLDC cultures initiated with CD4<sup>+</sup> naïve T cell subsets.

Supernatants from cultures were harvested at different time points as indicated. Medians (histogram) and maximum (error bar) cytokine concentrations are shown for all allogeneic MLDC cultures tested. P value by Kruskal-Wallis test (\*\* P <.01; \*\*\* P <.001).

## REFERENCES

- 1 Hambach, L., Spierings, E. and Goulmy, E. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Minor histocompatibility antigens. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007, 20(2), 171-187.
- 2 Spierings, E., Kim, Y.H., Hendriks, M., Borst, E., Sergeant, R., Canossi, A., Oudshoorn, M., Loiseau, P., Dolstra, H., Markiewicz, M., Leffell, M.S., Pereira, N., Kircher, B., Turpeinen, H., Eliaou, J.F., Gervais, T., Laurin, D., Enczmann, J., Martinetti, M., Thomson, J., Oguz, F., Santarone, S., Partanen, J., Siekiera, U., Alessandrino, E.P., Kalayoglu, S., Brand, R. and Goulmy, E. Multicenter analyses demonstrate significant clinical effects of minor histocompatibility antigens on GvHD and GvL after HLA-matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2013, 19(8), 1244-1253.
- 3 Chakraverty, R. and Sykes, M. The role of antigen-presenting cells in triggering graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia. *Blood*, 2007, 110(1), 9-17.
- 4 Beilhack, A., Schulz, S., Baker, J., Beilhack, G.F., Nishimura, R., Baker, E.M., Landan, G., Herman, E.I., Butcher, E.C., Contag, C.H. and Negrin, R.S. Prevention of acute graft-versus-host disease by blocking T-cell entry to secondary lymphoid organs. *Blood*, 2008, 111(5), 2919-2928.
- 5 Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999, 401(6754), 708-712.
- 6 Anderson, B.E., McNiff, J., Yan, J., Doyle, H., Mamula, M., Shlomchik, M.J. and Shlomchik, W.D. Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease. *J Clin Invest*, 2003, 112(1), 101-108.
- 7 Chen, B.J., Cui, X., Sempowski, G.D., Liu, C. and Chao, N.J. Transfer of allogeneic CD62L- memory T cells without graft-versus-host disease. *Blood*, 2004, 103(4), 1534-1541.
- 8 Zheng, H., Matte-Martone, C., Li, H., Anderson, B.E., Venketesan, S., Sheng Tan, H., Jain, D., McNiff, J. and Shlomchik, W.D. Effector memory CD4+ T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease. *Blood*, 2008, 111(4), 2476-2484.
- 9 Coghill, J.M., Carlson, M.J., Panoskaltsis-Mortari, A., West, M.L., Burgents, J.E., Blazar, B.R. and Serody, J.S. Separation of graft-versus-host disease from graft-versus-leukemia responses by targeting CC-chemokine receptor 7 on donor T cells. *Blood*, 2010, 115(23), 4914-4922.
- 10 Anderson, B.E., Taylor, P.A., McNiff, J.M., Jain, D., Demetris, A.J., Panoskaltsis-Mortari, A., Ager, A., Blazar, B.R., Shlomchik, W.D. and Shlomchik, M.J. Effects of donor T-cell trafficking and priming site on graft-versus-host disease induction by naive and memory phenotype CD4 T cells. *Blood*, 2008, 111(10), 5242-5251.
- 11 Yakoub-Agha, I., Saule, P., Depil, S., Micol, J.B., Grutzmacher, C., Boulanger-Villard, F., Bauters, F., Jouet, J.P., Dessaint, J.P. and Labalette, M. A high proportion of

- donor CD4<sup>+</sup> T cells expressing the lymph node-homing chemokine receptor CCR7 increases incidence and severity of acute graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancy. *Leukemia*, 2006, 20(9), 1557-1565.
- 12 Chang, Y.J., Zhao, X.Y., Huo, M.R. and Huang, X.J. Expression of CD62L on donor CD4(+) T cells in allografts: correlation with graft-versus-host disease after unmanipulated allogeneic blood and marrow transplantation. *J Clin Immunol*, 2009, 29(5), 696-704.
- 13 Spierings, E., Vermeulen, C.J., Vogt, M.H., Doerner, L.E., Falkenburg, J.H., Mutis, T. and Goulmy, E. Identification of HLA class II-restricted H-Y-specific T-helper epitope evoking CD4<sup>+</sup> T-helper cells in H-Y-mismatched transplantation. *Lancet*, 2003, 362(9384), 610-615.
- 14 Zorn, E., Miklos, D.B., Floyd, B.H., Mattes-Ritz, A., Guo, L., Soiffer, R.J., Antin, J.H. and Ritz, J. Minor histocompatibility antigen DBY elicits a coordinated B and T cell response after allogeneic stem cell transplantation. *J Exp Med*, 2004, 199(8), 1133-1142.
- 15 Vogt, M.H., van den Muijsenberg, J.W., Goulmy, E., Spierings, E., Kluck, P., Kester, M.G., van Soest, R.A., Drijfhout, J.W., Willemze, R. and Falkenburg, J.H. The DBY gene codes for an HLA-DQ5-restricted human male-specific minor histocompatibility antigen involved in graft-versus-host disease. *Blood*, 2002, 99(8), 3027-3032.
- 16 Foster, A.E., Marangolo, M., Sartor, M.M., Alexander, S.I., Hu, M., Bradstock, K.F. and Gottlieb, D.J. Human CD62L<sup>-</sup> memory T cells are less responsive to alloantigen stimulation than CD62L<sup>+</sup> naive T cells: potential for adoptive immunotherapy and allodepletion. *Blood*, 2004, 104(8), 2403-2409.
- 17 Stumpf, A.N., van der Meijden, E.D., van Bergen, C.A., Willemze, R., Falkenburg, J.H. and Griffioen, M. Identification of 4 new HLA-DR-restricted minor histocompatibility antigens as hematopoietic targets in antitumor immunity. *Blood*, 2009, 114(17), 3684-3692.
- 18 Randolph, S.S., Gooley, T.A., Warren, E.H., Appelbaum, F.R. and Riddell, S.R. Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. *Blood*, 2004, 103(1), 347-352.
- 19 Stern, M., Brand, R., de Witte, T., Sureda, A., Rocha, V., Passweg, J., Baldomero, H., Niederwieser, D. and Gratwohl, A. Female-versus-male alloreactivity as a model for minor histocompatibility antigens in hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Transplant*, 2008, 8(10), 2149-2157.
- 20 Loren, A.W., Bunin, G.R., Boudreau, C., Champlin, R.E., Cnaan, A., Horowitz, M.M., Loberiza, F.R. and Porter, D.L. Impact of donor and recipient sex and parity on outcomes of HLA-identical sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2006, 12(7), 758-769.
- 21 Godfrey, W.R., Krampf, M.R., Taylor, P.A. and Blazar, B.R. Ex vivo depletion of alloreactive cells based on CFSE dye dilution, activation antigen selection, and dendritic cell stimulation. *Blood*, 2004, 103(3), 1158-1165.
- 22 Martins, S.L., St John, L.S., Champlin, R.E., Wieder, E.D., McMannis, J., Molldrem, J.J. and Komanduri, K.V. Functional assessment and specific depletion of alloreactive human T cells using flow cytometry. *Blood*, 2004, 104(12), 3429-3436.
- 23 Ravkov, E.V. and Williams, M.A. The magnitude of CD4<sup>+</sup> T cell recall responses is controlled by the duration of the secondary stimulus. *J Immunol*, 2009, 183(4), 2382-2389.
- 24 Eljaafari, A., Farre, A., Duperrier, K., Even, J., Vie, H., Michallet, M., Souillet, G., Catherine Freidel, A., Gebuhrer, L. and Rigal, D. Generation of helper and cytotoxic CD4<sup>+</sup>T cell clones specific for the minor histocompatibility antigen H-Y, after in vitro priming of human T cells by HLA-identical monocyte-derived dendritic cells. *Transplantation*, 2001, 71(10), 1449-1455.

- 25 Jin, Y., Hernandez, A., Fuller, L., Rosen, A., Cirocco, R., Esquenazi, V., Ciancio, G., Burke, G.W. and Miller, J. A Novel Approach to Detect Donor/Recipient Immune Responses Between HLA-Identical Pairs. *Hum Immunol*, 2007, 68(5), 350-361.
- 26 Lonial, S., Torre, C., David, E., Harris, W., Arellano, M. and Waller, E.K. Regulation of alloimmune responses by dendritic cell subsets. *Exp Hematol*, 2008, 36(10), 1309-1317.
- 27 Macedo, C., Orkis, E.A., Popescu, I., Elinoff, B.D., Zeevi, A., Shapiro, R., Lakkis, F.G. and Metes, D. Contribution of naive and memory T-cell populations to the human alloimmune response. *Am J Transplant*, 2009, 9(9), 2057-2066.
- 28 Litjens, N.H., van de Wetering, J., van Besouw, N.M. and Betjes, M.G. The human alloreactive CD4+ T-cell repertoire is biased to a Th17 response and the frequency is inversely related to the number of HLA class II mismatches. *Blood*, 2009, 114(18), 3947-3955.



Figure 1:

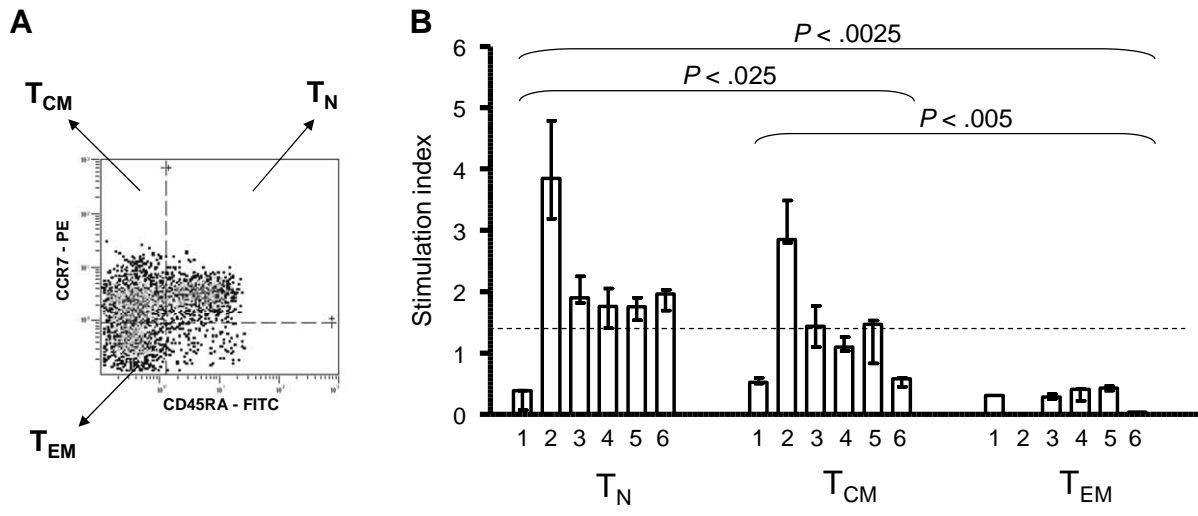
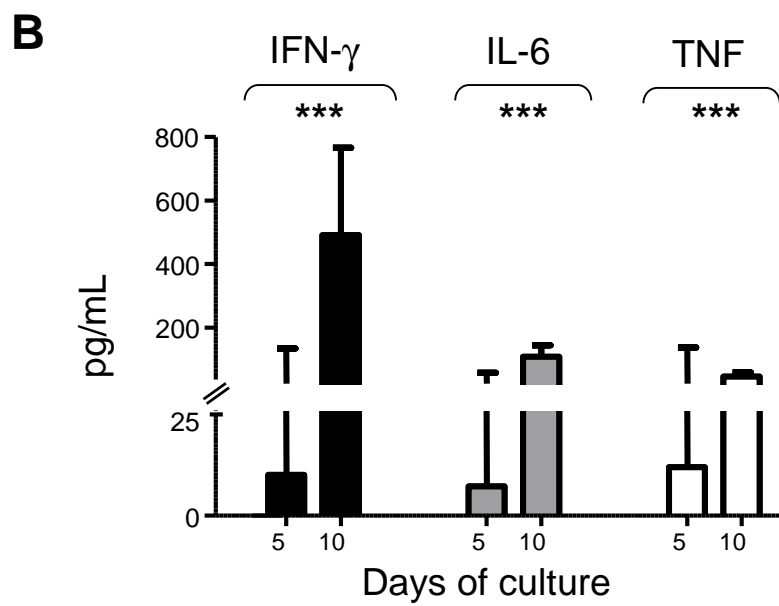


Figure 2 :

**A**

	Number of IFN- $\gamma$ spots			<i>P</i>
	Median (range)			
CD4 <sup>+</sup>	T <sub>N</sub>	T <sub>CM</sub>	T <sub>EM</sub>	
Day 5	21 (0-269)	0 (0-9)	1 (0-9)	.13
Day 10	120 (0-174)	0 (0-2)	0 (0-0)	.009



### 3) Interprétation

Afin de tester le rôle respectif des cellules T naïves et des cellules T mémoires centrales, un tri plus élaboré des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> et CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>neg</sup> mémoires centrales a été conduit avant la mise en œuvre de la MLR.

Notre approche était différente du travail présenté par Foster et al.<sup>139</sup> qui ont étudié l'alloréactivité des fractions CD62L<sup>+</sup> et CD62L<sup>neg</sup> séparément et sans tenir compte de leur lignage CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> vis-à-vis de cellules stimulantes HLA incompatibles. Les cellules testées avaient, par ailleurs, subi une expansion *in vitro* ce qui peut modifier profondément leur phénotype et leur fonctionnalité. Nous prévoyons de travailler sur prélèvements frais qui n'ont subi aucune modification autre que l'appauvrissement en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>. Un autre point mérite d'être soulevé qui est l'expression plus large du CD62L par rapport au CCR7 notamment sur certaines cellules mémoires effectrices,<sup>103</sup> ce qui justifie notre choix du récepteur CCR7.

Cette étude démontre que la réaction allogénique a été déclenchée préférentiellement par la sous population des lymphocytes CD4<sup>+</sup> naïfs et d'une façon moins marquée par les lymphocytes T<sub>CM</sub>. Nous avons constaté une quasi absence de réaction par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteur mémoire. Ces résultats vont parfaitement dans le sens de notre constatation clinique

### C) Maintien de la réponse antivirale après déplétion partielle et sélective des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>.

#### 1) Justification de l'étude

L'immunité anti-infectieuse conférée par les cellules T présentes dans le greffon est précieuse pour le receveur. Elle est certes supportée par les différentes cellules T CD8<sup>+</sup> mémoires mais aussi par les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires centrales et éventuellement les cellules CD4<sup>+</sup> naïves si le donneur n'était pas immunisé vis-à-vis du germe considéré. Nous

étudierons par conséquent les effets d'une réduction de la proportion de cellules T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> sur la capacité de réponse à des différents antigènes viraux.

En fait, nous avons voulu par ce travail de vérifier l'intégrité de l'immunité anamnestic antiinfectieuse après déplétion partielle et sélective en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>.

Chez les donneurs immunocompétents, l'immunité anamnestic antiinfectieuse est supportée essentiellement par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Le but de ce travail était de s'assurer de l'absence d'éventuel effet délétère de la manipulation sur les réactions immunologiques dites secondaires vis-à-vis des agents infectieux notamment viraux. Cet éventuel impact pourrait être liée soit à la manipulation des cellules par les techniques de tri cellulaire ou bien par un défaut de coopération cellulaire CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> suite à la déplétion.

## 2) Manuscrit #3

**Donor-derived CD4<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T cell partial selective depletion does not alter acquired anti-infective immunity.**

**Ce travail a été soumis à la revue Bone Marrow Transplantation. Il a été accepté**

\* Les références citées dans l'article sont listées à la fin de l'article et non pas à la fin de la thèse.

**Donor-derived CD4<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T cell partial selective depletion does not alter acquired anti-infective immunity.**

Bachra Choufi,<sup>1,2</sup> Jacques Trauet,<sup>2,3</sup> Stéphanie Thiant,<sup>2,3</sup> Myriam Labalette<sup>2,3</sup> and Ibrahim Yakoub-Agha<sup>2,4</sup>.

Service d'hématologie, CH, Boulogne Sur Mer, France.

EA2686

Laboratoire d'Immunologie, CHRU, Lille, France

Maladies du Sang, CHRU, Lille, France

Corresponding author:

Prof. Ibrahim Yakoub-Agha, MD, Ph.D

UAM allogreffes de CSH

CHRU

F-59037 Lille CEDEX

France.

Tel : ++333(0)20.44.55.51

Fax : ++333(0)20.44.40.94

E-mail : i-yakoub-agma@chru-lille.fr

Running title: CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T cell depletion for allo-SCT

Keywords: Allogeneic, Transplantation, anti-infective immunity, T cell depletion

Funding: Association Capucine

## **Abstract**

In previous studies we observed that a high proportion of donor-derived CD4<sup>+</sup>T cells expressing the –chemokine receptor 7 (CCR7) was a major determinant of acute GVHD, without interfering with incidence of other post-transplant outcomes especially relapse and non-relapse mortality rates. Here we investigated in vitro the impact of partial selective CD4<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T lymphocytes on acquired anti-infective immune response in 10 donors who underwent G-CSF-primed peripheral blood stem cell collection. Similar quantitative and functional proliferative reactions were observed in lymphocyte cultures in the presence of adenovirus antigen and pp65 antigen with unmanipulated and partially depleted donor samples. No responses were observed in the presence of HTLV1 used as a negative control. These results complete the proof-of-concept needed to build clinical trial investigating partial selective CD4<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation.

## Introduction

Allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) offers a curative therapeutic approach in a wide range of otherwise fatal hematological diseases.[1, 2] The success largely depends on transplanted T cells, but alloreactive T cells from the graft can also initiate acute Graft-Versus-Host Disease (aGVHD),[3-7] a major complication responsible for high incidence of morbidity and mortality.

Initial trials with T-cell depleted allo-SCT were effective in reducing aGVHD, but with an increase of relapse incidences and infectious complications.[3] Although, variable success in the reduction of aGVHD incidence and/or severity without alteration of graft-versus-leukemia responses (GVL) could be obtained with the use of manipulated grafts either *ex-vivo* [7-13] or *in vivo* by using, as part of conditioning regimens, polyclonal antibodies like antithymocyte globulin[14] or monoclonal antibodies against CD52,[15] separation of GVHD from GVL responses and anti-infective effect is still an elusive goal. Although panlymphocyte depletion resulted in significantly less GVHD, there was increased incidence of viral and opportunistic infections and relapse, leading to an absence of significant improvement on overall survival.

In previous two clinical prospective studies that investigated the impact of infused donor-derived T cell subsets on patients' outcome, we observed that a high proportion of CD4<sup>+</sup>T cells expressing CCR7 (naive and central memory) is a major determinant of aGVHD, without interfering with incidence of other post-transplant complications mainly relapse.[16] These results confirm experimental data showing that cells with an effector memory phenotype do not induce GVHD if purified from unprimed donors, while preserving immune reconstitution.[17, 18]



In a murine model using CCR7<sup>neg/neg</sup> donor T cells, Coghill et al, demonstrated superior allo-CST outcome due to a reduced incidence of GVHD with preserved GVL responses.[19]

Taken together, all these studies suggest that determining the proportion of CCR7-expressing CD4<sup>+</sup> T cells in the allograft would provide an important predictive indicator of aGVHD and thus, CD4<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T cell partial selective depletion may represent a viable treatment option for the prevention of acute GVHD in the clinical setting.

While donor-derived T cell partial and selective depletion would have a little impact on the ability of T naïve cells to mount robust GVL responses, no study has specifically investigated the role of such manipulation on anti-infective immunity. Here, we show that reducing the proportion of CD4<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T cell in PBSC graft does not alter donor required anti-infective responses.

This study represents a step forward in a proof-of-concept data and completes the background needed to set up a first-in-human partial selective CD4<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T cell-depleted allo-CST phase I clinical trial.

## **Materials and Methods**

### **Donors**

The study design has been approved by the ethics committee of the Lille University Hospital, and all donors included have given their informed consent. Because in France use of G-CSF is

not allowed in healthy minor donors, all of our ten PBSC donors were older than 18 years. All donors were tested for anti-Human T-cell Lymphotropic virus type 1 (HTLV-1), anti-cytomegalovirus (CMV), anti-adenovirus (ADV) and donor serologic results are summarized in Table 1. For each donor included (7 male and 3 female), one milliliter final product of PBSC was processed in the laboratory within 6 hours.

### **Multiparameter flow-cytometric analysis**

Graft samples were stained without further separation shortly after collection. Directly conjugated antibodies to CD45, CD3, CD4, CD8, CD45RA and isotype controls were from Beckman Coulter (Galway, Ireland), and CCR7 from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). After staining (concentrations according to manufacturers' instructions), relative proportions of CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells were evaluated within the total graft lymphocytes and the relative proportion of naïve and memory CD4<sup>+</sup> T cell subsets were determined within the total CD4<sup>+</sup> T cells. The BD FACS Aria cell sorter was used both for flow cytometry analysis and cell sorting.

#### Cell sorting

Freshly PBSCs were first labelled with anti-CD45-KO, anti-CD4-APC-H7 and anti-CCR7-APC and then sorted simultaneously into CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> T lymphocytes (ie naïve and central memory CD4<sup>+</sup> T cells) and CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> depleted PBMCs. A fraction of the sorted CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T cells were then mixed to the CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> depleted PBMC pool to prepare a PBMC suspension reaching a final proportion of CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T cells reduced to 50% of the total CD4<sup>+</sup> T cells. Thus, two suspensions of PBMCs were prepared for each graft sample: unmanipulated PBMCs or CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> partially depleted PBMCs.

#### Antigen stimulation

PBMC suspensions were cultured in complete medium (HEPES-buffered RPMI-1640 with 10% heat-inactivated pool of human AB serum, 2 mM L-Glutamine, and antibiotics) and incubated at 37°C/5% CO<sub>2</sub>. 2 x 10<sup>5</sup> un-manipulated PBMCs/well or 1.5 to 1.8 x 10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> partially-depleted PBMCs/well were stimulated for a week in U-bottom 96-well plates (NUNC, Roskilde, Denmark) with 1µg/mL of each antigen (Peptivator-CMVpp65 mixed with Peptivator CMV IE-1-premium grade at equal proportion, Peptivator-AdV5 Hexon, purchased from Miltenyi Biotec) or HTLV-1 Tax (Bachem).

#### Proliferation assay

Responses to antigens were determined by two approaches. For evaluating divided T cells by CFSE dilution, PBMC were labelled at day 0 with 1 µmol/L of CFSE (Cell-Trace CFSE; Life Technologies) and then cultured for 7 days before harvesting and staining with CD3-APC antibody. For measured [3H]-Thymidine incorporation after 6 days, each culture was pulsed for the last 18 hrs with .5 µCi/well (18.5 kBq/well) of [3H]-thymidine and then harvested for microbeta scintillation counting (PerkinElmer, Waltham).

#### Measurement of cytokine production

Cultured cells stimulated for 7 days with the different viral antigens were tested for their IFN- $\gamma$  capacity production by an interferon- $\gamma$  enzyme-linked immunosorbent spot assays (IFN-ELISPOT). After 6 days of stimulation, each well were harvested and washed twice before returned to culture for an additional 20 hr in immunospot plates coated with a monoclonal antibody to IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  spots were enumerated following the manufacturer's instructions by using TB Scan software (TB-SPOT TB, Oxford Immunotech). Means of duplicate wells were calculated and expressed as spots per well (spw).

#### **Statistical analysis**

Values are expressed as mean and range. Mann-Whitney U test was used for all comparisons between values obtained before and after T cell partial selective depletion for the each virus and between values obtained with HTLV1 and ADV or CMV, respectively. SPSS software (SPSS, Chicago, IL, v19) was used for all calculations.

## **Results**

The PBSC collections of 7 men and 3 women were analysed. The median proportion of CD4<sup>+</sup> T cells among samples was 32% (range, 22% to 49%) and CD4<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T cells among CD4<sup>+</sup> T cells was 83% (range, 75% to 93%). As shown in table 1, all the donors were seronegative for the HTLV1 and seropositive for the ADV. Only 3 donors were CMV-seronegative.

### ***Proliferative indexes by quantitative method using CFSE at day 7***

As shown in figure 1, the mean percentage of divided CD3<sup>+</sup> lymphocytes in the presence of ADV antigen, was 14% (range, 1.0 to 30.2) in unmanipulated samples and 11.9% (range, 0.4 to 25.2) in partially CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T cell depleted samples (p=0.39). The CD3<sup>+</sup> lymphocytes proliferation in presence of pp65antigen was observed in almost all cultures before and after T-cell partial selective depletion except for donors with negative CMV-serostatus. Indeed, a mean of 7.0% (range, 0.2% to 38%) of divided CD3<sup>+</sup> lymphocytes was observed in unmanipulated samples and 9.5 % (range, 0.2% to 55.9%) in depleted ones (p=0.46).

No proliferation was observed in the presence of HTLV1 antigen that served as negative control.

The difference in proliferation index was statistically significant between culture in the presence of either CMV or ADV and in the presence of HTLV1, be them before or after manipulation (p < 0.001)

### ***Proliferative index by quantitative method using tritiated thymidine 3H at day 7***

As shown in figure 2, there were no differences between unmanipulated samples and those cultured after depletion for either ADV or CMV. Results are expressed as cmt for the considered virus /cmt for the HTLV1 considered as negative control for unmanipulated and depleted samples, respectively.

### ***Measure of INF $\gamma$ capacity secretion indexes using Elispot method at day 7***

INF- $\gamma$  secretion measurements were conducted on cultures exposed to the ADV. The mean numbers of spots was 174 (range, 39 to 303) and 44 (range, 1 to 104) for unmanipulated and depleted samples, respectively. In the same way, cultures placed in the presence of pp65 antigen (only for seropositive donors), the spots number was similar between both groups, and the mean number of spots was 113 (range, 46 to 451) and 111 (range, 46 to 385) respectively before and after selective partial T cells depletion.

As depicted in table 2, differences were significant when compared to HTLV1 results for both CMV and ADV cultures in unmanipulated and partially depleted samples ( $p < 0.001$ ).

As expected, there was no secretion observed in donors whose CMV-serostatus was negative. Figure 3 illustrates results of Elispots in the presence of pp65 in all cultures before and after the depletion regardless for all donors.

### ***Supplementary tests***

For partially selected samples, all above quantitative and functional tests were repeated after adjusting the total number of lymphocytes to  $2 \times 10^5$ /well. The same results were obtained. Data not shown.

## **Discussion**

The strong association evidenced between the CCR7<sup>+</sup>/CCR7<sup>neg</sup> ratio of transplanted CD4<sup>+</sup> T cells and the development of aGVHD might reflect the predominant distribution of

alloreactive T cells in the naive and central memory subsets, as described both for naive CD4<sup>+</sup> T cells in humans[20] and in experimental models for naive[17, 18, 21] and central memory subsets.[22]

A second reason why CCR7<sup>+</sup> cells could initiate aGVHD might be due to their migratory capacities. Like naive cells, central memory cells can home to secondary lymphoid organs where they can meet host (allo) antigen-presenting cells. In agreement with the three step model of GVHD pathogenesis,[23] tracking donor cells during GVHD has demonstrated that they first partition and expand in host lymphoid organs and then their progeny infiltrates target organs.[24] Accordingly, CCR7 is necessary for the control of effector cell in alloimmune responses.[25] Therefore, inhibition of adhesion and cell-trafficking molecules such as CCR7 and CD62L could be a promising approach to reduce the incidence and severity of acute GVHD in allo-CST since those molecules have a well-established role in GVHD development.[16, 18-20, 26, 27] Tacking into account the co-expression of cell-trafficking molecules on the same subsets of T lymphocytes, and the redundancy phenomena encountered in cell-trafficking blockade methods, [28-30] we have preferred to explore a partial selective approach of CD4<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T cells rather than a CCR7 blockade one.

While the preservation of anti-tumor effect was demonstrated in absence of CCR7<sup>+</sup> lymphocytes setting,[19] the results of our current study provide some evidences that partial CD4<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T cells depletion of donor PBSC does not alter acquired anti-viral immunity at least vis-à-vis the two principal virus that reactivate the most after allo-SCT and responsible for high post-transplant morbidity and mortality. These results confirm what others and we have observed in vivo that CD4<sup>+</sup> T lymphocytes expressing the trafficking antigen CCR7 or CD62L were more likely committed to acute GVHD reactions rather than GVL or anti-

infective responses.[16, 26] Although, the number of IFN $\gamma$  spots obtained in partial CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T cells depletion sitting was inferior to the one obtained with unmanipulated sample in presence of ADV, the difference with the number of spots obtained in presence of HTLV1 was statistically significant and the immune response to ADV was still satisfactory for appropriate anti-viral responses. Indeed, the minimum required for a positive reaction in our laboratory is at least 20 spots.

We are aware that from the pathophysiological standpoint, acquired anti-infective immunity transfer is mainly insured by CD8<sup>+</sup> memory T lymphocytes rather than CD4<sup>+</sup> naïve or central memory T lymphocytes.<sup>[31-33]</sup> However, the net anti-infective responses are affected by several complex T cell subsets that all might have a role in determining the final response.<sup>[34-39]</sup> On the other hand, there is always multidirectional cooperation between T lymphocytes subsets even in secondary anti-infective reactions.<sup>[39]</sup> As a matter of fact, the aim of our work was to ensure the absence of any manipulation-related alteration of the acquired anti-infective immune response towards virus, be it related to cell sorting techniques or to an alteration of the cooperation between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells following depletion that would diminish the proportion of CD4<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T cells.

One may question why did we choose to investigate secondary reactions rather than primary ones? Indeed, measuring the capacity of graft-containing T cell subsets to induce anti-infective primary reactions was not the goal as post-transplant immune reconstitution is usually ensured by donor stem cell-derived lymphopoiesis in recipient and not by the infused lymphocytes with graft.<sup>[40, 41]</sup> The major issue of post-transplant immune reconstitution and primary anti-infective reactions should be addressed in all further partially selection transplantation approaches.

In conclusion: this study demonstrates the preservation of acquired anti-viral immunity to PBSC after partial selective T-cell depletion. Our results along with what has been already demonstrated in the field give ground to a rational use of this approach in clinical trial.

### **Acknowledgements**

We would like to thanks all donors that accepted to participate to this research and the members of the association Capucine for their generous support to our clinical and basic research work.

### **Authorship**

Contributions: B.C.; J.T and S.T contributed to analysis and wrote the manuscript; M .L designed and supervised the study, analyzed data, and wrote the manuscript. I.Y.-A. designed and supervised the study, enrolled the donors, analyzed data, and wrote the manuscript.

### **Conflict of interest**

The authors declare no competing financial interests.

This study has been entirely conducted thanks to a donation from the association Capucine



## References

### REFERENCES

- 1 Yakoub-Agha, I., de La Salmoniere, P., Ribaud, P., Sutton, L., Wattel, E., Kuentz, M., et al. Allogeneic bone marrow transplantation for therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia: a long-term study of 70 patients-report of the French society of bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*, 2000, 18(5), 963-971.
- 2 Yakoub-Agha, I., Fawaz, A., Folliot, O., Guillermin, G., Quesnel, B., Fenaux, P., et al. Allogeneic bone marrow transplantation in patients with follicular lymphoma: a single center study. *Bone Marrow Transplant*, 2002, 30(4), 229-234.
- 3 Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Goldman, J.M., Kersey, J., Kolb, H.J., et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, 1990, 75(3), 555-562.
- 4 Appelbaum, F.R. Graft versus leukemia (GVL) in the therapy of acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leukemia*, 1997, 11 Suppl 4, S15-17.
- 5 Johnson, B.D., Becker, E.E. and Truitt, R.L. Graft-vs.-host and graft-vs.-leukemia reactions after delayed infusions of donor T-subsets. *Biol Blood Marrow Transplant*, 1999, 5(3), 123-132.
- 6 Ruggeri, L., Capanni, M., Tosti, A., Urbani, E., Posati, S., Aversa, F. et al. Innate immunity against hematological malignancies. *Cytotherapy*, 2002, 4(4), 343-346.
- 7 Talmadge, J.E. Hematopoietic stem cell graft manipulation as a mechanism of immunotherapy. *Int Immunopharmacol*, 2003, 3(8), 1121-1143.
- 8 Peters, C., Matthes-Martin, S., Fritsch, G., Holter, W., Lion, T., Witt, V. et al. Transplantation of highly purified peripheral blood CD34+ cells from HLA-mismatched parental donors in 14 children: evaluation of early monitoring of engraftment. *Leukemia*, 1999, 13(12), 2070-2078.
- 9 Gajewski, J., Gjertson, D., Cecka, M., Tonai, R., Przepiorka, D., Hunt, et al. The impact of T-cell depletion on the effects of HLA DR beta 1 and DQ beta allele matching in HLA serologically identical unrelated donor bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 1997, 3(2), 76-82.
- 10 Andre-Schmutz, I., Le Deist, F., Hacein-Bey, S., Hamel, Y., Vitetta, E., Schindler, 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), 2927-2928.
- 11 Tiberghien, P., Reynolds, C.W., Keller, J., Spence, S., Deschaseaux, M., Certoux, J.M. et al. Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific in vivo donor T-cell depletion after bone marrow transplantation? *Blood*, 1994, 84(4), 1333-1341.
- 12 Barrett, A.J., Rezvani, K., Solomon, S., Dickinson, A.M., Wang, X.N., Stark, G. et al. New developments in allotransplant immunology. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 2003, 350-371.
- 13 Tabilio, A., Falzetti, F., Zei, T., De Ioanni, M., Bonifacio, E., Battelli, F. et al. Graft engineering for allogeneic haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis*, 2004, 33(3), 274-280.
- 14 Mohty, M., Labopin, M., Balere, M.L., Socie, G., Milpied, N., Tabrizi, R. et al. Antithymocyte globulins and chronic graft-vs-host disease after myeloablative allogeneic stem cell transplantation from HLA-matched unrelated donors: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire. *Leukemia*, 2010, 24(11), 1867-1874.

- 15 Bertz, H., Spyridonidis, A., Wasch, R., Grulich, C., Egger, M. and Finke, J. A novel GVHD-prophylaxis with low-dose alemtuzumab in allogeneic sibling or unrelated donor hematopoietic cell transplantation: the feasibility of deescalation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009, 15(12), 1563-1570.
- 16 Yakoub-Agha, I., Saule, P., Depil, S., Micol, J.B., Grutzmacher, C., Boulanger-Villard, F. et al. A high proportion of donor CD4<sup>+</sup> T cells expressing the lymph node-homing chemokine receptor CCR7 increases incidence and severity of acute graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancy. *Leukemia*, 2006, 20(9), 1557-1565.
- 17 Anderson, B.E., McNiff, J., Yan, J., Doyle, H., Mamula, M., Shlomchik, M.J. and Shlomchik, W.D. Memory CD4<sup>+</sup> T cells do not induce graft-versus-host disease. *J Clin Invest*, 2003, 112(1), 101-108.
- 18 Chen, B.J., Cui, X., Sempowski, G.D., Liu, C. and Chao, N.J. Transfer of allogeneic CD62L<sup>-</sup> memory T cells without graft-versus-host disease. *Blood*, 2004, 103(4), 1534-1541.
- 19 Coghill, J.M., Carlson, M.J., Panoskaltis-Mortari, A., West, M.L., Burgents, J.E., Blazar, B.R. and Serody, J.S. Separation of graft-versus-host disease from graft-versus-leukemia responses by targeting CC-chemokine receptor 7 on donor T cells. *Blood*, 2010, 115(23), 4914-4922.
- 20 Foster, A.E., Marangolo, M., Sartor, M.M., Alexander, S.I., Hu, M., Bradstock, K.F. and Gottlieb, D.J. Human CD62L<sup>-</sup> memory T cells are less responsive to alloantigen stimulation than CD62L<sup>+</sup> naive T cells: potential for adoptive immunotherapy and allodepletion. *Blood*, 2004, 104(8), 2403-2409.
- 21 Xystrakis, E., Bernard, I., Dejean, A.S., Alsaati, T., Druet, P. and Saoudi, A. Alloreactive CD4 T lymphocytes responsible for acute and chronic graft-versus-host disease are contained within the CD45RChigh but not the CD45RClow subset. *Eur J Immunol*, 2004, 34(2), 408-417.
- 22 Ahmadzadeh, M., Hussain, S.F. and Farber, D.L. Heterogeneity of the memory CD4 T cell response: persisting effectors and resting memory T cells. *J Immunol*, 2001, 166(2), 926-935.
- 23 Cooke, K.R., Hill, G.R., Gerbitz, A., Kobzik, L., Martin, T.R., Crawford, J.M. et al. Tumor necrosis factor-alpha neutralization reduces lung injury after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation*, 2000, 70(2), 272-279.
- 24 Wysocki, C.A., Panoskaltis-Mortari, A., Blazar, B.R. and Serody, J.S. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*, 2005.
- 25 Hopken, U.E., Droese, J., Li, J.P., Joergensen, J., Breitfeld, D., Zerwes, H.G. and Lipp, M. The chemokine receptor CCR7 controls lymph node-dependent cytotoxic T cell priming in alloimmune responses. *Eur J Immunol*, 2004, 34(2), 461-470.
- 26 Chang, Y.J., Zhao, X.Y., Huo, M.R. and Huang, X.J. Expression of CD62L on donor CD4(+) T cells in allografts: correlation with graft-versus-host disease after unmanipulated allogeneic blood and marrow transplantation. *J Clin Immunol*, 2009, 29(5), 696-704.
- 27 Ermann, J., Hoffmann, P., Edinger, M., Dutt, S., Blankenberg, F.G., Higgins, J.P. et al. Only the CD62L<sup>+</sup> subpopulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood*, 2005, 105(5), 2220-2226.
- 28 Winn, R., Vedder, N., Ramamoorthy, C., Sharar, S. and Harlan, J. Endothelial and leukocyte adhesion molecules in inflammation and disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1998, 9 Suppl 2, S17-23.
- 29 Sharar, S.R., Chapman, N.N., Flaherty, L.C., Harlan, J.M., Tedder, T.F. and Winn, R.K. L-selectin (CD62L) blockade does not impair peritoneal neutrophil emigration or subcutaneous host defense to bacteria in rabbits. *J Immunol*, 1996, 157(6), 2555-2563.

- 30 van Leeuwen, E.M., van Buul, J.D., Remmerswaal, E.B., Hordijk, P.L., ten Berge, I.J. and van Lier, R.A. Functional re-expression of CCR7 on CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells upon antigenic stimulation. *Int Immunol*, 2005, 17(6), 713-719.
- 31 Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M., Papagno, et al. Memory CD8<sup>+</sup> T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med*, 2002, 8(4), 379-385.
- 32 Romero, P., Zippelius, A., Kurth, I., Pittet, M.J., Touvrey, C., Iancu, E.M. et al Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Immunol*, 2007, 178(7), 4112-4119.
- 33 Sourdive, D.J., Murali-Krishna, K., Altman, J.D., Zajac, A.J., Whitmire, J.K., Pannetier, C. et al. Conserved T cell receptor repertoire in primary and memory CD8 T cell responses to an acute viral infection. *J Exp Med*, 1998, 188(1), 71-82.
- 34 Reichstetter, S., Standifer, N.E., Geubtner, K.A., Liu, A.W., Agar, S.L. and Kwok, W.W. Cytotoxic herpes simplex type 2-specific, DQ0602-restricted CD4 T<sup>+</sup>-cell clones show alloreactivity to DQ0601. *Immunology*, 2006, 117(3), 350-357.
- 35 Zorn, E., Wang, K.S., Hochberg, E.P., Canning, C., Alyea, E.P., Soiffer, R.J. and Ritz, J. Infusion of CD4<sup>+</sup> donor lymphocytes induces the expansion of CD8<sup>+</sup> donor T cells with cytolytic activity directed against recipient hematopoietic cells. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(7), 2052-2060.
- 36 Weinberg, A., Zhang, L. and Hayward, A.R. Alloreactive cytotoxic CD4<sup>+</sup> responses elicited by cytomegalovirus-infected endothelial cells: role of MHC class I antigens. *Viral Immunol*, 2000, 13(1), 37-47.
- 37 Harari, A., Rizzardi, G.P., Ellefsen, K., Ciuffreda, D., Champagne, P., Bart, P.A. et al. Analysis of HIV-1- and CMV-specific memory CD4 T-cell responses during primary and chronic infection. *Blood*, 2002, 100(4), 1381-1387.
- 38 Chen, J.J., Huang, J.C., Shirliff, M., Briscoe, E., Ali, S., Cesani, F. et al. CD4 lymphocytes in the blood of HIV(+) individuals migrate rapidly to lymph nodes and bone marrow: support for homing theory of CD4 cell depletion. *J Leukoc Biol*, 2002, 72(2), 271-278.
- 39 Amyes, E., Hatton, C., Montamat-Sicotte, D., Gudgeon, N., Rickinson, A.B., McMichael, A.J. and Callan, M.F. Characterization of the CD4<sup>+</sup> T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J Exp Med*, 2003, 198(6), 903-911.
- 40 Sasson, S.C., Zaunders, J.J. and Kelleher, A.D. The IL-7/IL-7 receptor axis: understanding its central role in T-cell homeostasis and the challenges facing its utilization as a novel therapy. *Curr Drug Targets*, 2006, 7(12), 1571-1582.
- 41 Crooks, G.M., Weinberg, K. and Mackall, C. Immune reconstitution: from stem cells to lymphocytes. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2006, 12(1 Suppl 1), 42-46.

Table 1: donor, gender and viral serostatus and PBSC samples' characteristics

Dono	rs/	CM	AD	T4/L	T4N/T	T4CM/T	T4R7/T	T8/Ly	T8N/T8	T8CM/	T8R7/T
Gend	V	V	y	4	4	4	4	%	%	T8	8
er			%	%	%	%	%			%	%
# 1/M	neg	pos	45,7	47	37,7	84,7	35,8	17,8	8,8	26,6	
# 2/M	pos	pos	59,8	61,2	20,5	81,7	-*	-	-	-	
# 3/M	pos	pos	36,5	67,7	17,4	85,1	37,6	72,6	1,6	74,2	
# 4/M	pos	pos	37,9	55	25	80	33,6	70,9	4,5	75,4	
# 5/M	neg	pos	63,7	74,5	18,7	93,2	24,7	75,2	3	78,2	
# 6/M	pos	pos	53,3	45	39,3	84,3	29,5	35	1,7	36,7	
# 7/M	pos	pos	49,8	55,5	22,7	78,2	28,9	60,5	5	65,5	
# 8/M	pos	pos	39	39,2	35,5	74,7	43,4	38	6,1	44,1	
# 9/M	neg	pos	43,7	58,3	27,3	85,6	22,7	53,9	5,3	59,2	
# 10/M	Pos	pos	52,7	46,1	31,8	77,9	30,2	32,3	6,8	39,1	

PBSC: peripheral blood stem cell; CMV: cytomegalovirus; ADV: adenovirus; T4: CD4<sup>+</sup> T lymphocytes; Ly: total lymphocytes; T4N: naïve CD4<sup>+</sup> T lymphocytes; T4CM: central memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes; T4R7: CD4<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T lymphocytes; T8: CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T lymphocytes; T8N: naïve CD8<sup>+</sup> T lymphocytes; T8CM: central memory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes; T8R7: CD8<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T lymphocytes; M: male; F: female; pos: positive; neg: negative. All donors had HTLV1 serostatus; \* values of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are missing.

Table 2: number of IFN $\gamma$  spots by elispot method at day 7 of lymphocyte cultures in presence different viral antigens in unmanipulated and partial selective CD4<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> T cell depletion.

	Unmanipulated samples		Partially depleted samples	
	Mean (range)	<i>p</i>	Mean (range)	<i>p</i>
CMV*	113 (46 - 451)	< 0.001	111 (46 - 385)	< 0.001
HTLV1**	3,9 (0-19)		3,2 (0-20)	
Adenovirus	174 (39 - 303)	< 0.001	44 (1 - 104)	< 0.001
HTLV1	3,9 (0-19)		3,2 (0-20)	

\* In positive CMV-serostatus donors. \*\* HTLV1 was considered as the negative control. Comparison by Mann-Whitney U test.

**Figure legends:**

**Legend (Figure 1):** Mean percentages of divided CD3+ lymphocytes at day 7 using carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) in the presence of ADV, pp65 and HTLV1. Tpop: unmanipulated sample; Dtpop: partially CD4+/CCR7+ T cell depleted samples.

**Legend (Figure 2):** tritiated thymidine  $^3\text{H}$  indexes: Bars represent proportions of  $^3\text{H}$  incorporated in the presence of cytomegalovirus (CMV) or adenovirus (ADV) (cmt) compared to  $^3\text{H}$  incorporated in the presence of HTLV 1 (negative control) (cmt) in cultures for all donors before and after T cell partial selective depletion.

**Legend (Figure 3):** Elispot results for all donors before and after T cell partial selective depletion. The bars with low values belong to donors with negative CMV serostatus.

Figure 1:

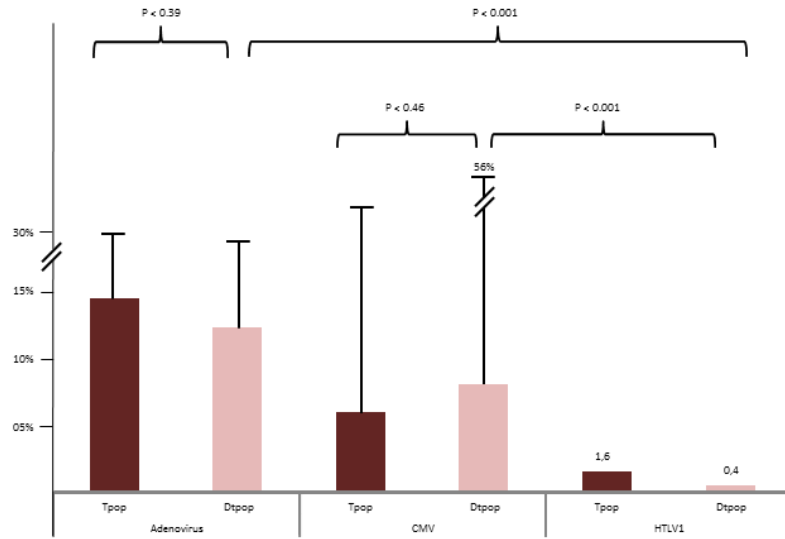


Figure 2:

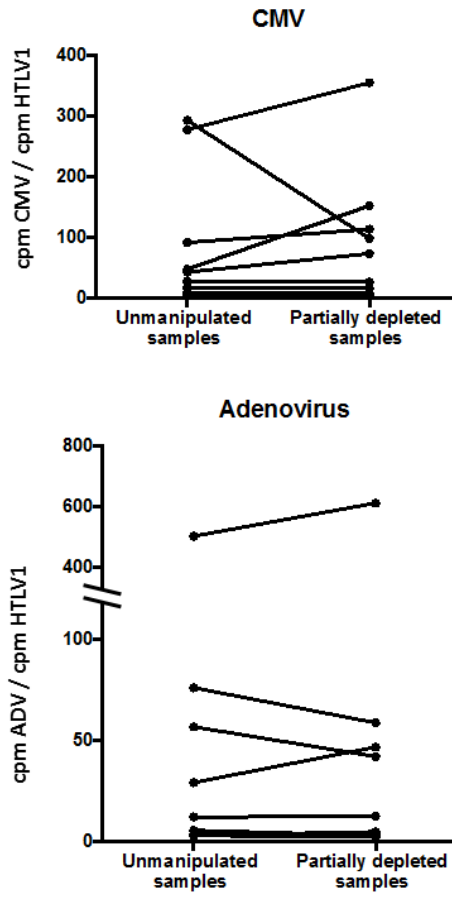
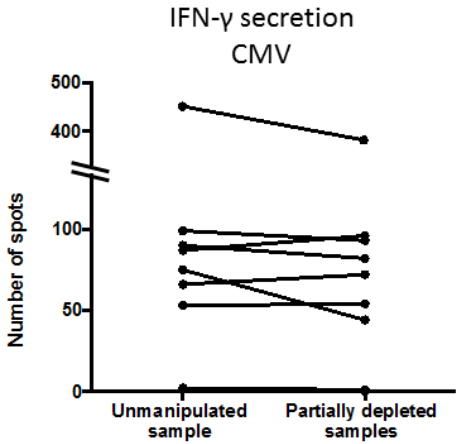




Figure 3:



### **3) Interprétation des résultats**

Ce travail démontre l'absence d'impact significative de la méthode de déplétion sélective et partielle des greffons de CSP en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> sur les réponses immunitaires antivirales de type secondaire.

Nous avons réalisé des réactions de type secondaire compte tenu de quasi impossibilité de réaliser des réactions immunologiques primaires *in vitro*. Lors du future programme clinique, une étude de la reconstitution immunologique post-greffe sera mise en place et intégrera, spécifiquement, une étude de la réponse vaccinale post-greffe.

## **Conclusion et perspectives**

A la lumière des résultats présentés ci-dessus, nous estimons que le fait de recevoir un greffon contenant une proportion élevée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> est une condition nécessaire mais non suffisante pour le développement d'une GVH aiguë dans la mesure où près de 40% de patients ayant reçu une proportion très élevée de ces cellules n'ont pas développé de GVH aiguë et à l'inverse, aucun des malades ayant reçu une proportion faible < 65% (< 25<sup>e</sup> percentile) n'a présenté de GVH aiguë. Arstila et al.<sup>191</sup> ont constaté que le répertoire des sous-populations naïves est extrêmement diversifié (estimé à plus de 20 x 10<sup>6</sup> de spécificités pour les lymphocytes CD4<sup>+</sup> chez l'homme) alors que celui des sous-populations mémoires est évidemment plus limité (environ 0.1-0.2 x 10<sup>6</sup>), ce qui peut être responsable d'une grande disparité de fréquence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> réactifs *in vitro* vis-à-vis d'alloantigènes mHA. Ces différences interindividuelles peuvent expliquer qu'à proportion équivalente de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> greffés, seules certaines combinaisons donneur/receveur entraînent une GVH aiguë patente.

Les lymphocytes T<sub>reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> jouent un rôle dans la tolérance à la greffe et devraient s'opposer à l'installation d'une GVH<sup>172</sup> notamment celles exprimant les récepteurs CD62L et CCR7.<sup>173 174 175 176</sup> Nous n'avons pas analysé dans les greffons les proportions des lymphocytes T<sub>reg</sub>. Une proportion plus élevée de ces derniers peut, en partie, expliquer l'absence de GVH aiguë chez certains patients avec un greffon riche en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>, en contrôlant l'amplification des réponses allogéniques.

Nous avons réussi ces dernières années à diminuer le taux de mortalité précoce post-greffe avec une meilleure prise en charge des malades en développant, notamment, des nouveaux outils diagnostiques des complications post-greffe<sup>192</sup> et en instaurant, entre autres, l'alimentation entérale systématique.<sup>193</sup> La GVH aiguë de grade III-IV reste, toutefois, une complication majeure responsable d'une mortalité précoce non négligeable. Cette complication délétère, à l'inverse de la GVH chronique, ne semble pas avoir, de façon évidente, un effet protecteur contre la rechute post-greffe.<sup>194 195</sup>

Notre prochain objectif est d'aller au-delà des constatations clinico-biologiques et de bâtir un véritable protocole de thérapie cellulaire applicable chez l'homme et dont le but serait d'essayer de diminuer le taux de mortalité précoce post-greffe en diminuant l'incidence et la sévérité de la GVH aiguë sans pour autant altérer la capacité anti-tumorale du greffon. L'idée d'une allogreffe à partir d'un greffon appauvri en lymphocytes T

CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> doit donc être étayée. Une déplétion totale de cette fraction, qui présente plus de la moitié des lymphocytes CD4<sup>+</sup> du greffon, ne nous semble pas sans risque pour le devenir de la greffe. Nous pensons, à l'inverse, qu'un appauvrissement du greffon proportionnellement riche en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> serait suffisant, considérant nos résultats qui ont montré que la GVH aiguë était étroitement liée à la proportion de cette fraction dans le greffon.<sup>196</sup>

Nos travaux seront continués sur dernier axe :

Etude préalable à la mise en place d'un protocole de thérapie cellulaire applicable à l'homme.

Il s'agit d'une étude des conséquences de la réduction de la proportion de cellules T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> sur la réponse anti-tumorale.

L'objectif est de confirmer *in vitro* le maintien de l'effet anti-tumoral (GVL) du greffon appauvri en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> dans un modèle de culture mixte tumorale et cytotoxicité contre des blastes irradiés HLA-compatibles. Les blastes de plus d'une trentaine de malades atteints d'une leucémie aiguë hyperleucocytaire ont été prélevés au diagnostic et cryopréservés à la tumorothèque du CHU de LILLE. Un certain nombre de ces patients est susceptible d'avoir une allogreffe à partir d'un donneur familial HLA-compatible. Avant la greffe, une partie des cellules du donneur prélevées pour le typage HLA sera utilisée pour les tests d'effet anti-tumoral contre les blastes du malade HLA-compatible.

Nous n'avons pas établi de protocole définitif pour cette partie expérimentale. Toutefois, notre objectif est de mesurer la réaction de type cytotoxicité des lymphocytes du donneur vis-à-vis des blastes du malade HLA-compatible, avant et après déplétion en sélective et partielle en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>.

# References

1. Hessner, M. J. *et al.* Use of unrelated marrow grafts compensates for reduced graft-versus-leukemia reactivity after T-cell-depleted allogeneic marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* **86**, 3987–3996 (1995).
2. Horowitz, M. M. *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 555–562 (1990).
3. Lee, S. J. *et al.* Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood* **100**, 406–414 (2002).
4. Weiden, P. L. *et al.* Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N. Engl. J. Med.* **300**, 1068–1073 (1979).
5. Mathé, G., Amiel, J. L., Schwarzenberg, L., Cattani, A. & Schneider, M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res.* **25**, 1525–1531 (1965).
6. Gluckman, E. & Rocha, V. History of the clinical use of umbilical cord blood hematopoietic cells. *Cytotherapy* **7**, 219–227 (2005).
7. Yakoub-Agha, I. *et al.* Allogeneic marrow stem-cell transplantation from human leukocyte antigen-identical siblings versus human leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors (10/10) in patients with standard-risk hematologic malignancy: a prospective study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 5695–5702 (2006).
8. Wallny, H. J. & Rammensee, H. G. Identification of classical minor histocompatibility antigen as cell-derived peptide. *Nature* **343**, 275–278 (1990).
9. Bleakley, M. & Riddell, S. R. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 371–380 (2004).
10. Chao, N. J. Minors come of age: Minor histocompatibility antigens and graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **10**, 215–223 (2004).
11. Mullighan, C. G. & Bardy, P. G. New directions in the genomics of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **13**, 127–144 (2007).
12. Chen, Y., Demir, Y., Valujskikh, A. & Heeger, P. S. The male minor transplantation antigen preferentially activates recipient CD4<sup>+</sup> T cells through the indirect presentation pathway in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**, 6510–6518 (2003).
13. Fujiwara, H. *et al.* Tissue-restricted T cell alloresponses across HLA barriers: selection and identification of leukemia-restricted CTL in HLA-mismatched stimulator-responder pairs. *Bone Marrow Transplant.* **32**, 371–378 (2003).
14. Ferrara, J. L. M., Cooke, K. R. & Teshima, T. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int. J. Hematol.* **78**, 181–187 (2003).
15. Zhang, Y., Louboutin, J.-P., Zhu, J., Rivera, A. J. & Emerson, S. G. Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8<sup>+</sup> T cell-mediated acute graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* **109**, 1335–1344 (2002).
16. Duffner, U. A. *et al.* Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**, 7393–7398 (2004).
17. Merad, M. *et al.* Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nat. Med.* **10**, 510–517 (2004).
18. Shlomchik, W. D. *et al.* Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* **285**, 412–415 (1999).
19. Anderson, B. E. *et al.* Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ. *Blood* **105**, 2227–2234 (2005).
20. Matte, C. C. *et al.* Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat. Med.* **10**, 987–992 (2004).
21. Auffermann-Gretzinger, S. *et al.* Rapid establishment of dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* **99**, 1442–1448 (2002).
22. Boeck, S. *et al.* Kinetics of dendritic cell chimerism and T cell chimerism in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Bone Marrow Transplant.* **37**, 57–64 (2006).
23. Auffermann-Gretzinger, S. *et al.* Fast appearance of donor dendritic cells in human skin: dynamics of skin and blood dendritic cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation* **81**, 866–873

- (2006).
24. Collin, M. P. *et al.* The fate of human Langerhans cells in hematopoietic stem cell transplantation. *J. Exp. Med.* **203**, 27–33 (2006).
  25. Baron, F. *et al.* Nonmyeloablative stem cell transplantation with CD8-depleted or CD34-selected peripheral blood stem cells. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **11**, 301–314 (2002).
  26. Nimer, S. D. *et al.* Selective depletion of CD8+ cells for prevention of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. A randomized controlled trial. *Transplantation* **57**, 82–87 (1994).
  27. Rocha, V. *et al.* Influence of bone marrow graft lymphocyte subsets on outcome after HLA-identical sibling transplants. *Exp. Hematol.* **29**, 1347–1352 (2001).
  28. Mohty, M. *et al.* CD8+ T cell dose affects development of acute graft-vs-host disease following reduced-intensity conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Exp. Hematol.* **32**, 1097–1102 (2004).
  29. Cao, T. M. *et al.* Engraftment and survival following reduced-intensity allogeneic peripheral blood hematopoietic cell transplantation is affected by CD8+ T-cell dose. *Blood* **105**, 2300–2306 (2005).
  30. Urbano-Ispizua, A. *et al.* The number of donor CD3(+) cells is the most important factor for graft failure after allogeneic transplantation of CD34(+) selected cells from peripheral blood from HLA-identical siblings. *Blood* **97**, 383–387 (2001).
  31. Aversa, F. *et al.* Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1186–1193 (1998).
  32. Yu, X. Z., Bidwell, S. J., Martin, P. J. & Anasetti, C. CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**, 4564–4568 (2000).
  33. Rocha, B. & Tanchot, C. Towards a cellular definition of CD8+ T-cell memory: the role of CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 259–263 (2004).
  34. Martins, S. L. R. *et al.* Functional assessment and specific depletion of alloreactive human T cells using flow cytometry. *Blood* **104**, 3429–3436 (2004).
  35. De Witte, M. A., Toebes, M., Song, J.-Y., Wolkers, M. C. & Schumacher, T. N. M. Effective graft depletion of MiHA<sub>g</sub> T-cell specificities and consequences for graft-versus-host disease. *Blood* **109**, 3830–3838 (2007).
  36. Beilhack, A. *et al.* In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood* **106**, 1113–1122 (2005).
  37. Wysocki, C. A., Panoskaltis-Mortari, A., Blazar, B. R. & Serody, J. S. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood* **105**, 4191–4199 (2005).
  38. Welniak, L. A. *et al.* Peyer patches are not required for acute graft-versus-host disease after myeloablative conditioning and murine allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **107**, 410–412 (2006).
  39. Beckmann, J. H. *et al.* Prolongation of allograft survival in ccr7-deficient mice. *Transplantation* **77**, 1809–1814 (2004).
  40. Höpken, U. E. *et al.* The chemokine receptor CCR7 controls lymph node-dependent cytotoxic T cell priming in alloimmune responses. *Eur. J. Immunol.* **34**, 461–470 (2004).
  41. Dutt, S. *et al.* L-selectin and beta7 integrin on donor CD4 T cells are required for the early migration to host mesenteric lymph nodes and acute colitis of graft-versus-host disease. *Blood* **106**, 4009–4015 (2005).
  42. Kim, Y.-M., Sachs, T., Asavaroengchai, W., Bronson, R. & Sykes, M. Graft-versus-host disease can be separated from graft-versus-lymphoma effects by control of lymphocyte trafficking with FTY720. *J. Clin. Invest.* **111**, 659–669 (2003).
  43. Li, B. *et al.* Delaying acute graft-versus-host disease in mouse bone marrow transplantation by treating donor cells with antibodies directed at l-selectin and alpha4-integrin prior to infusion. *Scand. J. Immunol.* **59**, 464–468 (2004).
  44. Sasaki, M. *et al.* Antagonist of secondary lymphoid-tissue chemokine (CCR ligand 21) prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **170**, 588–596 (2003).
  45. Jiang, Z., Podack, E. & Levy, R. B. Major histocompatibility complex-mismatched allogeneic bone marrow transplantation using perforin and/or Fas ligand double-defective CD4(+) donor T cells: involvement of cytotoxic function by donor lymphocytes prior to graft-versus-host disease pathogenesis. *Blood* **98**, 390–397 (2001).
  46. Teshima, T. *et al.* Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat. Med.* **8**, 575–581 (2002).
  47. Liu, J. *et al.* Selective T-cell subset ablation demonstrates a role for T1 and T2 cells in ongoing acute graft-versus-host disease: a model system for the reversal of disease. *Blood* **98**, 3367–3375 (2001).
  48. Kansu, E. The pathophysiology of chronic graft-versus-host disease. *Int. J. Hematol.* **79**, 209–215 (2004).
  49. Nikolic, B., Lee, S., Bronson, R. T., Grusby, M. J. & Sykes, M. Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. *J. Clin. Invest.* **105**, 1289–1298 (2000).

50. Morris, E. S. & Hill, G. R. Advances in the understanding of acute graft-versus-host disease. *Br. J. Haematol.* **137**, 3–19 (2007).
51. Yang, Y.-G., Qi, J., Wang, M.-G. & Sykes, M. Donor-derived interferon gamma separates graft-versus-leukemia effects and graft-versus-host disease induced by donor CD8 T cells. *Blood* **99**, 4207–4215 (2002).
52. Falkenburg, J. H. *et al.* Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood* **94**, 1201–1208 (1999).
53. Bonnet, D., Warren, E. H., Greenberg, P. D., Dick, J. E. & Riddell, S. R. CD8(+) minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones eliminate human acute myeloid leukemia stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8639–8644 (1999).
54. Marijt, W. A. E. *et al.* Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2742–2747 (2003).
55. Randolph, S. S. B., Gooley, T. A., Warren, E. H., Appelbaum, F. R. & Riddell, S. R. Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. *Blood* **103**, 347–352 (2004).
56. Dickinson, A. M. & Charron, D. Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 517–525 (2005).
57. Akatsuka, Y. *et al.* Identification of a polymorphic gene, BCL2A1, encoding two novel hematopoietic lineage-specific minor histocompatibility antigens. *J. Exp. Med.* **197**, 1489–1500 (2003).
58. Dolstra, H. *et al.* A human minor histocompatibility antigen specific for B cell acute lymphoblastic leukemia. *J. Exp. Med.* **189**, 301–308 (1999).
59. Quintarelli, C. *et al.* Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia. *Blood* **112**, 1876–1885 (2008).
60. Zorn, E. *et al.* Infusion of CD4+ donor lymphocytes induces the expansion of CD8+ donor T cells with cytolytic activity directed against recipient hematopoietic cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **8**, 2052–2060 (2002).
61. Matsushita, M. *et al.* Possible involvement of allogeneic antigens recognised by donor-derived CD4 cytotoxic T cells in selective GVL effects after stem cell transplantation of patients with haematological malignancy. *Br. J. Haematol.* **132**, 56–65 (2006).
62. Gahrton, G. *et al.* The impact of donor gender on outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma: reduced relapse risk in female to male transplants. *Bone Marrow Transplant.* **35**, 609–617 (2005).
63. Hambach, L., Spierings, E. & Goulmy, E. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: minor histocompatibility antigens. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **20**, 171–187 (2007).
64. Verdijk, R. M. *et al.* Pregnancy induces minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells: implications for stem cell transplantation and immunotherapy. *Blood* **103**, 1961–1964 (2004).
65. Ridge, J. P., Di Rosa, F. & Matzinger, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393**, 474–478 (1998).
66. Kolb, H.-J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* **112**, 4371–4383 (2008).
67. Curti, A. *et al.* Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood* **118**, 3273–3279 (2011).
68. Chen, D.-F. *et al.* Differential impact of inhibitory and activating Killer Ig-Like Receptors (KIR) on high-risk patients with myeloid and lymphoid malignancies undergoing reduced intensity transplantation from haploidentical related donors. *Bone Marrow Transplant.* **47**, 817–823 (2012).
69. Ruggeri, L. *et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* **295**, 2097–2100 (2002).
70. Cooley, S. *et al.* Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* **116**, 2411–2419 (2010).
71. Venstrom, J. M. *et al.* HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *N. Engl. J. Med.* **367**, 805–816 (2012).
72. Marmont, A. M. *et al.* T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* **78**, 2120–2130 (1991).
73. Maraninchi, D. *et al.* Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet* **2**, 175–178 (1987).
74. Pavletic, S. Z. *et al.* Influence of T-cell depletion on chronic graft-versus-host disease: results of a multicenter randomized trial in unrelated marrow donor transplantation. *Blood* **106**, 3308–3313 (2005).
75. Ash, R. C. *et al.* Successful allogeneic transplantation of T-cell-depleted bone marrow from closely HLA-matched unrelated donors. *N. Engl. J. Med.* **322**, 485–494 (1990).



76. Chakraverty, R. *et al.* An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. *J. Exp. Med.* **203**, 2021–2031 (2006).
77. Fujiwara, H. *et al.* Tissue-restricted T cell alloresponses across HLA barriers: selection and identification of leukemia-restricted CTL in HLA-mismatched stimulator-responder pairs. *Bone Marrow Transplant.* **32**, 371–378 (2003).
78. Michalek, J. *et al.* Definitive separation of graft-versus-leukemia- and graft-versus-host-specific CD4<sup>+</sup> T cells by virtue of their receptor beta loci sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1180–1184 (2003).
79. Parham, P. & McQueen, K. L. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 108–122 (2003).
80. Ruggeri, L., Capanni, M., Martelli, M. F. & Velardi, A. Cellular therapy: exploiting NK cell alloreactivity in transplantation. *Curr. Opin. Hematol.* **8**, 355–359 (2001).
81. Amrolia, P. J. *et al.* Allorestricted cytotoxic T cells specific for human CD45 show potent antileukemic activity. *Blood* **101**, 1007–1014 (2003).
82. Sadovnikova, E., Jopling, L. A., Soo, K. S. & Stauss, H. J. Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. *Eur. J. Immunol.* **28**, 193–200 (1998).
83. Klein, C. A. *et al.* The hematopoietic system-specific minor histocompatibility antigen HA-1 shows aberrant expression in epithelial cancer cells. *J. Exp. Med.* **196**, 359–368 (2002).
84. Kloosterboer, F. M. *et al.* Up-regulated expression in nonhematopoietic tissues of the BCL2A1-derived minor histocompatibility antigens in response to inflammatory cytokines: relevance for allogeneic immunotherapy of leukemia. *Blood* **106**, 3955–3957 (2005).
85. Goulmy, E. *et al.* Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* **334**, 281–285 (1996).
86. Tiberghien, P. Use of suicide gene-expressing donor T-cells to control alloreactivity after haematopoietic stem cell transplantation. *J. Intern. Med.* **249**, 369–377 (2001).
87. André-Schmutz, I. *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.* **34**, 2927–2928 (2002).
88. Arstila, T. P. *et al.* A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* **286**, 958–961 (1999).
89. Orosz, C. G., Adams, P. W. & Ferguson, R. M. Frequency of human alloantigen-reactive T lymphocytes. II. Method for limiting dilution analysis of alloantigen-reactive helper T cells in human peripheral blood. *Transplantation* **43**, 718–724 (1987).
90. Lombardi, G. *et al.* Are primary alloresponses truly primary? *Int. Immunol.* **2**, 9–13 (1990).
91. Heeger, P. S. *et al.* Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **163**, 2267–2275 (1999).
92. O'Brien, R. M. & Kemeny, D. M. Distribution of alloreactivity amongst the CD45 isoforms of circulating CD4 and CD8 T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* **48**, 679–683 (1998).
93. Gratwohl, A. *et al.* Female donors influence transplant-related mortality and relapse incidence in male recipients of sibling blood and marrow transplants. *Hematol. J. Off. J. Eur. Haematol. Assoc. EHA* **2**, 363–370 (2001).
94. James, E. *et al.* Multiparity induces priming to male-specific minor histocompatibility antigen, HY, in mice and humans. *Blood* **102**, 388–393 (2003).
95. Mommaas, B. *et al.* Cord blood comprises antigen-experienced T cells specific for maternal minor histocompatibility antigen HA-1. *Blood* **105**, 1823–1827 (2005).
96. Burrows, S. R., Khanna, R., Burrows, J. M. & Moss, D. J. An alloresponse in humans is dominated by cytotoxic T lymphocytes (CTL) cross-reactive with a single Epstein-Barr virus CTL epitope: implications for graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* **179**, 1155–1161 (1994).
97. Landais, E. *et al.* EBV-specific CD4<sup>+</sup> T cell clones exhibit vigorous allogeneic responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 1427–1433 (2006).
98. Elkington, R. & Khanna, R. Cross-recognition of human alloantigen by cytomegalovirus glycoprotein-specific CD4<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes: implications for graft-versus-host disease. *Blood* **105**, 1362–1364 (2005).
99. Gamadia, L. E. *et al.* Cross-reactivity of cytomegalovirus-specific CD8<sup>+</sup> T cells to allo-major histocompatibility complex class I molecules. *Transplantation* **77**, 1879–1885 (2004).
100. Koelle, D. M., Chen, H. B., McClurkan, C. M. & Petersdorf, E. W. Herpes simplex virus type 2-specific CD8 cytotoxic T lymphocyte cross-reactivity against prevalent HLA class I alleles. *Blood* **99**, 3844–3847 (2002).

101. Reichstetter, S. *et al.* Cytotoxic herpes simplex type 2-specific, DQ0602-restricted CD4 T<sup>+</sup>-cell clones show alloreactivity to DQ0601. *Immunology* **117**, 350–357 (2006).
102. Perruccio, K. *et al.* Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood* **106**, 4397–4406 (2005).
103. Yakoub-Agha, I. *et al.* Comparative analysis of naïve and memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell subsets in bone marrow and G-CSF-mobilized peripheral blood stem cell allografts: impact of donor characteristics. *Exp. Hematol.* **35**, 861–871 (2007).
104. Hayes, S. M. & Love, P. E. Distinct structure and signaling potential of the gamma delta TCR complex. *Immunity* **16**, 827–838 (2002).
105. Zhou, X.-Y. *et al.* Molecular mechanisms underlying differential contribution of CD28 versus non-CD28 costimulatory molecules to IL-2 promoter activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **168**, 3847–3854 (2002).
106. Arnold, B. Levels of peripheral T cell tolerance. *Transpl. Immunol.* **10**, 109–114 (2002).
107. Schwartz, R. H. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 305–334 (2003).
108. Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787–793 (1996).
109. Weninger, W., Manjunath, N. & von Andrian, U. H. Migration and differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunol. Rev.* **186**, 221–233 (2002).
110. Sakaguchi, S. *et al.* Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* **212**, 8–27 (2006).
111. Fantini, M. C. *et al.* Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**, 5149–5153 (2004).
112. Kapsenberg, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 984–993 (2003).
113. Wills, M. R. *et al.* Human virus-specific CD8<sup>+</sup> CTL clones revert from CD45RO<sup>high</sup> to CD45RA<sup>high</sup> in vivo: CD45RA<sup>high</sup>CD8<sup>+</sup> T cells comprise both naïve and memory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **162**, 7080–7087 (1999).
114. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 745–763 (2004).
115. Mebius, R. E. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 292–303 (2003).
116. Ansel, K. M. & Cyster, J. G. Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 172–179 (2001).
117. Cyster, J. G. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* **286**, 2098–2102 (1999).
118. Suresh, M. *et al.* Role of CD28-B7 interactions in generation and maintenance of CD8 T cell memory. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 5565–5573 (2001).
119. Villegas, E. N., Elloso, M. M., Reichmann, G., Peach, R. & Hunter, C. A. Role of CD28 in the generation of effector and memory responses required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **163**, 3344–3353 (1999).
120. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–712 (1999).
121. Amyes, E., McMichael, A. J. & Callan, M. F. C. Human CD4<sup>+</sup> T cells are predominantly distributed among six phenotypically and functionally distinct subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 5765–5773 (2005).
122. Song, K. *et al.* Characterization of subsets of CD4<sup>+</sup> memory T cells reveals early branched pathways of T cell differentiation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7916–7921 (2005).
123. Saule, P. *et al.* Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment. *Mech. Ageing Dev.* **127**, 274–281 (2006).
124. Macallan, D. C. *et al.* Rapid turnover of effector-memory CD4(+) T cells in healthy humans. *J. Exp. Med.* **200**, 255–260 (2004).
125. Rufer, N. *et al.* Ex vivo characterization of human CD8<sup>+</sup> T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. *Blood* **102**, 1779–1787 (2003).
126. Van Lier, R. A. W., ten Berge, I. J. M. & Gamadia, L. E. Human CD8(+) T-cell differentiation in response to viruses. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 931–939 (2003).
127. Takata, H. & Takiguchi, M. Three memory subsets of human CD8<sup>+</sup> T cells differently expressing three cytolytic effector molecules. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 4330–4340 (2006).
128. Ellefsen, K. *et al.* Distribution and functional analysis of memory antiviral CD8 T cell responses in HIV-1 and cytomegalovirus infections. *Eur. J. Immunol.* **32**, 3756–3764 (2002).

129. Appay, V. *et al.* Memory CD8<sup>+</sup> T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.* **8**, 379–385 (2002).
130. Van Leeuwen, E. M. M. *et al.* Emergence of a CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> granzyme B<sup>+</sup>, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **173**, 1834–1841 (2004).
131. Monteiro, M., Evaristo, C., Legrand, A., Nicoletti, A. & Rocha, B. Cartography of gene expression in CD8 single cells: novel CCR7<sup>-</sup> subsets suggest differentiation independent of CD45RA expression. *Blood* **109**, 2863–2870 (2007).
132. Baron, V. *et al.* The repertoires of circulating human CD8(+) central and effector memory T cell subsets are largely distinct. *Immunity* **18**, 193–204 (2003).
133. Wallace, D. L. *et al.* Direct measurement of T cell subset kinetics in vivo in elderly men and women. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **173**, 1787–1794 (2004).
134. Harari, A., Vallelian, F. & Pantaleo, G. Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. *Eur. J. Immunol.* **34**, 3525–3533 (2004).
135. Appay, V. *et al.* Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **168**, 5954–5958 (2002).
136. Krug, A. *et al.* Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *J. Exp. Med.* **197**, 899–906 (2003).
137. Lutz, M. B. & Schuler, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* **23**, 445–449 (2002).
138. Miller, M. J., Wei, S. H., Parker, I. & Cahalan, M. D. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* **296**, 1869–1873 (2002).
139. Bromley, S. K. *et al.* The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 375–396 (2001).
140. Watts, T. H. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 23–68 (2005).
141. Wang, S. *et al.* Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood* **96**, 2808–2813 (2000).
142. Akbar, S. M., Horiike, N., Onji, M. & Hino, O. Dendritic cells and chronic hepatitis virus carriers. *Intervirology* **44**, 199–208 (2001).
143. Théry, C. & Amigorena, S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 45–51 (2001).
144. Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* **6**, 345–352 (2005).
145. Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y.-J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* **5**, 1219–1226 (2004).
146. Zhang, Y. *et al.* Dendritic cell-activated CD44<sup>hi</sup>CD8<sup>+</sup> T cells are defective in mediating acute graft-versus-host disease but retain graft-versus-leukemia activity. *Blood* **103**, 3970–3978 (2004).
147. Anderson, B. E. *et al.* Memory CD4<sup>+</sup> T cells do not induce graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* **112**, 101–108 (2003).
148. Chen, B. J., Cui, X., Sempowski, G. D., Liu, C. & Chao, N. J. Transfer of allogeneic CD62L<sup>-</sup> memory T cells without graft-versus-host disease. *Blood* **103**, 1534–1541 (2004).
149. Chen, B. J. *et al.* Inability of memory T cells to induce graft-versus-host disease is a result of an abortive alloresponse. *Blood* **109**, 3115–3123 (2007).
150. Xystrakis, E. *et al.* Alloreactive CD4 T lymphocytes responsible for acute and chronic graft-versus-host disease are contained within the CD45R<sup>Chigh</sup> but not the CD45R<sup>Clow</sup> subset. *Eur. J. Immunol.* **34**, 408–417 (2004).
151. Cavazzana-Calvo, M. *et al.* Immune reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation: obstacles and anticipated progress. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 544–548 (2009).
152. Castermans, E. *et al.* Thymic recovery after allogeneic hematopoietic cell transplantation with non-myeloablative conditioning is limited to patients younger than 60 years of age. *Haematologica* **96**, 298–306 (2011).
153. Noel, D. R. *et al.* Does graft-versus-host disease influence the tempo of immunologic recovery after allogeneic human marrow transplantation? An observation on 56 long-term survivors. *Blood* **51**, 1087–1105 (1978).
154. Weinberg, K. *et al.* Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **97**, 1458–1466 (2001).
155. Toubert, A., Glauzy, S., Douay, C. & Clave, E. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again. *Tissue Antigens* **79**, 83–89 (2012).

156. Clave, E. *et al.* Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **113**, 6477–6484 (2009).
157. Tawara, I. *et al.* Interleukin-6 modulates graft-versus-host responses after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 77–88 (2011).
158. Rouquette-Gally, A. M., Boyeldieu, D., Prost, A. C. & Gluckman, E. Autoimmunity after allogeneic bone marrow transplantation. A study of 53 long-term-surviving patients. *Transplantation* **46**, 238–240 (1988).
159. Zhang, H., Chen, J. & Que, W. Allogeneic peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation for hematologic malignancies: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Leuk. Res.* **36**, 431–437 (2012).
160. Arpinati, M., Green, C. L., Heimfeld, S., Heuser, J. E. & Anasetti, C. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* **95**, 2484–2490 (2000).
161. Klanginsirikul, P. & Russell, N. H. Peripheral blood stem cell harvests from G-CSF-stimulated donors contain a skewed Th2 CD4 phenotype and a predominance of type 2 dendritic cells. *Exp. Hematol.* **30**, 495–501 (2002).
162. Bensinger, W. I. Allogeneic transplantation: peripheral blood vs. bone marrow. *Curr. Opin. Oncol.* **24**, 191–196 (2012).
163. Liu, D.-H. *et al.* The impact of graft composition on clinical outcomes in pediatric patients undergoing unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr. Blood Cancer* **57**, 135–141 (2011).
164. Chang, Y.-J., Weng, C.-L., Sun, L.-X. & Zhao, Y.-T. Allogeneic bone marrow transplantation compared to peripheral blood stem cell transplantation for the treatment of hematologic malignancies: a meta-analysis based on time-to-event data from randomized controlled trials. *Ann. Hematol.* **91**, 427–437 (2012).
165. Ratajczak, P. *et al.* Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease. *Blood* **116**, 1165–1171 (2010).
166. Yakoub-Agha, I. *et al.* A high proportion of donor CD4+ T cells expressing the lymph node-homing chemokine receptor CCR7 increases incidence and severity of acute graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancy. *Leukemia* **20**, 1557–1565 (2006).
167. Adams, A. B. *et al.* Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J. Clin. Invest.* **111**, 1887–1895 (2003).
168. Anderson, B. E. *et al.* Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* **112**, 101–108 (2003).
169. Chen, B. J., Cui, X., Sempowski, G. D., Liu, C. & Chao, N. J. Transfer of allogeneic CD62L- memory T cells without graft-versus-host disease. *Blood* **103**, 1534–1541 (2004).
170. Bondanza, A. *et al.* Suicide gene therapy of graft-versus-host disease induced by central memory human T lymphocytes. *Blood* **107**, 1828–1836 (2006).
171. Foster, A. E. *et al.* Human CD62L- memory T cells are less responsive to alloantigen stimulation than CD62L+ naive T cells: potential for adoptive immunotherapy and allodepletion. *Blood* **104**, 2403–2409 (2004).
172. Huehn, J. *et al.* Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **199**, 303–313 (2004).
173. Ermann, J. *et al.* Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* **105**, 2220–2226 (2005).
174. Fu, S. *et al.* CD4+ CD25+ CD62+ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **4**, 65–78 (2004).
175. Taylor, P. A. *et al.* L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4+25+ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. *Blood* **104**, 3804–3812 (2004).
176. Schneider, M. A., Meingassner, J. G., Lipp, M., Moore, H. D. & Rot, A. CCR7 is required for the in vivo function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **204**, 735–745 (2007).
177. Chang, Y.-J., Zhao, X.-Y., Huo, M.-R. & Huang, X.-J. Expression of CD62L on donor CD4(+) T cells in allografts: correlation with graft-versus-host disease after unmanipulated allogeneic blood and marrow transplantation. *J. Clin. Immunol.* **29**, 696–704 (2009).
178. Coghill, J. M. *et al.* Separation of graft-versus-host disease from graft-versus-leukemia responses by targeting CC-chemokine receptor 7 on donor T cells. *Blood* **115**, 4914–4922 (2010).
179. Przepiorka, D. *et al.* 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* **15**, 825–828 (1995).
180. Kaplan E, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;53:457-481.
181. Peto R, Peto J. Asymptotically efficient rank invariant test procedures (with discussion). *J R Stat Soc A* 1972□; 135□: 185-207.
182. Cox D. Regression models and life tables (with discussion). *J R Stat Soc.* 1972;34:187-220.

183. Appay, V. *et al.* Immuno-monitoring of CD8+ T cells in whole blood versus PBMC samples. *J. Immunol. Methods* **309**, 192–199 (2006).
184. Yakoub-Agha, I. *et al.* A high proportion of donor CD4+ T cells expressing the lymph node-homing chemokine receptor CCR7 increases incidence and severity of acute graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancy. *Leukemia* **20**, 1557–1565 (2006).
185. Schwarzer, A. P. *et al.* Frequency of anti-recipient alloreactive helper T-cell precursors in donor blood and graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone-marrow transplantation. *Lancet* **341**, 203–205 (1993).
186. Theobald, M. & Bunjes, D. Pretransplant detection of human minor histocompatibility antigen-specific naive and memory interleukin-2-secreting T cells within class I major histocompatibility complex (MHC)-restricted CD8+ and class II MHC-restricted CD4+ T-cell subsets. *Blood* **82**, 298–306 (1993).
187. Eljaafari, A. *et al.* Generation of helper and cytotoxic CD4+T cell clones specific for the minor histocompatibility antigen H-Y, after in vitro priming of human T cells by HLA-identical monocyte-derived dendritic cells. *Transplantation* **71**, 1449–1455 (2001).
188. Spierings, E. *et al.* A uniform genomic minor histocompatibility antigen typing methodology and database designed to facilitate clinical applications. *PLoS One* **1**, e42 (2006).
189. Laurin, D. *et al.* Minor histocompatibility antigen DDX3Y induces HLA-DQ5-restricted T cell responses with limited TCR-Vbeta usage both in vivo and in vitro. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **12**, 1114–1124 (2006).
190. Eljaafari, A. *et al.* Generation of stable monocyte-derived dendritic cells in the presence of high concentrations of homologous or autologous serum: influence of extra-cellular pH. *Hum. Immunol.* **59**, 625–634 (1998).
191. Arstila, T. P. *et al.* A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* **286**, 958–961 (1999).
192. Yakoub-Agha, I. *et al.* Impact of Small Bowel Exploration Using Video-Capsule Endoscopy in the Management of Acute Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *Transplantation* **78**, 1697–1701 (2004).
193. Seguy, D. *et al.* Enteral feeding and early outcomes of patients undergoing allogeneic stem cell transplantation following myeloablative conditioning. *Transplantation* **82**, 835–839 (2006).
194. Maris, M. B. *et al.* Allogeneic hematopoietic cell transplantation after fludarabine and 2 Gy total body irradiation for relapsed and refractory mantle cell lymphoma. *Blood* **104**, 3535–3542 (2004).
195. Micol, J. B. *et al.* Allogeneic stem-cell transplantation with fludarabine and 2-Gy TBI-based conditioning regimen for chronic hematological malignancy: a study of 25 consecutive patients and a literature review. *Leuk. Lymphoma* **48**, 321–329 (2007).
196. Yakoub-Agha, I. *et al.* A high proportion of donor CD4+ T cells expressing the lymph node-homing chemokine receptor CCR7 increases incidence and severity of acute graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancy. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund UK* **20**, 1557–1565 (2006).