



HAL
open science

Les dilemmes de l'allogreffe de sang placentaire explorés au travers de deux alternatives thérapeutiques : le sérum anti-lymphocytaire *in vivo*, l'interleukine-7 *in vitro*

Laurent Pascal

► To cite this version:

Laurent Pascal. Les dilemmes de l'allogreffe de sang placentaire explorés au travers de deux alternatives thérapeutiques : le sérum anti-lymphocytaire *in vivo*, l'interleukine-7 *in vitro*. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S064 . tel-01577731

HAL Id: tel-01577731

<https://theses.hal.science/tel-01577731>

Submitted on 28 Aug 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Faculté de médecine et CHU de Lille

(Dérégulation de l'homéostasie lymphocytaire, EA2686, IFR114)

Année universitaire 2013-2014

N° attribué par la bibliothèque

THESE

Pour l'Obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 2

SPECIALITE : IMMUNOLOGIE

Présenté publiquement le 19 décembre 2014 par

Laurent PASCAL

Né le 23 mai 1981

**Les dilemmes de l'allogreffe de sang placentaire explorés au
travers de deux alternatives thérapeutiques :
- le sérum anti-lymphocytaire in vivo
- l'interleukine-7 in vitro**

Jury

Professeur Ghislaine Sterkers

Rapporteur

Docteur Stéphanie Nguyen

Rapporteur

Professeur Noël Milpied

Examineur

Professeur Ibrahim Yakoub-Agha

Examineur

Professeur Myriam Labalette

Directrice de thèse

DEDICACE

Je dédie cette thèse d'université

A ma femme Sarah

A mes enfants,

A mes parents,

A mes patients,

REMERCIEMENTS

A ma directrice de thèse :

Madame le Professeur Myriam Labalette

Je vous remercie pour votre investissement dans ce travail de recherche ; je vous remercie de m'avoir confié cette problématique dès mon Master 2 de recherche. Je vous remercie pour votre enthousiasme et pour le temps que vous m'avez consacré. Votre compétence, votre souci de la précision, à la fois dans l'analyse des phénomènes biologiques observés, mais également dans la justesse de la retranscription de ces phénomènes sur le papier, m'ont particulièrement apporté pour enrichir mon expérience. Vous m'avez permis de me dépasser et pour cela, je vous en suis particulièrement reconnaissant.

A mes rapporteurs

Madame Le Professeur Ghislaine Sterkers

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse, de l'intérêt que vous avez manifesté pour ce sujet.

Madame le Docteur Stéphanie Nguyen

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse. J'ai eu le plaisir de vous compter dans mon jury de comité de suivi de thèse ; je vous remercie à nouveau d'avoir accepté de juger mon travail.

A mes assesseurs

Monsieur le Professeur Ibrahim Yakoub-Agha

Cher Ibrahim, je te remercie pour ton soutien de tous les instants. Tu m'as notamment mis le pied à l'étrier en me poussant, il y a quelques années maintenant à réaliser un master 2 de

recherche. C'est donc à toi que je dois également en partie d'être là. Tu trouveras j'en suis sûr, dans ce travail, l'expression de ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Noël Milpied

J'ai eu le plaisir de vous compter dans mon jury de comité de suivi de thèse ; je vous remercie à nouveau d'avoir accepté de juger mon travail.

Dans ce travail, je dois associer tous mes soutiens sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour.

Monsieur le Professeur Christian Rose

Madame le Professeur Eliane Gluckman, et avec elle, l'équipe d'Eurocord,
Le Docteur Luciana Tucunduva, Le Docteur AnnaLisa Ruggeri

Mes collègues de travail de l'hôpital Saint Vincent de Paul

Madame le Docteur Nathalie Cambier

Madame le Docteur Emmanuelle Bourgeois-Petit

Monsieur le Docteur Manuel Cliquennois

Monsieur le Docteur Arnaud Desplechin

Ainsi que toute l'équipe d'Oncologie

Mes collègues au laboratoire d'Immunologie

Monsieur Jacques Trauet :

Madame Véroniques Lekeu

Monsieur le Docteur Sylvain Dubucquoy

Les autres membres du laboratoire d'Immunologie HLA

RESUME

AUTEUR : Laurent PASCAL

TITRE : La reconstitution immunitaire post-allogreffe de cellules souches hématopoïétiques de sang placentaire

DIRECTEUR DE THESE : Professeur Myriam Labalette

Résumé

Le greffon de sang placentaire permet d'accéder aux indications de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) en l'absence de disponibilité d'un donneur non apparenté compatible. De part ses propriétés intrinsèques, cette source n'expose pas à un risque plus élevée de réaction de greffon contre l'hôte (GVH) au regard des incompatibilités qu'elle autorise ni à un taux plus élevé de rechutes. En revanche, elle comporte un risque supérieur de non prise de greffe et une reconstitution immunologique post-greffe retardée responsable d'une morbidité et d'une mortalité liées aux infections.

L'expansion homéostatique périphérique des lymphocytes T du sang placentaire est un facteur déterminant de l'évolution bénéfique ou défavorable de l'allogreffe de CSH de sang placentaire. Dans les premières semaines post-greffe, la prolifération homéostatique des cellules T joue un rôle critique par son implication dans l'immunité anti-tumorale et anti-infectieuse. Cette dualité qui a été le fil conducteur de ce travail de thèse est délicate à maîtriser car elle concerne des cellules T dont les propriétés sont tout à fait singulières. Il s'agit de cellules T naïves pour la plupart fraîchement émigrées du thymus, leur nombre est limité et elles contiennent un contingent non négligeable des cellules T régulatrices.

Dans ce contexte, l'impact d'une lymphodéplétion profonde engendrée par l'utilisation du sérum anti-lymphocytaire (SAL) est encore largement méconnu et tout particulièrement dans le cadre de l'allogreffe de sang placentaire.

La première partie de nos travaux comprend deux études rétrospectives évaluant l'impact du sérum anti-lymphocytaire dans les greffes de sang placentaires après conditionnement myéloablatif et après conditionnement atténué. Les résultats de ces deux études concordent : le SAL est responsable d'une lymphodéplétion profonde chez le receveur qui diminue le taux de GVH aiguë de grade II à IV sans améliorer notablement la prise de greffe. En revanche, il est associé à une altération de la survie globale en aggravant sévèrement la

mortalité liée à la procédure. Dans ces deux études, nous avons retrouvé une augmentation du taux de complications infectieuses chez les receveurs qui ont bénéficié d'un conditionnement avec SAL. Au travers des données recueillies, nous avons également observé que les cellules immunocompétentes présentes dans le sang placentaire sont souvent très altérées : en moyenne, seulement 40% d'entre elles sont viables et vont donc pouvoir participer activement à la reconstitution immunitaire post-greffe.

La constatation de cette fragilité des cellules T de sang de cordon nous a conduit à son évaluation *in vitro*. L'analyse de la viabilité des lymphocytes T démontre qu'elle est globalement médiocre mais variable en fonction des cordons au cours des tous premiers jours de culture sans que les conditions de recueil ou de stockage ne puissent être incriminées. Cette viabilité peut être améliorée par l'exposition quotidienne des cellules T à de faible dose (100 pg/mL) d'interleukine-7 (IL-7) sans potentialiser la réponse allogénique. Le risque *in vivo* d'augmenter significativement l'alloréactivité en utilisant l'IL-7 avec des greffons non-manipulés ne peut être occulté. Toutefois, les résultats obtenus *in vitro* lors de la stimulation allogénique des cellules T de sang de cordon en présence d'IL-7 montre qu'à faibles doses, celle-ci améliore préférentiellement la viabilité des lymphocytes quiescents, non engagés dans la réponse alloréactive.

L'ensemble de ces résultats souligne l'intérêt d'une connaissance précise non seulement de la quantité mais aussi de la qualité des cellules T de sang de cordon infusées lors de l'allogreffe. Les thérapeutiques actuelles et à venir bloquant leur réactivité ou au contraire potentialisant leur viabilité doivent intégrer cette donnée pour mieux maîtriser leur action potentielle et l'adapter au cas par cas.

Mots-clefs :

Cellules souches hématopoïétiques, Homéostasie, Lymphocytes T, Emigrants thymiques récents, Interleukine 7, Sérum anti-lymphocytaire, GVH aiguë et chronique.

Discipline administrative

Immunologie

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

Ac : anticorps
Ad. : Adénovirus
Ag : antigène
CD : cluster de différenciation
CLP : compartiment lymphocytaire périphérique
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMV : Cytomégalovirus
CSH : cellules souches hématopoïétiques
CSP : cellules souches périphériques
EBV : Virus d'Epstein-Barr
SSE: Survie sans évènement
GVH: Maladie du greffon contre l'hôte ou Graft versus host Disease
GVL : Effet du greffon contre la leucémie ou Graft versus Leukemia
HLA : Human Leucocytes Antigen
IC : intervalle de confiance
ICT : irradiation corporelle totale
LAM : Leucémie aiguë myéloïde
LAL : Leucémie aiguë lymphoïde
MFI : intensité médiane de fluorescence
mHA : Antigène mineur d'Histocompatibilité
MAC : conditionnement myélo-ablatif
MNLR : mortalité non liée à la rechute
RIC : conditionnement d'intensité réduite.
SAL : sérum anti-lymphocytaire
SG : Survie Globale
SP : Sang placentaire

% : pourcentage

< : inférieur à

> : supérieur à

Laurent PASCAL

Curriculum Vitae

INFORMATIONS PERSONNELLES

Date de naissance: 23/05/1981

Nationalité: française

Langues: français, anglais, allemand

drlaurentpascal@hotmail.com

pascal.laurent@ghicl.net

Adresse personnelle : 15 avenue Gustave Delory, 59170 Croix

SITUATION ACTUELLE

- Depuis nov. 2014 : Praticien Hospitalier : service d'onco-hématologie, Hôpital Saint Vincent de Paul, Université Catholique de Lille.
- Novembre 2011-octobre 2014 : Chef de clinique assistant, service d'onco-hématologie, Hôpital Saint Vincent de Paul, Université Catholique de Lille.
- Depuis nov. 2011:Thèse de science en Immunologie, sous la direction du Pr. M Labalette
- 2013: Investigateur principal de l'étude EUROCORD: « Impact of ATG-containing reduced-intensity conditioning after single-unit or double-unit allogeneic cord blood transplantation: analysis of risk factors and outcomes ». Présentation des résultats à l'ASH 2013,

FORMATION

- Oct. 2011 Diplôme d'étude supérieur de maladie du sang – Université Lille II.
- 2011 Thèse de médecine: « 10 années de greffes de cellules souches hématopoïétiques de sang placentaire : Du greffon au conditionnement, les paramètres qui influent les événements post greffe »
- 2009-2010 Diplôme Universitaire de Biostatistique, Université Lille II.
- 2006-2011 Internat d'hématologie, CHRU de Lille, Université Lille II.
- 1999-2006 1^{er} et 2^{ème} cycles des études médicales, Université Versailles-Saint Quentin
- 1999 Baccalauréat

EXPERIENCE DE LABORATOIRE

2011-2013 Etudiant en thèse, équipe d'accueil 2686, laboratoire d'Immunologie-HLA, CHRU de Lille, Lille, France, sous la direction du Pr. M Labalette: « Cord blood T cell survival is heterogeneous and may be sustained by regular exposition to low dose Interleukin-7, »

2009-2010 Master 2 de recherche, équipe d'accueil 2686, laboratoire d'Immunologie-HLA, CHRU de Lille, Lille, France, sous la direction des Pr. M Labalette et Pr. I Yakoub-Agha: « Adult or cord blood naïve T cells: comparison between viability and alloreactivity. »

2008-2009 Master 1 de recherche, Laboratoire d'hématologie, CHRU de Lille, France, sous la direction du Dr. A Reneville: « Acute myeloid leukemia: NPM1 mutation and minimal residual disease. »

PUBLICATIONS:

- **Pascal L**, Tucunduva L, Ruggeri AL, Blaise D, Ceballos P, Chevallier P, Cornelissen J, Maillard N, Tabrizi R, Petersen E, Linkesch W, Sengeloev H, Kenzey C, Pagliuca A, Holler E, Einsele H, Gluckman E, Rocha V and Yakoub-Agha I, on behalf of Eurocord and EBMT. Impact of ATG-containing reduced-intensity conditioning after single or double-unit allogeneic cord blood transplantation: analysis of risk factors and outcomes, *Blood*, in press.
- **Pascal L**, Hivert B, Trauet J, Deberranger E, Dessaint JP, Yakoub-Agha I, Labalette MA. Low Effective Dose of Interleukin-7 is Sufficient to Maintain Cord Blood T Cells Alive without Potentiating Allo-Immune Responses. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Apr.
- **Pascal L**, Mohty M, Ruggeri, AL, Tucunduva L, Milpied N, Chevallier P, Tabrizi R, Labalette M, Gluckman E, Labopin M and Yakoub-Agha I, Impact of rabbit ATG-containing myeloablative conditioning regimens on the outcome of patients undergoing unrelated single-unit cord blood transplantation for hematological malignancies, *Bone Marrow Transplantation*, Oct.2014,
- **Pascal L**, Beyne-Rauzy O, Brechignac S, Marechaux S, Vassilief D, Ernst O, Berthon C, Gyan E, Gourin MP, Dreyfus F, Fenaux P, Rose C, Cardiac iron overload assessed by T2* magnetic resonance imaging and cardiac function in regularly transfused myelodysplastic syndrome patients, the GFM Experience, *British journal of Haematology*, May 2013
- Ernst O, Thuret I, Petit P, Ameur F, Loundou AD, De Kerviler E, Izzillo E, Leroy-Willig A, **Pascal L**, Verlhac S, Mordon S; Fenaux P, Rose C. Surcharge en fer d'origine hématologique : validation d'une procédure de dépistage de la surcharge cardiaque par IRM en routine clinique. *Journal de Radiologie diagnostique et interventionnelle*. 2013 Feb
- Dupire S, Wemeau M, Debarri H, **Pascal L**, Hivert B, Willekens C, Boyle E, Manier S, Béatrice T, Onraed B, Faucompré JL, Hennache B, Dumontet C, Facon T, Leleu X, Prognostic value in PINI index in patients with multiple myeloma. *Eur J Haematol*. 2012 Apr; 88(4): 306-13,
- Penel N, Delord JP, Bonnetterre ME, Bachelot T, Ray-Coquard I, Blay JY, **Pascal LB**, Borel C, Filleron T, Adenis A, Bonnetterre J. Development and validation of a model that predicts early death among cancer patients participating in phase I clinical trials investigating cytotoxics. *Invest New Drugs*. 2010 Feb; 28(1):76-82
- Rose C, Brechignac S, Vassilief D, **Pascal L**, Stamatoullas A, Guerci A, Larbaa D, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, Chaury MP, Roy L, Cheze S, Morel P, Fenaux P; GFM (Groupe Francophone des Myélodysplasies). Does iron chelation therapy improve survival in regularly transfused lower risk MDS patients? A multicenter study by the GFM. *Leuk Res*. 2010 Jul;34(7):864-70.
- **L Pascal**, X Leleu, T Facon Traitement de première ligne des patients atteints d'un myélome multiple, non éligibles pour une greffe de cellules souches autologues. Livre « le Myélome Multiple », de l'Intergroupe Francophone du Myélome (IFM), coordonné par le Pr Philippe Moreau. Collection FMC. 2010
- **Pascal L**, Gay J, Willekens C, Wemeau M, Balkaran S, Robu D, Roccaro A, Morel P, Ghobrial I, Leleu X. Bortezomib and Waldenström's macroglobulinemia. *Expert Opin Pharmacother*. 2009 Apr; 10(5) 909-16,
- Ferte C, **Pascal LB**, Penel N. Prognostic and predictive factors of soft tissue sarcoma: a daily use of translational research. *Bull Cancer*. 2009 Apr; 96(4): 451-60.
- **L Pascal**, X Leleu L'obtention de la réponse complète est un déterminant majeur de la survie prolongée chez les patients traités pour un myélome multiple en rechute par le bortézomib. *Hématologie*, vol. 14, n°5, septembre-octobre 2008 : 333

- **L Pascal**, X Leleu Myélome multiple, maladie de Waldenström et amylose. Hématologie, vol. 14, n° spécial 3, juillet 2008 : 25-29

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

- 2009 MDS Congress; Patras; Evaluation of cardiac iron overload by cardiac T2* in regularly transfused myelodysplastic patients. L Pascal, S Balkaran, S Brechignac, Q Sénéchal, O Beyne-Rauzy, H Chiavassa4, O Ernst, P Fenaux, C Rose for the GFM, Groupe Francophone des Myélodysplasies, P 088.
- 2010 ASH, Orlando, Highly transfused MDS patients often have cardiac iron overload, as shown by MRI assessment. Poster Session.
- 2011 EBMT, Paris: Cord blood transplantation: cord blood T cell feature, IL-7 dependance. P851
- 2012 SFGM-TC: Greffe de sang placentaire et conditionnement myéloablatif: impact du sérum anti-lymphocytaire, L Pascal, M Labopin, N Milpied, M Labalette, V Rocha, M Mohty, I Yakoub-Agha. Poster session.
- 2012 ASH, Atlanta: Low dose Interleukin-7 supplementation increases intrinsic cord blood T cell survival without enhancing proliferative alloresponses. Online publication
- 2013 EBMT, London: Impact of ATG-containing myeloablative conditioning on patient outcome after single-unit allogeneic cord blood transplantation; L Pascal, M Labopin, M Mohty, R Tabrizi, P Chevallier, N Milpied, M Labalette and I Yakoub-Agha. Poster session
- 2013 ASH, New-Orleans : Impact of rabbit anti-thymocyte globulin-containing reduced-intensity conditioning regimens on outcomes of adults undergoing unrelated cord blood transplantation for hematological malignancies; L. Pascal, L. Tucunduva, AL Ruggeri, M. Mohty, N. Fegueux, P. Chevallier, J. Cornelissen, N. Maillard, N. Milpied, E. Petersen, W. Linkesch, H. Sengeloev, C. Kenzey, E. Gluckman, V. Rocha and I. Yakoub-Agha on behalf of Eurocord-EBMT. Oral session
- 2014 EBMT, Milan: Impact of rabbit anti-thymocyte globulin-containing reduced-intensity conditioning regimens on outcomes of adults undergoing unrelated cord blood transplantation for hematological malignancies; L. Pascal, L. Tucunduva, AL Ruggeri, M. Mohty, N. Fegueux, P. Chevallier, J. Cornelissen, N. Maillard, N. Milpied, E. Petersen, W. Linkesch, H. Sengeloev, C. Kenzey, E. Gluckman, V. Rocha and I. Yakoub-Agha on behalf of Eurocord-EBMT. Oral session

GROUPE COOPERATEURS

- Membre de la société française d'hématologie (SFH)
- Membre du LYSA (lymphoma study association).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	16
1/ L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	17
• 1.1 Généralités sur l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)	17
• 1.2 Les indications relatives à l'allogreffe de CSH	19
• 1.3 Les exigences de compatibilité	19
▪ 1.3.1 Les principales caractéristiques du complexe majeur d'histocompatibilité	20
▪ 1.3.2 Reconnaissance antigénique et alloréactivité	21
• 1.4 Les différents donneurs de CSH	22
▪ 1.4.1 Le donneur familial	22
▪ 1.4.2 Le donneur non-apparenté	22
• 1.5 Les différentes sources de cellules souches hématopoïétiques	23
▪ 1.5.1 La moelle osseuse	23
▪ 1.5.2 Les cellules souches périphériques	23
▪ 1.5.3 Le sang placentaire	23
• 1.6 Les conditionnements pré-greffes	24
▪ 1.6.1 Conditionnement myéloablatif	25
▪ 1.6.2 Conditionnement atténué	25
▪ 1.6.3 Utilisation du sérum antilymphocytaire	26
• 1.7 La reconstitution immunologique post-greffe	27
▪ 1.7.1 Les grandes voies de régénération des lymphocytes T	27
▪ 1.7.2 Rôle de l'Interleukine-7 dans le retour à l'homéostasie du compartiment lymphocytaire T	31
2/ L'allogreffe de sang placentaire.	34
• 2.1 Généralités	34
• 2.2 Les problématiques spécifiques de l'allogreffe de sang placentaire	35
▪ 2.2.1 La nécessaire adéquation du choix du greffon de sang placentaire à son receveur	35
▪ 2.2.2 Une reconstitution immunologique retardée	38
▪ 2.2.3 Une susceptibilité accrue aux infections opportunistes	39
▪ 2.2.4 Le risque de réaction du greffon contre l'hôte aiguë et chronique après greffe de sang placentaire	39
• 2.3 Les propriétés particulières des cellules du sang placentaire	40
▪ 2.3.1 Les cellules souches hématopoïétiques	40
▪ 2.3.2 Propriétés des cellules T de sang de cordon	42

TRAVAUX PERSONNELS **46**

PARTIE I **49**

Les conséquences cliniques de la lymphodéplétion profonde induite par l'utilisation du SAL dans les conditionnements de greffe myéloablatif et à intensité réduite

- 1.1 Impact clinique de l'utilisation du sérum anti-lymphocytaire de lapin dans les conditionnements myéloablatifs lors d'une allogreffe de sang placentaire réalisée dans le cadre du traitement d'affections hématologiques malignes 49
- 1.2 Impact clinique de l'utilisation du sérum anti-lymphocytaire de lapin dans les conditionnements d'intensité atténué lors d'une allogreffe de sang placentaire réalisée dans le cadre du traitement d'affections hématologiques malignes 60
- 1.3 Travaux complémentaires 69
 - 1.3.1 Détermination du nombre de cellules viables disponibles au sein des greffons de sang placentaire 69
 - 1.3.2 Effet de l'utilisation du SAL en fonction du nombre de cellules mononucléées totales disponibles dans le greffon. 72
- 1.4 Conclusion de ces travaux complémentaires. 73

PARTIE II **76**

- 2.1 L'exposition quotidienne des lymphocytes T de sang de cordon à de faibles concentrations d'IL-7 améliore leur survie sans potentialiser leur réponse proliférative à une stimulation alloréactive. 76
- 2.2 Travaux complémentaires 89
 - 2.2.1 Influence des données gazométriques recueillies à la naissance 89
 - 2.2.2 Glucocorticoïdes et sang placentaire 91
- 2.3 Conclusion de ces travaux complémentaires 94

PERSPECTIVES : 97

- 1. Place de l'allogreffe de sang placentaire dans le choix d'un recrutement d'un donneur en 2014 97
- 2. Quels sont les axes d'amélioration de la greffe de sang placentaire ? 98
 - 2.1. La greffe double cordon 98
 - 2.2 Expansion des cellules souches de sang placentaire 99
 - 2.2.1 Modèle du ligand du récepteur de Notch 99
 - 2.2.2 Les cellules souches mésenchymateuses 101
 - 2.2.3 Chélateur du cuivre et du nicotinamide 101
 - 2.3 Amélioration de la localisation dans la moelle osseuse 102
 - 2.3.1 L'injection intra-osseuse du greffon 102
 - 2.3.2 L'utilisation de la fucosyl-transférase-IV 102
 - 2.3.3 La Prostaglandine E₂ 103
 - 2.4 Immunothérapie et allogreffe de sang placentaire 104
 - 2.4.1 Expansion des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de multivirus à partir de SP 104
 - 2.4.2 Cibler les antigènes leucémiques 105
 - 2.4.3 Les cellules NK dérivées de sang placentaire 106

BIBLIOGRAPHIE 108

ANNEXES 126

- **ANNEXE 1** Impact of rabbit ATG-containing myeloablative conditioning regimens on the outcome of patients undergoing unrelated single-unit cord blood transplantation for hematological malignancies. Article publié dans BMT octobre 2014. 127
- **ANNEXE 2** Impact of ATG-containing reduced-intensity conditioning after single or double-unit allogeneic cord blood transplantation analysis of risk factors and outcomes Article en revision dans la revue Blood. 141
- **ANNEXE 3** Impact of ATG-containing reduced-intensity conditioning after single or double-unit allogeneic cord blood transplantation analysis of risk factors and outcomes. Article en revision dans BBMT. 159

INTRODUCTION

1/ L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

- **1.1 Généralités**

Les données historiques sur l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) illustrent toutes les avancées réalisées dans ce domaine depuis une soixantaine d'années mais aussi combien les données fondamentales ont contribué à faire évoluer ce concept thérapeutique.

Après l'explosion des deux premières bombes atomiques au Japon à la fin de la seconde guerre mondiale, chercheurs et médecins se sont attachés à proposer des méthodes pour protéger les êtres vivants des radiations. Les premières expérimentations ont été menées par E.D. Thomas sur des souris puis sur des chiens.¹ En 1956, Barnes et Loutit émettent l'idée qu'une greffe de moelle osseuse pourrait exercer un effet thérapeutique dans certaines affections malignes. Ils observent dans un modèle murin l'effet anti-leucémique exercé par des cellules spléniques greffées.² Ils constatent également que les animaux bénéficiant d'une greffe allogénique décèdent rapidement par rapport aux animaux bénéficiant d'une greffe syngénique dans un tableau que nous qualifions aujourd'hui de maladie du greffon contre l'hôte (GVH). Les premières greffes réussies chez les chiens sont rapportées par E.D. Thomas après une irradiation corporelle totale (ICT),³ tandis que J Van Bekkum propose un modèle de greffe chez le singe.⁴ La première tentative chez l'homme est réalisée par E.D. Thomas après une ICT chez deux patients présentant une leucémie aiguë lymphoblastique à un stade avancé. Ces greffes syngéniques conduisent à une prise de greffe chez les deux patients mais ceux-ci décèdent d'une rechute quelques semaines après la procédure.

C'est en 1959 à l'hôpital Saint-Louis que Jean Bernard et Georges Mathé réalisent avec succès les toutes premières greffes de moelle osseuse chez l'Homme. Il s'agit de six physiciens yougoslaves irradiés accidentellement dans un réacteur nucléaire. Quatre survivent à la greffe.⁵ En 1965, Georges Mathé est le premier à décrire une prise de greffe à long terme, un chimérisme, ainsi qu'un effet du greffon contre la leucémie chez un patient ayant reçu une greffe d'un membre de sa fratrie.⁶ Toutefois, malgré une procédure de greffe réussie, le patient décède d'une GVH chronique compliquée d'une varicelle.

En 1970, l'équipe de Bortin rapporte une série de 203 greffes médullaires réalisées entre 1958 et 1968 avec seulement trois survivants.⁷ Les causes de décès sont alors

principalement liées à un défaut de prise de greffe, de GVH ou de rechute. Ces résultats catastrophiques font chuter le nombre de tentatives.

La découverte du complexe majeur d'histocompatibilité et du système HLA par Jean Dausset⁸ et JJ Van Rood⁹ vont permettre des progrès très importants : la sélection de donneurs familiaux apparentés et compatibles diminue le risque de rejet de greffe et de développement de GVH aiguë et chronique. En parallèle, les modèles animaux continuent à apporter leur contribution. Chez le chien, l'équipe de E.D.Thomas démontre l'intérêt de l'utilisation du Méthotrexate pour la prévention de la GVH et, chez la souris, l'équipe de G Santos démontre l'utilité du cyclophosphamide en association avec l'ICT pour améliorer l'immunosuppression liée à la greffe.^{10,11}

Georges Mathé définit alors l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, dans les maladies hématologiques malignes, comme une immunothérapie adoptive. Le principe de l'allogreffe est de remplacer un système hématopoïétique déficient et/ou malade par le système hématopoïétique d'un donneur sain. Le greffon doit être capable de reconstituer une hématopoïèse complète chez le receveur grâce à son contenu en cellules souches hématopoïétiques.¹² Par ailleurs, les cellules immunocompétentes contenues dans les greffons (lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs et mémoires, lymphocytes B naïfs et mémoires, cellules Natural Killer) confèrent au receveur une immunité anti-infectieuse partielle et surtout exercent une activité anti-tumorale¹³ dirigée contre les cellules leucémiques résiduelles (effet Graft versus Leukemia ou GVL).¹⁴

L'allogreffe est toujours précédée d'un conditionnement soit par chimiothérapie myéloablatrice soit par une chimiothérapie non myéloablatrice, (conditionnement dit réduit ou « atténué »). Le conditionnement peut être complété parfois par une irradiation corporelle totale. Le rôle de ces conditionnements est à la fois de minimiser le rejet du greffon par les lymphocytes T du receveur (réaction de l'hôte contre le greffon) et de participer à la destruction des cellules malignes résiduelles.

- **1.2 Indications de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques**

Il existe deux grands champs d'application de l'allogreffe de CSH.

Le premier, le plus important numériquement, est le traitement des affections hématologiques malignes du tissu hématopoïétique ou d'une tumeur maligne solide pouvant bénéficier d'une thérapeutique à visée éradicatrice (chimiothérapie très intensive et/ou irradiation étendue) :

- les leucémies aiguës, lymphoblastiques et myéloblastiques;
- certains syndromes myélodysplasiques ;
- certains syndromes lymphoprolifératifs : lymphomes malins hodgkinien et non-hodgkinien, myélome multiple des os, leucémie lymphoïde chronique ;
- certains syndromes myéloprolifératifs ;
- certaines tumeurs solides.

Le second champ d'application concerne les malades porteurs d'un « déficit » constitutionnel ou acquis de tout ou partie de son tissu hématopoïétique :

- aplasies médullaires constitutives (anémie de Fanconi) ou acquises ;
- hémoglobinopathies (thalassémie, drépanocytose) ;
- déficits immunitaires combinés sévères ;
- anomalies enzymatiques portant sur le système hématopoïétique (maladie de Gaucher).

Dans ces derniers cas, le greffon de cellules souches hématopoïétique apportera l'élément déficitaire au receveur (soit l'enzyme, soit la population de cellules immunocompétentes, soit une nouvelle hématopoïèse).

- **1.3 Les exigences de compatibilité**

Les antigènes peptidiques sont accessibles au récepteur pour l'antigène des lymphocytes T (TCR), grâce à la fonction de présentation de l'antigène des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'extrême diversité de ce complexe dicte l'acceptation

(histocompatibilité) ou le rejet des greffes entre donneur et receveur et ce contexte est à l'origine de sa découverte et de sa dénomination. En effet, Jean Dausset qui a décrit le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) chez l'Homme, dénommé HLA (Human Leucocyte Antigen) a identifié la première molécule d'histocompatibilité comme un antigène leucocytaire.¹⁵

▪ **1.3.1 Les principales caractéristiques du complexe majeur d'histocompatibilité**

Les gènes HLA classiques sont situés sur le bras court du chromosome 6 et codent pour les molécules qui assurent la fonction de présentation de l'antigène et l'histocompatibilité. Ce complexe est subdivisé en trois régions qui contiennent chacune de nombreux autres gènes avec ou sans fonction immunologique. La région CMH de classe I comprend 3 gènes HLA de classe I dits classiques, HLA-A, HLA-B et HLA-C. La région CMH de classe II comprend trois paires de gènes HLA de classe II, HLA-DP (gènes DPA et DPB), HLA-DQ (DQA et DQB) et HLA-DR (DRA et DRB1). La région III, située entre les régions I et II, ne contient pas de gènes intervenant dans la présentation antigénique.

Les deux classes de gènes HLA classiques se caractérisent par un polymorphisme génétique multi-allélique, le plus important de l'espèce humaine. Pour chaque gène HLA classique, on comptabilise un très grand nombre d'allèles (Tableau 1).

HLA de classe I				HLA de classe II						
Gènes	A	B	C	Gènes	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1
Allèles	2946	3693	2466	Allèles	7	1684	52	712	38	472
Protéines	2077	2741	1736	Protéines	2	1237	32	473	19	390

Tableau 1 : Nombre d'allèles HLA référencés pour chaque locus, d'après la base de données de l'International ImMunoGeneTics project, octobre 2014.

Chaque individu est hétérozygote pour la plupart de ses gènes HLA de classe I et de classe II et à ce titre, ceci lui confère un caractère quasi-unique. Ce polymorphisme génétique se traduit au niveau de la protéine correspondante (allotype HLA) par des différences de un ou plusieurs acides aminés principalement concentrées sur la région correspondant à la niche à peptide. En raison de la codominance, l'hétérozygotie se traduit pour chaque gène HLA par l'expression des deux allotypes portés chacun par un chromosome 6. L'ensemble des gènes HLA d'un chromosome 6 correspond à un haplotype HLA. On note des déséquilibres de liaison entre les allèles de gènes HLA différents au sein d'un même haplotype ce qui donne

une plus grande probabilité de trouver associés deux allèles sur un haplotype que ne le voudrait le hasard. Enfin, chaque haplotype HLA, paternel et maternel, est transmis en « bloc » aux enfants. Ainsi, au sein d'une famille, la probabilité d'une identité HLA entre frères et sœurs est proche de 25%.

L'expression des molécules HLA classiques varie selon leur classe. Les molécules CMH de classe I sont exprimées par pratiquement toutes les cellules nucléées de l'organisme avec une densité variable selon le type cellulaire et le contexte inflammatoire. L'expression des molécules du CMH de classe II est limitée à l'état basal aux cellules présentatrices d'antigènes professionnelles que sont les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages et les lymphocytes B. Les cellules épithéliales et endothéliales n'expriment les molécules CMH de classe II que dans un contexte inflammatoire.

▪ 1.3.2 Reconnaissance antigénique et alloréactivité

Après l'étape d'éducation thymique, le répertoire des lymphocytes T est tel que l'ensemble des TCR est apte à reconnaître avec une faible affinité une multitude de complexes CMH-peptide du soi. Les lymphocytes sont ainsi capables de discriminer le soi pour répondre puissamment au non-soi. Cette reconnaissance est néanmoins « dégénérée » de telle sorte qu'un TCR puisse en fait reconnaître différents complexes CMH-peptide.

Ces modalités de reconnaissance des récepteurs T sont à l'origine de la réponse alloréactive qui s'exerce dans le contexte de l'allogreffe. En cas de disparité en antigènes HLA entre donneur et receveur, un récepteur T peut reconnaître une molécule CMH étrangère, dite allogénique (mismatch HLA) présentant comme toute molécule HLA des peptides issus de la dégradation de protéines. Selon le nombre et la nature des mismatches HLA entre donneur et receveur, 1 à 10% des lymphocytes T peuvent avoir un TCR capable de reconnaître fortement la combinaison CMH allogénique-peptide et être ainsi activés. A côté de cette réaction allogénique majeure, même en l'absence de mismatch HLA, c'est-à-dire dans le contexte d'allogreffes où Donneur et Receveur sont HLA-identiques, la dégénérescence de reconnaissance du TCR conduit également à une réaction alloréactive d'intensité variable. Dans ce cas, les lymphocytes T contenus dans le greffon reconnaissent et réagissent des complexes CMH-peptide où le peptide est assimilé à un peptide du « non soi » : ces peptides sont en effet perçus comme des peptides étrangers lorsqu'ils sont issus de la dégradation de

protéines endogènes présentant un polymorphisme allélique. La seule condition est que ces peptides respectent des critères de taille et d'ancrage dans la niche à peptide. Ils sont appelés antigènes mineurs. La réaction allogénique qu'ils déclenchent est pourtant loin d'être négligeable.

Cette alloréactivité aux antigènes majeurs et mineurs est la base moléculaire des réactions de rejets et de la maladie du greffon contre l'hôte.

- **1.4 Les différents donneurs de cellules souches hématopoïétiques**

Le choix d'un donneur est dicté en priorité par le respect des critères d'histocompatibilité et par conséquent une recherche d'identité 10/10 (HLA-A, B et C pour la classe I, HLA-DR et -DQ pour la classe II) ou 12/12 selon que l'on recherche également une compatibilité supplémentaire pour le locus HLA-DP. Cette identité doit se situer au niveau allélique et elle est établie grâce à un typage de haute résolution des différents antigènes HLA. Cette identité permet de limiter la réaction allogénique aux antigènes mineurs.¹⁶

- **1.4.1 Le donneur familial**

Pour répondre aux exigences d'identité, le choix du donneur se porte logiquement en priorité sur un membre de la fratrie où la probabilité qu'un membre de la fratrie soit HLA-identique est de l'ordre de 25%. Le donneur apparenté HLA-identique permet de réaliser une greffe « phéno-identique » voire « géno-identique » si les haplotypes parentaux sont déterminés. En l'absence de donneur familial ou non-apparenté HLA-identique mais d'une indication formelle de greffe de CSH, il est possible de réaliser une greffe « haplo-identique ». Le terme haplo-identique indique que le donneur présente un seul de ses deux haplotypes HLA en commun avec le receveur. Il s'agit généralement d'un ascendant ou d'un descendant du receveur.

- **1.4.2 Le donneur non-apparenté**

En l'absence de donneur HLA-identique identifié dans la fratrie, le choix du médecin greffeur se portera sur un donneur non-apparenté volontaire inscrit sur un registre national ou international de donneur volontaire de cellules souches hématopoïétiques. Nous sommes alors dans une situation de donneurs « phéno-identiques ».

- **1.5 Les différentes sources de cellules souches hématopoïétiques**

- **1.5.1 La moelle osseuse**

C'est historiquement la moelle osseuse (MO), siège de l'hématopoïèse, qui a été la première source de cellules souches hématopoïétiques à avoir été utilisée. La moelle est prélevée sous anesthésie générale au niveau des crêtes iliaques du donneur. Le volume de moelle prélevé varie en fonction du poids du receveur (entre 600 et 1000 mL) et permet de recueillir de l'ordre de 2 à 3 x 10⁸ cellules nucléées totales (CNT)/kg de poids du receveur.

- **1.5.2 Les cellules souches périphériques**

La possibilité de recueillir des Cellules Souches Périphériques (CSP) après stimulation par le Colony-Granulocyte Stimulating Factor (G-CSF) est apparue dans un second temps. Le sang périphérique d'un sujet adulte contient physiologiquement un très petit nombre de cellules souches hématopoïétiques. On peut augmenter leur fréquence en les mobilisant de la MO vers le compartiment circulant au moyen du G-CSF. Les CSH sont alors comptabilisées en réalisant en numération des cellules CD34⁺ circulantes. Elles sont recueillies par cytophérèse. Le développement important de cette technique est lié à la possibilité de réaliser alors le prélèvement sans prendre le risque d'une anesthésie générale chez le donneur.

- **1.5.3 Le sang placentaire**

La troisième source de greffon de CSH actuellement utilisée est le sang de cordon ombilical. Sa richesse en CSH est connue depuis une quarantaine d'années¹⁷ et Broxmeyer et al., ont établi que le nombre de SCH dans le sang de cordon permettait d'envisager cette source comme greffon.¹⁸ Le sang placentaire contient effectivement un grand nombre de cellules souches hématopoïétiques même si le volume de sang est en pratique assez modeste (de l'ordre de 50 mL à 150 mL). Après recueil, le sang de cordon est traité pour éliminer une partie de la fraction érythrocytaire puis congelé en azote liquide. Ces allogreffes sont essentiellement utilisées dans le cadre d'allogreffe avec un receveur non-apparenté, et plus exceptionnellement pour un frère ou une sœur malade.

Le réseau français du sang placentaire (RFSP) comptabilisait au 31 décembre 2012, 23539 unités de sang placentaire (USP) cryopréservées au sein de 11 banques de sang placentaire et de la bibliothèque d'Annemasse.

En 2012, le nombre total de prélèvements de CSH s'élève à 1133 en France et suit la répartition suivante : 263 d'origine médullaire, 557 CSP et 313 USP. On observe pour la première fois une baisse des prélèvements d'origine périphérique (baisse de 2.3% par rapport à 2011) et une tendance à l'augmentation des sources d'origine médullaire (Figure 1).

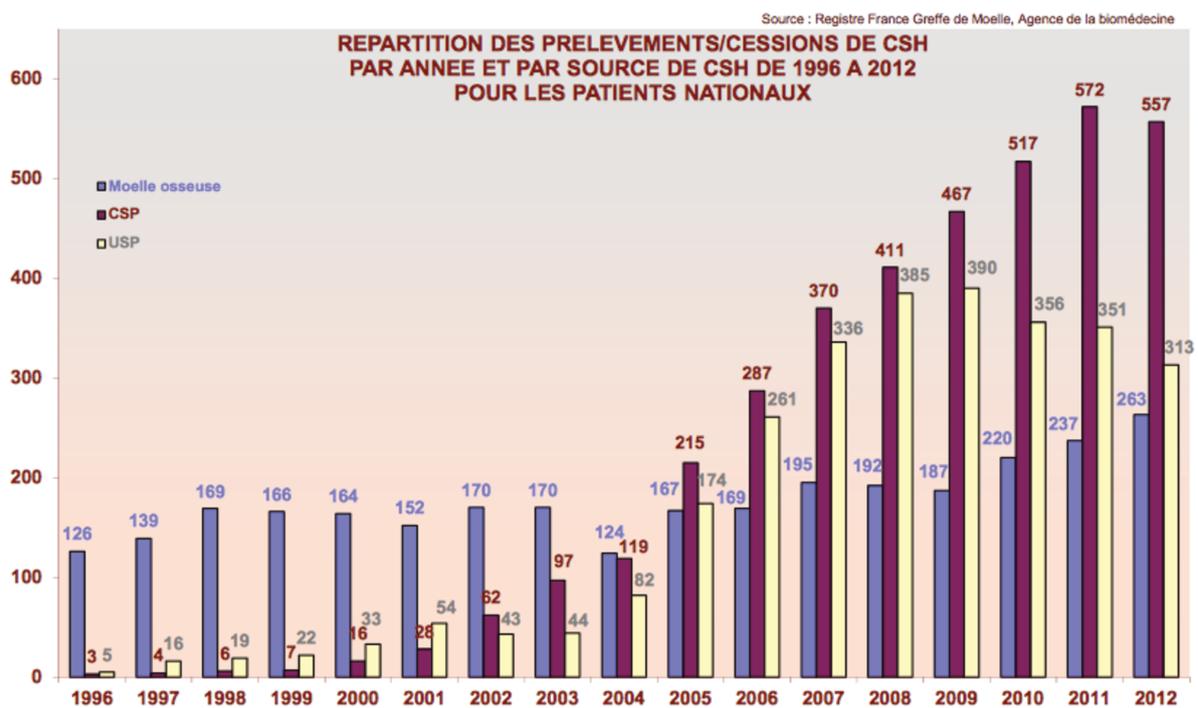


Figure 1 : Répartition des différentes sources de cellules souches hématopoïétiques de 1996 à 2012 en France, selon le rapport annuel de l'Agence de Biomédecine. (CSP : cellules souches périphériques ; USP : unités de sang placentaire)

- **1.6 Les conditionnements pré-greffes**

Le conditionnement pré-greffe du receveur joue un rôle central dans l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Il doit obéir à trois obligations : 1/ créer un espace disponible pour permettre l'ensemencement du greffon, 2/ exercer une action immunosuppressive sur le système immunitaire du receveur pour prévenir la réaction de l'hôte vis-à-vis du greffon 3/ participer à l'éradication de la maladie dans le cas d'une pathologie maligne sous-jacente.

Son choix est la source d'un questionnement permanent pour le greffeur : comment contrôler la maladie sans augmenter la toxicité ? En effet, ce conditionnement est un élément clef de la mortalité post-greffe. Une erreur dans le choix et dans l'administration du conditionnement de greffe peut entraîner des complications sérieuses voire potentiellement fatales.

Pour comprendre la diversité actuelle des conditionnements de greffes, il faut se remémorer le contexte historique dans lequel elles ont été développées. La transplantation médullaire était initialement envisagée comme un outil en cas d'accident d'une technologie afférent à la maîtrise de la fission ou de la fusion de l'atome. Concomitamment, l'irradiation corporelle totale a démontré son efficacité dans l'éradication des cellules leucémiques sans causer trop de dommages pour les autres organes du corps humain. Le conditionnement venait alors préparer le receveur à accepter le nouvel organe à la place de l'hématopoïèse déficiente ou malade. L'irradiation corporelle totale (ICT) permettait la prise de greffe mais ne permettait pas à elle seule de contrôler la maladie au long terme.

▪ **1.6.1 Le conditionnement myéloablatif**

L'ajout du cyclophosphamide à l'ICT est à la base de toute transplantation médullaire dans les années soixante-dix.^{1,19,20} Dans les années quatre-vingt, un effort a été mené pour intensifier les conditionnements dans l'objectif de minimiser le risque de rechute ou de défaut de prise de greffe. Différents centres ont tenté d'utiliser l'ICT en association avec une autre molécule ; cependant, il n'existe actuellement pas de consensus sur les doses maximales tolérées. Aucun conditionnement n'a démontré un avantage significatif par rapport aux autres. Tout gain obtenu dans la diminution du risque de rechute est habituellement accompagné par une augmentation parallèle de la mortalité liée à la procédure de greffe.

▪ **1.6.2 Le conditionnement atténué**

Le concept de conditionnement atténué a été développé pour circonvier aux difficultés rencontrées avec les receveurs ayant des comorbidités significatives ou présentant un âge avancé au moment de la greffe. Le but recherché par le conditionnement atténué n'est pas l'éradication de la maladie sous-jacente ou la destruction de toute l'hématopoïèse du

receveur au moyen d'une chimiothérapie cytotoxique. Il n'a pour but que d'entraîner une immunosuppression suffisante pour permettre la prise de greffe. Depuis plusieurs années, plusieurs types de conditionnements atténués ont été développés, la plupart d'entre eux étant basés sur l'utilisation de la fludarabine. Les conditionnements atténués font désormais parties des stratégies utilisées quotidiennement en transplantation médullaire, en particulier pour les patients âgés. Aucune étude n'a démontré un bénéfice évident en terme de survie globale comparativement aux conditionnements myéloablatifs classiques. Ce type de conditionnement offre une toxicité réduite sur les organes, un taux de GVH inférieur et des complications infectieuses moins nombreuses. La contrepartie est un risque de rechute accru par rapport au conditionnement standard.²¹⁻²⁴

▪ 1.6.3 Utilisation du sérum antilymphocytaire

Les anticorps anti-lymphocytes présents dans le sérum anti-lymphocytaire (SAL) sont des anticorps polyclonaux qui présentent un large panel de spécificités. Ils peuvent être d'origines différentes selon leur mode de production (chevaux, lapins et plus exceptionnellement chèvres ou cochons). Le mécanisme d'action du SAL est basé sur une destruction *in vivo* des lymphocytes T à laquelle s'ajoute également une élimination des lymphocytes B, des lymphocytes Natural Killer, des macrophages et des cellules dendritiques également cibles de ces Ac anti-lymphocytes. En raison de son action immunosuppressive, le SAL est utilisé soit pour traiter la GVH en post-greffe soit pour en prévenir l'apparition (en association avec le conditionnement). Le SAL est essentiellement utilisé dans les situations de transplantation avec un risque élevé d'échec de la greffe : greffes avec soustraction de lymphocytes T, greffes de cellules souches hématopoïétiques issues de sang placentaire, allo-immunisation du receveur due à de multiples transfusions préalables, greffes à conditionnement atténué. Malgré des résultats prometteurs en terme de prévention de la GVH et une prise de greffe facilitée, son utilisation est obérée par des effets secondaires multiples (réactions anaphylactiques lors de la perfusion, syndrome de relargage cytokinique, réactivation du CMV et de l'EBV, apparition d'un syndrome lymphoprolifératif du transplanté) et un risque accru de rechutes. Précisons que même pour le SAL de lapin, le plus étudié et le plus utilisé, la dose idéale de SAL à administrer n'a pas été définie.²⁵⁻²⁸

- **1.7 La reconstitution immunologique post-greffe**

A l'issue du conditionnement pré-greffe, le repeuplement du compartiment lymphocytaire ne s'opère pas selon la même cinétique pour les populations lymphocytaires T, B et NK. Il débute dès le premier mois après l'allogreffe par l'apparition des cellules NK qui représentent alors 80% des lymphocytes du compartiment périphérique. Les lymphocytes B atteignent des valeurs normales dans les 3 mois post-greffe. En revanche, la reconstitution du compartiment T est un processus lent qui procède en plusieurs étapes.

La qualité et la rapidité de la reconstitution post-greffe du compartiment T sont des éléments critiques de la survie post-allogreffe de CSH. Une reconstitution harmonieuse requiert le repeuplement équilibré des différents sous-compartiments T, CD4 et CD8, naïfs et mémoire. Chaque sous-compartiment T va solliciter toutes les sources auxquelles il peut prétendre pour assurer son repeuplement. Celles-ci n'ont pas toutes la même capacité ni la même efficacité qualitative et elles vont entrer dans certains cas en compétition.²⁹

- **1.7.1 Les grandes voies de régénération des lymphocytes T**

Pour restaurer le compartiment T, deux grandes voies de régénération vont être sollicitées. On distingue la voie thymique, qui permet le réensemencement du compartiment périphérique en cellules T naïves et, la régénération T thymo-indépendante par expansion périphérique de cellules T matures qui conduit à la production de cellules T de phénotype « mémoire ». Ces lymphocytes T matures sont principalement ceux contenus dans le greffon mais des lymphocytes T résiduels du receveur peuvent participer à ce processus lors de conditionnement réduit.

- **La voie thymique**

Le rôle chez l'Homme du thymus dans la reconstitution du compartiment T naïf a pu être démontré au travers d'études de receveurs d'allogreffes de moelle préalablement thymectomisés³⁰ et lors de greffes de CSH préalablement appauvries de leur contenu en lymphocytes T.^{31,32}

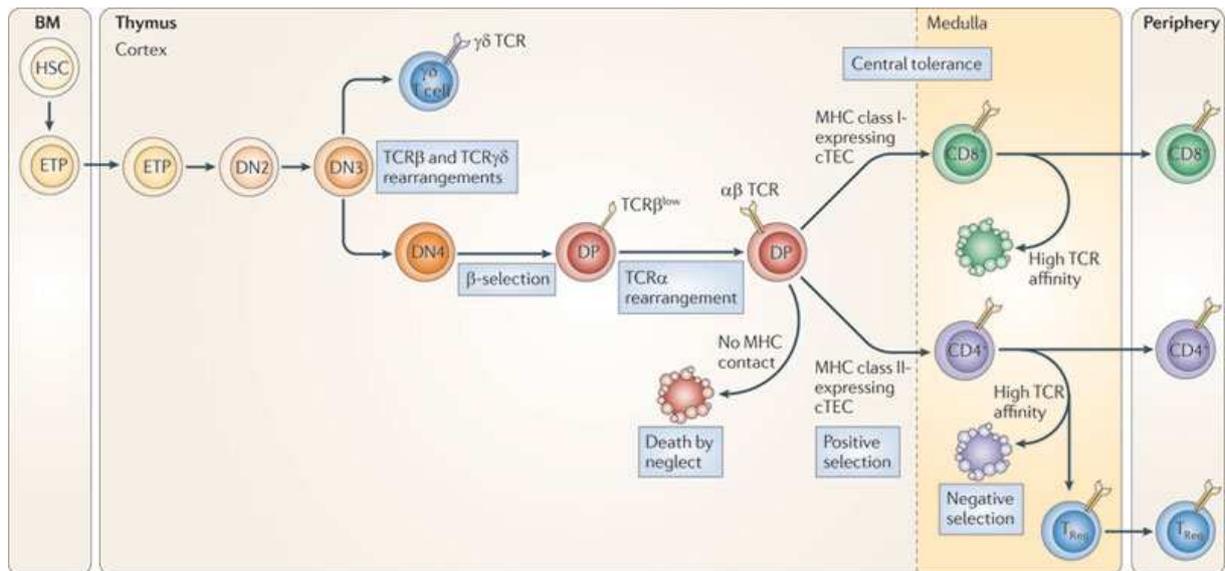


Figure 2: Les évènements majeurs au cours de la différenciation thymique des cellules T, d'après Miller et al.³³

Après colonisation par les cellules souches progénitrices du donneur du tissu médullaire du receveur, les cellules souches et les précurseurs lymphoïdes migrent vers le thymus.³³ Les cellules progénitrices thymiques double négatives (DN) subissent une maturation thymique conduisant au stade DN3 au réarrangement de la chaîne β du récepteur T. L'expression ultérieure du TCR entraîne la différenciation des DN en cellules doubles positives (DP) $CD4^+$ et $CD8^+$. Ces DP passent ensuite par deux processus de sélection positive et négative. Ces deux étapes conduisent à un répertoire lymphocytaire T périphérique diversifié indispensable à la reconnaissance de néo-antigènes. La quantification par PCR quantitative des cercles d'excision des TCR (TREC), présents dans les émigrants thymiques récents (ETR) permet d'évaluer indirectement la thymopoïèse.³⁴ En périphérie, ces lymphocytes T matures naïfs peuvent survivre au stade d'interphase de manière prolongée sans proliférer pendant plusieurs mois, voire une année.³⁵ En situation de lymphopénie, les émigrants thymiques récents peuvent proliférer tout en conservant leur phénotype naïf et les capacités fonctionnelles correspondantes, avant d'entrer en quiescence. Cette expansion post-thymique sans conversion « memory-like » est néanmoins pilotée par l'engagement du TCR, donc en principe les complexes CMH-peptide du « soi », et par les cytokines homéostatiques.^{36,37}

La régénération de lymphocytes T naïfs par voie thymique est un processus lent qui ne devient effectif que plusieurs mois après l'allogreffe, même chez le sujet jeune. Ce processus est fortement perturbé par l'involution du thymus chez le receveur âgé.³⁸ Il est également

altéré par l'irradiation pré-greffe et par l'effet GvH qui lèsent les cellules épithéliales thymiques et diminuent les capacités de l'épithélium thymique à produire de l'IL-7, cytokine indispensable à la survie des thymocytes.

- **L'expansion homéostatique des cellules T matures**

L'identification de cette voie de régénération repose sur des expériences de reconstitution du compartiment T périphérique de souris adultes thymectomisées et irradiées ou de souris athymiques au moyen d'inoculum de cellules T périphériques. Les lymphocytes T matures se sont avérés capables de reconstituer durablement au niveau quantitatif le compartiment T périphérique des animaux receveurs. Cette reconstitution repose sur la prolifération intense d'un pool de lymphocytes T matures ayant déjà réarrangé les gènes codant pour leur TCR $\alpha\beta$ (expansion homéostatique périphérique). Différents travaux ont précisé les caractéristiques de cette voie de régénération :

- la capacité de reconstitution est relativement indépendante de la taille de l'inoculum. Celui-ci a une incidence sur le temps nécessaire pour la reconstitution mais le plus souvent la totalité du potentiel d'expansion des cellules T matures n'est pas atteint. Ainsi, le degré d'expansion des cellules T périphériques varie selon le degré de déplétion du compartiment périphérique.³⁹
- la diversité du répertoire T est limitée après expansion périphérique : un inoculum de très faible taille ou la surreprésentation d'antigènes de forte affinité aboutit à la restauration d'un répertoire biaisé, oligoclonal.^{40,41}
- la régénération s'opère avec une étape de « sélection positive » périphérique déclenchée par l'interaction entre le TCR $\alpha\beta$ et une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité enchâssant un peptide.
- la capacité d'expansion des cellules T matures nécessite l'intégrité du micro-environnement des organes lymphoïdes : chez des souris présentant une réaction du greffon contre l'hôte, l'altération des organes lymphoïdes secondaires perturbe l'expansion des cellules T matures, sans que celles-ci ne présentent d'anomalies intrinsèques.⁴²
- les cellules T qui repeuplent le compartiment T par un processus d'expansion périphérique se caractérisent par un phénotype de cellules éduquées/mémoires.⁴³ Ainsi, des cellules T naïves contenues dans un greffon adoptent après expansion un phénotype «memory-like».⁴⁴

La possibilité d'une reconstitution par redistribution des cellules T mémoire du compartiment tissulaire vers le compartiment systémique est faible ou nulle dans le cas de la déplétion T engendrée par les conditionnements pré-greffes.

- **L'efficacité post-greffe des différentes voies de régénération du compartiment T**

Lorsque le thymus est en place et la régénération thymo-dépendante efficace, celle-ci exerce une régulation négative sur le processus d'expansion périphérique qui occupe alors une place moindre. A l'inverse, le processus d'expansion périphérique prend toute son importance chez les receveurs âgés chez qui la fonction thymique est détériorée. Celui-ci permet alors de parvenir à un compartiment T à environ 75% de la taille normale, parfois après plusieurs années.

La régénération du compartiment T par voie thymique étant un processus lent, ce sont les populations lymphocytaires T matures transférées avec le greffon de CSH qui assurent la phase initiale de reconstitution.⁴⁵ Leur qualité et leur nombre au sein du greffon sont donc déterminants. Après le premier trimestre ou semestre, la cinétique de reconstitution dépend principalement de l'âge du receveur et de ses capacités de régénération par l'entremise d'un thymus fonctionnel.^{31,38,46}

Quand on examine de plus près les populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺, celles-ci ne suivent pas la même cinétique de reconstitution : la correction globale des cellules T CD8⁺ est plus rapide. Cette différence est responsable d'une inversion du rapport CD4/CD8 au cours des premiers mois post-greffe, d'autant plus prolongée que le receveur est âgé.

Chez l'enfant, la régénération des lymphocytes T CD4⁺ prend environ 6 à 18 mois contre 3 à 6 mois pour les lymphocytes T CD8⁺. Les lymphocytes T CD4⁺ qui apparaissent progressivement expriment l'isoforme CD45RA et se sont relativement peu divisés en périphérie. Chez l'adulte, en revanche, on observe une correction incomplète de la lymphocytose T CD4⁺ : à 3 mois, les lymphocytes T CD4⁺ n'atteignent que 35% de leur valeur de base, avec une augmentation minime des lymphocytes T CD4⁺ de phénotype naïf (CD45RA⁺). Les cellules T CD4⁺CD45RO⁺ de type mémoire prédominent très largement à plus de 12 mois. A ce stade, le nombre absolu de lymphocytes T CD8⁺ s'est déjà normalisé, grâce à un temps de doublement inférieur à celui des lymphocytes T CD4⁺, quelque soit l'âge du patient et la taille de son thymus, mais les cellules T CD8⁺ ont alors pour la plupart d'entre elles un phénotype « memory-like ».⁴⁷ Les cellules dendritiques qui supportent l'expansion

homéostatique des cellules T matures par l'entremise de l'interaction TCR-pCMH, pourraient pénaliser la prolifération des cellules T CD4⁺ et être indirectement responsables de la mauvaise expansion homéostatique des lymphocytes T CD4⁺.⁴⁸

La normalisation des cellules T CD4⁺ phénotypiquement naïves riches en cercles d'excision n'est ainsi obtenue qu'après une à deux années,^{34,38} mais le déséquilibre persiste souvent plus longtemps, comme en attestent les études rétrospectives menées dix ans et plus après autogreffe ou allogreffe de CSH.⁴⁹⁻⁵¹ Les émigrants thymiques récents, quoique générés en nombre limité en raison de l'involution thymique, conservent leur capacité d'expansion sans conversion phénotypique au moins jusqu'à la sixième décennie.⁵²

L'ensemble de ces données souligne le rôle essentiel du thymus dans la reconstitution du compartiment T naïf périphérique. Après la lymphodéplétion engendrée par le conditionnement pré-greffe, la voie thymique est la seule voie garantissant le rétablissement d'un répertoire TCR diversifié assurant l'immunité anti-infectieuse vis-à-vis de nouveaux antigènes, une réponse vaccinale et un contrôle des maladies auto-immunes.⁵³ Le corollaire est un repeuplement précoce du compartiment T périphérique par l'expansion homéostatique de cellules T matures, naïves et mémoires, apportées par les greffons de cellules souches non expurgés en lymphocytes T, et à laquelle participent éventuellement les cellules T ayant échappé au traitement par chimiothérapie/radiothérapie, selon son intensité. De ce fait, le compartiment T est initialement restauré par des cellules T majoritairement de phénotype « memory like » et dont le répertoire initial est de caractère restreint.

▪ 1.7.2 Le rôle de l'interleukine-7 dans le retour à l'homéostasie du compartiment lymphocytaire T

La mise en évidence de l'implication de différentes cytokines dans l'homéostasie des lymphocytes T découle de l'observation initiale de leurs capacités à bloquer, *in vitro*, l'apoptose de ces cellules. Si plusieurs cytokines interviennent dans ce processus, ce sont l'IL-7 et l'IL-15 qui représentent les véritables cytokines homéostatiques et qui jouent un rôle majeur dans la survie des cellules T naïves et/ou mémoires. Le rôle de l'IL-7 est critique car elle est absolument indispensable à la thymopoïèse et à la survie des cellules T naïves.

L'IL-7 est produite à la fois dans les organes lymphoïdes centraux, les organes lymphoïdes

secondaires et de nombreux tissus, principalement par les cellules stromales et épithéliales. Elle est produite en quantité limitée, à dose relativement constante, et demeure principalement au sein de la matrice extracellulaire.⁵⁴ Son récepteur (IL-7R) est un hétérodimère, composé d'une chaîne α (IL-7Ra ou CD127) et de la chaîne γ -commune aux récepteurs des cytokines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 (γ_c ou CD132).⁵⁵

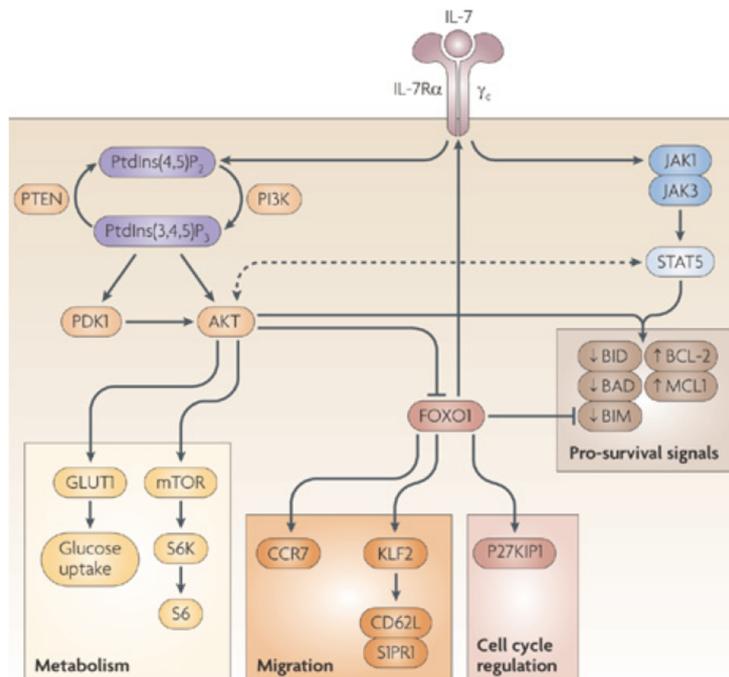


Figure 3 : Les différentes voies de signalisation de l'IL-7/IL-7R, d'après Takada et al.⁵⁶

L'engagement de l'IL-7R par l'IL-7 active les Janus-kinases JAK1 et JAK3 (qui catalysent principalement la phosphorylation des protéines STAT5A et STAT5B), la phosphoinositol 3-kinase, mais aussi les kinases de la famille src^{57,58} et des kinases activées par les mitogènes (MAP kinases).⁵⁹ Par les voies de la PI3-kinase et des Janus kinases, l'IL-7 contrôle la survie des cellules T en induisant l'expression des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et MCL1 et en inhibant l'expression de facteurs pro-apoptotiques Bid, Bad et Bim.⁶⁰ Via la voie PI3-kinase/AKT, l'IL-7 renforce également les capacités métaboliques des cellules T en augmentant l'expression du transporteur de glucose GLUT1.⁶¹ Enfin, l'IL-7 module les capacités de migration et le cycle cellulaire des lymphocytes T via la voie PI3K/AKT et l'inhibition de FOXO1 (Forkhead box O1).^{62,63} FOXO1 promeut normalement l'expression du récepteur de chimiokines CCR7⁶⁴ et celle de KLF2 (Kruppel-like factor 2), lequel induit la sélectine-L (CD62L) et le récepteur de la sphingosine 1-phosphate (S1PR1), qui contrôle la

sortie des lymphocytes hors des ganglions).⁶⁵ Au total, l'engagement du récepteur à l'IL-7 modifie la capacité de survie, le métabolisme, les capacités migratoires et la régulation du cycle cellulaire (Figure 3).⁶⁶

En situation d'homéostasie du compartiment T, les signaux résultant de l'engagement du TCR $\alpha\beta$ et de l'IL-7 sont indispensables à la survie prolongée des cellules T naïves. Ils déclenchent leur division sporadique en préservant leur phénotype naïf mais sont insuffisants pour déclencher leur prolifération intense.^{67,68} La compétition pour un nombre limité de complexe CMH/peptide du soi contribue au maintien de la diversité du répertoire des cellules T naïves,⁶⁹ et la faible quantité d'IL-7 disponible à l'état basal, au regard de l'abondance des cellules T, régule étroitement la taille du compartiment, en plaçant les cellules T naïves en situation de compétition altruiste vis-à-vis de l'IL-7.⁷⁰ En effet, la signalisation de l'IL-7 entraîne la diminution de l'expression de son récepteur au niveau transcriptionnel tandis que l'absence de la cytokine augmente l'expression de l'IL-7R α . Cette boucle de régulation négative permet à un maximum de cellules T naïves de survivre avec une source limitée d'IL-7.

En situation de lymphopénie sévère, la diminution du nombre de cellules T entraîne une diminution de la consommation de l'IL-7 et accroît de ce fait la biodisponibilité de l'IL-7. Après allogreffe de moelle osseuse, le conditionnement pré-greffe déclenche une élévation transitoire des taux plasmatiques d'IL-7 avec un taux maximal à J14/J21 post-greffe selon le conditionnement⁷¹. Exposées à de fortes concentrations d'IL-7, les cellules T disponibles consomment l'IL-7 et prolifèrent grâce à l'engagement conjoint de leur récepteur clonotypique. Dans ces conditions, les complexes CMH-peptides du soi deviennent mitogéniques, et durant leur expansion, les cellules acquièrent un phénotype analogue à celui des cellules T mémoires et leur répertoire est relativement restreint.⁷² Ce sont les principaux effecteurs des effets GVL et GVH au cours des premières semaines post-greffe.

2/ L'allogreffe de sang placentaire

▪ 2.1 Généralités

Le concept de l'utilisation de sang de cordon ombilical comme source de cellules souches hématopoïétiques a été posé à la fin des années 60. En 1972, l'équipe d'Ende publiait un article qui évoquait pour la première fois le potentiel hématopoïétique du sang fœtal.⁷³ Dans ce premier exemple publié, des échantillons de 8 cordons ombilicaux différents ont été recueillis afin d'être greffés à un jeune homme de 16 ans atteint d'une leucémie aiguë lymphoblastique traitée préalablement. Bien que cette tentative n'ait pas abouti à une reconstitution hématologique, Ende démontrait qu'il était possible d'obtenir, au moins de manière transitoire, un chimérisme mixte avec ce type de cellules souches hématopoïétiques.⁷³

Dans les années 1980, des modèles murins ont permis de conforter l'hypothèse qu'une reconstitution médullaire à long terme était possible. Boyse a réalisé 4 expérimentations différentes : dans la première, des souris mâles (B6 X A-T1a^b) âgées de 7 semaines étaient irradiées puis greffées avec du sang total hépariné obtenu sur des embryons de souris (B6 X A-T1a^a). Après 30 jours, les souris survivantes étaient typées pour le marqueur T1a permettant de distinguer l'origine des cellules. Ces souris présentaient une reconstitution hématopoïétique à partir des cellules du donneur. Cette expérience, suivie de trois autres a évalué les possibilités de prise de greffe dans trois situations : 1°) en cas d'utilisation de petits volumes de sang fœtal ; 2°) en cas d'utilisation de sang de nouveau-nés de moins de 24 heures ; 3°) en cas d'utilisation de petits volumes de sang nouveau-nés. A chacune de ces étapes, la reconstitution hématologique post-greffe était obtenue, même en cas de petits volumes. EA Boyse et HE Broxmeyer ont poursuivi en postulant que des poches de sang placentaire collectées à la naissance contenaient assez de progéniteurs hématopoïétiques pour un usage thérapeutique. Une étude multicentrique portant sur 101 échantillons démontrait rapidement la justesse de cette analyse : dans le sang de cordon le nombre de progéniteurs correspondait au bas de la fourchette de la quantité de progéniteurs nécessaires à la prise de greffe. Les échantillons pouvaient également être congelés, stockés, et décongelés sans déperdition majeure.^{18,74}

La localisation de l'hématopoïèse varie durant le développement fœtal. Elle est initialement réalisée à la fois dans une structure extra-embryonnaire (le sac vitellin) et dans une structure intra-embryonnaire (l'aorte). Dans un second temps, l'hématopoïèse migre et est retrouvée dans le foie et dans la moelle osseuse. Durant la vie fœtale, les cellules souches circulent dans le sang et ce n'est qu'après la naissance qu'elles sont presque exclusivement localisées dans la moelle osseuse. Chez l'adulte, l'hématopoïèse est intégralement réalisée dans la moelle osseuse.^{75,76}

La première allogreffe de sang de cordon a été réalisée à Paris en 1988 par le Pr. E Glukman à l'hôpital Saint Louis, sur un jeune patient atteint d'une maladie de Fanconi.⁷⁷ Celui-ci avait un donneur familial HLA-identique pour lequel un diagnostic anténatal démontrait qu'il n'était pas atteint de cette hémopathie. Après un conditionnement par de l'Endoxan à faible dose, et une irradiation corporelle totale, Matthew âgé de 6 ans, fut le premier enfant greffé à partir de cellules souches hématopoïétiques cryopréservées issues de sang placentaire. Depuis, l'utilisation de cellules souches hématopoïétiques de sang placentaire s'est considérablement développée grâce notamment à la mise en place d'un réseau européen regroupant les banques de sang de cordon ombilical. Ainsi plus de 20 000 autres greffes ont été réalisées dans le monde et les banques de sang placentaire se sont développées pour accueillir aujourd'hui près de 562 000 unités de sang placentaire (source : Bone marrow donors worldwide (BMDW) en février 2013).

- **2.2 Les problématiques spécifiques de l'allogreffe de sang placentaire**
 - **2.2.1 La nécessaire adéquation du choix du greffon de sang placentaire à son receveur**

Pour l'allogreffe de cellules souches obtenues à partir de sang de cordon ombilical, il existe un certain degré de tolérance pour un nombre limité d'incompatibilités HLA. La recherche d'identité HLA entre le sang de cordon et le futur receveur est limitée à 6/6 et concerne HLA-A, HLA-B et HLA-DR.

En plus des exigences moindres d'histocompatibilité, la sélection d'une unité de sang placentaire offre d'autres avantages :

- La durée nécessaire pour sélectionner un greffon de sang placentaire est relativement courte ⁷⁸ ;
- Le greffon, une fois identifié est rarement récusé ;
- Il y a plus de facilité lors d'une éventuelle modification de la date de greffe ;
- Il n'existe pas de risque (infectieux ou lié à l'anesthésie) pour le donneur

Ces avantages sont contrebalancés par des inconvénients que nous maîtrisons plus ou moins :

- Quantité limitée de cellules disponibles au sein du greffon ;
- Impossibilité de réaliser une infusion ultérieure de lymphocytes du donneur en cas de rechute (DLI).
- Possibilité théorique de transmettre une affection congénitale non dépistée ;
- Un risque plus élevé d'échec de la prise de greffe, une reconstitution immunitaire retardée responsable d'une mortalité infectieuse plus élevée.

Dans plusieurs études, la reconstitution de l'hématopoïèse avec la récupération d'un taux de polynucléaires neutrophiles et d'un taux plaquettaire satisfaisant est corrélée à la fois au degré de compatibilité HLA mais également au nombre total de cellules nucléées collectées et perfusées au receveur.^{79,80} Une combinaison d'une incompatibilité HLA de classe I ou de classe II avec une forte dose de cellules CD34⁺ présentes dans le greffon est associée uniquement avec un risque plus élevé de développer une GVH aiguë de grade III-IV. La rechute de l'hémopathie sous-jacente dans les greffes sans incompatibilité démontre à nouveau l'importance de l'effet du greffon contre la leucémie.⁸⁰⁻⁸³

La réalisation d'une greffe de sang placentaire présuppose néanmoins les prérequis suivants :

- La définition du typage HLA est réalisée au niveau générique pour le HLA-A et pour le HLA-B et au niveau allélique pour le HLA-DRB1. Il faut éviter une incompatibilité supérieure à 2. Il est préférable d'avoir une incompatibilité qui porte sur le CMH de classe I (HLA-A ou -B) plutôt que le DRB1.

- Lors de la sélection, il faut rechercher la présence d'anticorps anti-HLA dans l'unité de sang placentaire. La compatibilité HLA semble être plus importante pour les receveurs ne souffrant pas d'affection hématologique maligne.
- Si le critère du nombre de cellules nucléées disponibles dans le greffon n'est pas rempli, il est alors nécessaire d'envisager une greffe avec 2 cordons.
- Le nombre de cellules viables et de CFU-GM n'est généralement pas considéré pour ce type de greffon.
- La quantité de cellules nécessaires à la greffe augmente avec le nombre d'incompatibilité HLA.

Pour les hémopathies malignes, la quantité de cellules nucléées nécessaires, en cas de greffon présentant une compatibilité 5/6 ou 6/6 est de:

- entre 2,5 à 3,0 x 10⁷/kg de poids du receveur lors de la congélation
- entre 2,0 à 2,5 x 10⁷/kg de poids du receveur après la décongélation,
- La quantité de cellules CD34⁺ doit être approximativement comprise entre 1,2 et 1,7 x10⁵/kg, que ce soit au recueil ou à la décongélation.

Dans les affections non malignes, la quantité de cellules CD34⁺ la plus importante et la compatibilité HLA complète doivent être recherchées.

Les greffons qui présentent une compatibilité HLA de 4/6 : de même l'incompatibilité HLA-A et –B est préférable à l'incompatibilité –DRB1 ; pour les hémopathies malignes la quantité de cellules nucléées nécessaires est de :

- au moins supérieure à 3,5 x 10⁷/kg lors de la congélation
- au moins supérieure à 3, x 10⁷/kg après la décongélation
- La quantité de cellules CD34⁺ doit être supérieure à 1,7 x10⁵/kg

Pour les affections non malignes, la quantité de cellules nucléées totales avant la congélation doit être au moins comprise entre 4,0 et 5,0 x 10⁷/kg ; après décongélation, elle doit être supérieure à 3,5 x 10⁷/kg. La quantité de cellules CD34⁺ doit être supérieure à 2,0 10⁵/kg.

Les greffons ayant plus de 2 incompatibilités HLA doivent être écartés, sauf dans les cas extrêmes de patients présentant des affections hématologiques malignes réfractaires. Ce type de greffon n'est pas recommandé pour les patients présentant des affections hématologiques non-malignes.^{80,84,85}

Enfin, il existe d'autres considérations à prendre en compte : la qualité et la localisation de la banque de sang placentaire cédant le greffon (et son accréditation) et la problématique de la compatibilité ABO.

Entre 2001 et 2005, les premiers résultats concernant les greffes de sang placentaire réalisées avec un conditionnement atténué ont été publiés avec des éléments encourageants,⁸⁶⁻⁹⁰ levant ainsi les préventions et permettant l'adoption progressive du conditionnement atténué. L'équipe de Brunstein publiait en 2007 un travail portant sur l'étude de 110 patients ayant bénéficié d'une allogreffe de CSH avec un conditionnement atténué avec 2 greffons. Le conditionnement utilisé associait une irradiation corporelle totale de 2 Gy, la fludarabine et l'Endoxan. Il y eut 15 échecs de greffe (13.6%) et la durée médiane de prise de greffe était de 12 jours. Le chimérisme était mixte au point d'évaluation précoce, mais l'évaluation à 1 an ne retrouvait généralement plus qu'un seul donneur chez les survivants. Une GVH aiguë de grade II-IV était retrouvée chez 59% des patients, une GHV chronique chez 23% des patients. 19% des patients mourraient de mortalité non-liée à la rechute (MNLr) dans les 6 mois qui suivent la greffe, et l'EFS à 3 ans était de 38%. Les auteurs de ce travail constatèrent de meilleurs résultats après une double greffe de sang placentaire.⁸⁸ Les données de survie, de survie sans événement et de MNLr sont tout à fait superposables à ceux de nos cohortes de patients décrites plus bas.

▪ 2.2.2 Une reconstitution T retardée

Un défi particulier de l'allogreffe de sang placentaire est la prise en charge d'une reconstitution immunologique retardée par rapport aux autres sources de cellules souches hématopoïétiques. Cette reconstitution immunologique défectueuse est responsable d'une morbidité et d'une mortalité liée à la greffe accrues.⁹¹⁻⁹⁵ La reconstitution du taux de lymphocytes T après allogreffe de SP est graduelle et il n'est permis d'espérer un taux de lymphocyte T normal qu'après les 9 premiers mois. Chez le receveur adulte, la reconstitution du système immunitaire et du taux de lymphocyte T peut prendre jusqu'à une année. Cela

s'accompagne également d'un nombre plus faible de lymphocytes T TREC⁺ chez les receveurs plus âgés.⁴⁶

▪ 2.2.3 Une susceptibilité accrue aux infections opportunistes

La mortalité liée aux infections est l'une des toutes premières causes de décès après allogreffe de sang placentaire. Elle est responsable, à elle seule ou en lien avec une autre complication comme la survenue d'une GVH aiguë sévère, de près de 50 % des décès ; la majorité d'entre eux survenant dans les 100 premiers jours post-greffe.^{85,96,97} L'impact fondamental de ce taux élevé d'infection a été mis en valeur par un rapport du registre international de transplantation médullaire (IBMTR). Cette étude compare les événements post-greffes chez 150 greffes de sang placentaire ainsi que 367 greffes de MO sans aucune incompatibilité, et avec 83 greffes de MO avec 1 incompatibilité HLA. Parmi les événements post-greffe analysés, les infections liées à la greffe sont significativement augmentées chez les patients qui recevaient une greffe de SP par rapport aux 2 autres populations (respectivement 45%, 21%, et 24%; P=0,01). Après les 100 premiers jours, la mortalité infectieuse était identique dans les 3 groupes. Une autre étude espagnole multicentrique a également retrouvé une augmentation significative de l'incidence des infections sévères après greffe de sang placentaire comparativement à une greffe de CSP (respectivement 73% et 50%, P=0,02).⁹⁸ Enfin, l'équipe de Barker a également démontré qu'il existe une incidence cumulative d'infections sévères plus élevée chez les enfants recevant une greffe de sang placentaire immédiatement après la greffe par rapport à celle observée chez les receveurs de MO (respectivement 58% et 35%, P=0,04).⁹⁹

▪ 2.2.4 Le risque de réaction du greffon contre l'hôte aiguë et chronique après greffe de sang placentaire

La tolérance plus importante pour un nombre plus limité d'incompatibilité dans la greffe de SP n'est pas associée à une augmentation du risque de décès lié à une réaction du greffon contre l'hôte. Le risque de GVH aiguë semble réduit par l'utilisation du SAL en complément d'un conditionnement myéloablatif. La différence semble plus négligeable dans les conditionnements d'intensité réduite. Dans le travail publié par l'équipe de Brunstein, la survenue de GVH aiguë de grade II à IV est significativement augmentée après une allogreffe de CSP ou de MO à partir d'un donneur adulte non-apparenté (85%) par rapport à celle

survenant après une allogreffe de sang placentaire (53%) dans les 100 premiers jours post-greffe.¹⁰⁰ Cependant, il n'existait pas de différence en terme de GVH de grade III-IV ; de même, dans ce travail, il n'apparaissait pas de différence significative en terme de développement de GHV chronique. D'autres études, avec des effectifs plus réduits, ne mettent pas en évidence de différence significative en terme de développement de GVH aiguë.^{101,102}

Dans un essai de phase II comparant des greffes de sang placentaire à des greffes avec un donneur haplo-identique utilisant le cyclophosphamide après la transplantation, la survenue de GVH aiguë de grade II-IV est observé dans 40% des greffes de sang placentaire contre 32% des greffes haplo-identiques. Le taux de GVH aiguë de grade III-IV était respectivement de 21% et de 0% dans ces 2 groupes. Enfin la survenue de GVH chronique est observée dans 25% des greffes de sang placentaire contre 13% des greffes haplo-identiques un an après la greffe.¹⁰³ Ces éléments permettent de confirmer le potentiel d'allogénécité des cellules immunocompétentes présentes dans le greffon issu de sang placentaire.

- **2.3 Les propriétés particulières des cellules du sang placentaire**
 - **2.3.1 Les cellules souches hématopoïétiques du sang de cordon**

Les cellules souches hématopoïétiques sont définies comme étant des cellules indifférenciées capables à la fois de se multiplier à l'infini, capables d'auto-renouvellement et de générer des cellules filles capables de se différencier en cellules hautement spécialisées. Leur fonction est d'assurer l'homéostasie du système hématopoïétique en assurant le renouvellement des éléments figurés du sang. Ce sont ces cellules qui sont retrouvées dans le sang placentaire : en effet le sang placentaire contient des cellules CFU-GM en nombre comparable au nombre de cellules CFU-GM suffisantes pour assurer le succès d'une greffe médullaire avec de la moelle osseuse.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ Bien que les cellules CFU-GM ne soient pas elles-mêmes des cellules souches hématopoïétiques mais plutôt des cellules progénitrices, la prise de greffe est directement liée à la quantité de cellules CFU-GM administrée dans un modèle murin de transplantation médullaire.¹⁰⁸ De même, chez l'homme, la quantité de cellules CFU-GM contenue dans un greffon de moelle osseuse est également corrélée à la vitesse de sortie d'aplasie lors d'une autogreffe de cellules souches

hématopoïétiques.¹⁰⁹ Le sang placentaire contient également des cellules BFU-GM et CFU-GEMM dans une proportion comparable à celle retrouvée dans les greffons de moelle osseuse.¹⁰⁴ Les cellules souches hématopoïétiques ont été identifiées dans le sang de cordon ombilical préalablement à leur identification dans la moelle osseuse.^{109,110} La concentration en cellules souches hématopoïétiques est essentiellement identique dans le sang placentaire et dans la moelle osseuse, mais leur quantité est plus faible dans le sang placentaire.¹⁰⁹⁻¹¹³ L'équipe de Broxmeyer démontrait en plus que ces cellules progénitrices hématopoïétiques, à savoir les cellules CFU-GM, BFU-GM et CFU-GEMM ont pu être congelées, cryopréservées et ensuite décongelées. Cette étape était réalisée sans dommage pour leur différenciation fonctionnelle.¹⁸ La vitesse de la reconstitution hématologique post-greffe est bien corrélée avec le nombre de cellules nucléées disponibles dans l'unité de sang de cordon (en TNC/kg de poids du receveur).⁸⁴

Après le recueil, au décours immédiat de l'accouchement, les greffons de CSH d'origine placentaire sont immédiatement pris en charge par les laboratoires de l'Etablissement Français du Sang (EFS). Après miniaturisation, numération, les greffons sont cryopréservés. Ils sont alors immédiatement disponibles pour une éventuelle greffe lorsque le typage HLA a été réalisé. Il n'y a donc aucun risque que le donneur ne puisse plus donner entre le moment où il a exprimé son consentement et le prélèvement. Selon Barker, la durée moyenne pour identifier un donneur de sang placentaire est aujourd'hui de 13,5 jours ce qui est singulièrement plus court que les 49 jours médians pour trouver un donneur sur pied compatible.⁷⁸ Avec l'augmentation progressive du nombre de maternités et de l'augmentation du nombre de cordons banqués, la disponibilité des unités de sang placentaire ne fait que s'améliorer : il s'agit d'un atout majeur de cette technique. Cette disponibilité présente évidemment un intérêt tout particulier pour les patients présentant une leucémie aiguë avec un haut risque de rechute. On peut nuancer en remarquant que cet avantage n'est pas encore bien considéré dans la mesure où souvent, la recherche d'un greffon de sang placentaire est réalisée après un échec de la recherche d'un donneur de MO ou de CSP.¹¹⁴

Des travaux complémentaires menés par l'équipe de Broxmeyer ont pu démontrer que la capacité de prolifération des cellules souches hématopoïétiques n'est pas altérée dans le temps et qu'il est possible de récupérer des cellules sanguines et des progéniteurs

hématopoïétiques après 5, 10 et 15 ans.^{74,115,116} Alors que de nombreux centres répugnent à utiliser des greffons congelés pendant une période très prolongée, il n'existe aucune preuve que ceux-ci soient plus efficaces lorsqu'il est congelé pendant une durée plus courte.

▪ 2.3.2 Propriétés des cellules T de sang de cordon

En dépit de l'utilisation de greffons placentaires présentant des disparités HLA de classe I et/ou II, l'incidence et la sévérité des GVH aiguës observées en pédiatrie et chez l'adulte sont plus faibles quand on les compare à celle des allogreffes avec donneur conventionnel non apparenté HLA-compatible alors que les cellules T infusées sont quasi exclusivement de phénotype naïf. Le nombre réduit de lymphocytes transfusés est un des éléments principaux avancés pour expliquer cette incidence diminuée de la GVH : les greffons obtenus à partir de moelle osseuse ou de cellules souches périphériques comportent environ 10 fois plus de cellules nucléées, cependant, le seuil du nombre de lymphocytes T nécessaires et suffisants pour réaliser une réaction de GVH est de 1.10^4 lymphocytes /kg en cas de disparité HLA.¹¹⁷ Ainsi, l'incidence diminuée de GVH serait liée aux propriétés particulières des cellules du sang de cordon : une immaturité des cellules dendritiques,¹¹⁸ une récupération précoce des cellules NK capables d'activer la voie lytique Granzyme/Perforine et CD95/CD95L¹¹⁹, une proportion plus élevée de lymphocytes T régulateurs,¹²⁰ et surtout une capacité de réponse limitée des cellules T aux alloantigènes.

La composition en cellules T dans la moelle osseuse et le sang périphériques du sujet adulte et dans le sang de cordon diffère en premier lieu au plan quantitatif. Le ratio CD4/CD8 est plus élevé dans le sang de cordon,¹²¹ le contingent de cellules T gd est très faible¹²² tandis que celui des lymphocytes T régulateurs est plus élevé.^{123,124} Les émigrants thymiques récents occupent une large proportion des cellules T du sang de cordon : 65-80% sont CD31+ et contiennent des TRECs.¹²⁵⁻¹²⁷ In vitro, l'IL-7 exerce des fonctions particulières sur ces cellules : elle déclenche de manière dose-dépendante la prolifération des RTE CD4+ de nouveau-nés alors qu'elle est sans effet sur les cellules CD4+CD45RA+ d'adulte. L'activation précoce des caspases 3 et 8 est nécessaire à cette réponse IL-7 dépendante des RTE.

Dès les années 90, les différences fonctionnelles des cellules T de sang de cordon sont soulignées et plusieurs explications sont avancées pour expliquer leur réactivité diminuée : un faible niveau d'activation, la quasi-absence de lymphocytes T mémoires, des propriétés intrinsèques différentes de celles des lymphocytes T d'adultes.

De manière paradoxale, plusieurs approches basées sur des réactions lymphocytaires mixtes comparant la réactivité des lymphocytes T (ou T CD4⁺) d'adulte et de sang de cordon (CBL) font état d'une capacité proliférative équivalente sinon supérieure des cellules T de cordon à l'étape initiale d'une réponse primaire aux alloantigènes majeurs. Celle-ci s'accompagne d'une production significative d'IL-2 et d'IFN-g à J3. En revanche, la réponse secondaire des CBL est mauvaise, peu ou pas améliorée par l'addition de doses modérées d'IL-2. L'implication partielle de cellules T CD8⁺,¹²⁸ un état d'anergie par défaut d'activation de la voie Ras après engagement du récepteur T mais surtout l'apoptose massive des cellules T activées^{129,130} sont successivement évoqués pour expliquer ce phénomène de non-réponse secondaire.

Cette susceptibilité accrue à l'apoptose, qui succède à la réponse proliférative allogénique primaire est retrouvée lors d'une stimulation par Ac anti-CD3 des CBL CD4⁺CD45RA⁺ par rapport aux cellules T CD4⁺CD45RA⁺ d'adulte.¹³¹ Une expression majorée du CD95L est détectée à la surface des CBL activés sans que l'engagement de cette voie ne soit particulièrement impliquée dans le processus d'apoptose. Une étude ultérieure, étudiant les voies impliquées dans le processus d'apoptose de CBL totaux pré-activés par anti-CD3 et anti-CD28 nuance ces résultats : les niveaux d'expression de CD95 et du TNFR2 mais pas celui du CD95L apparaissent élevés à J4 post-activation et l'apoptose est majorée en présence d'un Ac anti-CD95 mais pas de TNFα. L'addition de la cytokine homéostatique IL-15 limite le processus d'apoptose.¹³²

Dans ce contexte de capacités prolifératives variables des CBL T, d'autres équipes ont concentré leurs travaux sur le défaut de production de cytokines par les CBL activés¹³³ et tout particulièrement celle d'IFN-g. Ce déficit apparaît en partie lié à un défaut d'expression basale du facteur de transcription NFAT₁ (NFAT_{C2}) dans les CBL et sa régulation positive très partielle en réponse à l'activation.¹³⁴ L'expression diminuée de NFAT1 dans les cellules T CD4⁺ de cordon est liée au microRNA184.¹³⁵ De nombreuses cytokines possèdent un site de liaison du NFAT au niveau de leur promoteur. Cette diminution d'expression de NFAT n'entraîne pas de sensibilité plus élevée des CBL à la ciclosporine A. Dans une évaluation globale par Affymetrix[®] de l'expression des gènes en réponse à l'activation, Kaminski et al. confirment l'expression diminuée des gènes de cytokines contrôlés par NFAT dans les CBL CD4⁺ comparés à ceux de l'adulte.¹³⁶ Seule l'IL-2 présente une expression génique accrue et

un taux augmenté dans les surnageants de culture, suggérant l'existence d'une voie de régulation NFAT indépendante pour l'IL-2 dans les CBL. Autre élément de cette étude, la mise en évidence d'une expression supérieure des gènes de cyclines A₂ et E₂. Par ailleurs, les travaux de l'équipe de MJ Laughlin ont montré une expression augmentée du facteur de transcription BACH2 dans les CBL CD4⁺ permettant ainsi de suppléer à la carence en NFAT pour la transcription de l'IL-2 dans ces cellules.¹³⁷

A côté de la réponse proliférative bien authentifiée dans ces travaux, d'autres études mettent en exergue la non-fonctionnalité de certaines voies de co-stimulation pour expliquer le défaut de différenciation fonctionnelle des CBL. Ils concluent à une induction diminuée du CD40 Ligand (CD154) lors de l'activation des CBL,¹³⁸ mais ce résultat n'est pas consensuel.¹³⁹ Pour une différenciation Th1, les cellules de sang de cordon, contrairement aux lymphocytes T naïfs d'adulte CD31^{neg}, n'expriment pas en base de l'IL-12Rb1¹⁴⁰ et au niveau même du gène codant pour l'IFN- γ , les profils de méthylation des sites CpG et non-CpG du promoteur sont différents au niveau des CBL et des cellules d'adultes CD45RO^{neg}.¹⁴¹ Dans une étude comparant la réactivité des CBL CD4⁺ versus des lymphocytes T CD4⁺ d'adulte lors de leur activation par des cellules dendritiques d'adulte dérivées de monocytes, Li Chen et al. concluent aux capacités réduites d'activation des CBL et à leur défaut de différenciation Th1 par défaut d'expression du CD154 et de la voie IL-12. Ce travail ne mentionne pas le degré de réponse proliférative ni la présence d'apoptose et rapporte des taux d'IL-2 produits par les CBL très inférieurs à ceux sécrétés par les lymphocytes d'adulte.¹⁴²

Table 2. Propriétés des lymphocytes NK et des lymphocytes T de sang placentaires comparativement aux lymphocytes d'adultes.		
	Lymphocytes NK	Lymphocytes T
Nombre et Fréquence	Fréquence plus élevée(25% vs. 8%)	Fréquence identique, surexpression du CD3
Phénotype	Expression plus faible d'ICAM-1 et du CD161 Moins de lymphocytes L-selectin ⁺ Expression plus faible du CD8 et du CD57	Phénotype naïf CD45RA ⁺ CD62L ⁺ CD27 ⁺ CCR7 ⁺
Prolifération et/apoptose	Prolifération plus faible à similaire à celle constatée <i>ex vivo</i>	Entre rapidement en apoptose Expression plus importante des télomerase
Différenciation fonctionnelle, production de cytokines	Production d'IFN- γ plus faible ou similaire	Biais T _H 2/Tc2 Production plus faible d'IL-2, IL-4, IL-10, et de l'IFN- γ Production plus importante d'IL-13
Potentiel cytotoxique	Expression plus forte du Granzyme et de la Perforine Niveau plus faible de cytotoxicité <i>ex vivo</i>	Défaut d'expression du Granzyme et de la Perforine Niveau d'expression plus faible du NFATc2

Tableau 2: Propriété comparatives des lymphocytes T et NK de sang placentaire comparativement à leurs équivalents chez l'adulte. D'après Mérindol.¹⁴³

Ces différences fonctionnelles, résumées dans le Tableau 1 d'après Merindol, 2011,¹⁴³ pourraient résulter de la coexistence au sein des cellules T de sang de cordon de cellules provenant initialement des CSH fœtales localisées dans le foie puis les CSH de la MO.¹⁴⁴ Le contingent T issus des CSH fœtales présenterait des propriétés fonctionnelles de type tolérogène.

TRAVAUX PERSONNELS :

Le défaut de reconstitution immunologique post-greffe est un problème majeur et assez spécifique de l'allogreffe de sang placentaire. Ce défaut de reconstitution pourrait être majoré par une entrave à l'expansion homéostatique engendrée par les traitements pré-greffes. Ceux-ci ont pour objectifs de maîtriser la prise de greffe mais aussi la réaction alloréactive importante des lymphocytes T provoquée par l'incompatibilité HLA qui peut s'élever jusqu'à cinq mismatches dans certaines greffes. D'autre part, à degré d'allogénicité équivalente et prise en charge pré-greffe identique, le retard à la reconstitution immunologique peut être de degré très différent. C'est pour mieux comprendre et répondre à cette problématique générale que nous avons, au cours de ce travail de thèse, mené deux approches complémentaires : une première approche basée sur l'étude clinique et une deuxième approche plus fondamentale.

Nous présenterons l'ensemble de nos travaux selon l'ordre suivant :

PARTIE I : études cliniques

Nous avons étudié les conséquences cliniques de la lymphodéplétion profonde induite par l'utilisation du sérum anti-lymphocytaire dans les conditionnements myéloablatifs et à intensité réduite : majoration de la mortalité non liée à la rechute, du risque infectieux et du risque de lymphoprolifération liée à l'EBV.

- **1.1 Impact clinique de l'utilisation du sérum anti-lymphocytaire de lapin dans les conditionnements myéloablatifs lors d'une allogreffe de sang placentaire réalisée dans le cadre du traitement d'affections hématologiques malignes**
 - L'ensemble des travaux exposé en 1.1 a été soumis et accepté pour publication dans la revue *Bone Marrow Transplant*.²⁷ (Annexe 1).
- **1.2 Impact clinique de l'utilisation du sérum anti-lymphocytaire de lapin dans les conditionnements d'intensité atténué lors d'une allogreffe de sang placentaire réalisée dans le cadre du traitement d'affections hématologiques malignes**
 - L'ensemble des travaux exposé en 1.2 a été soumis et accepté pour publication dans la revue *Blood* (Annexe 2).
- **1.3 Travaux complémentaires**

- **1.3.1 Détermination du nombre de cellules viables disponibles au sein des greffons de sang placentaire**
- **1.3.2 Effet de l'utilisation du SAL en fonction du nombre de cellules mononucléées totales disponibles dans le greffon de sang placentaire.**
- **1.4 Conclusion**

PARTIE II : approche fondamentale

Après mise en évidence d'une capacité de survie initiale variable des lymphocytes T de sang placentaire, nous avons étudié comment l'exposition de ces cellules à de faibles doses d'Interleukine-7 peut améliorer leur survie sans majorer leur potentiel alloréactif.

- **2.1 L'exposition quotidienne des lymphocytes T de sang de cordon à de faibles concentrations d'IL-7 améliore leur survie sans potentialiser leur réponse proliférative à une stimulation alloréactive.**
 - L'ensemble des travaux présentés en 2.1 a été soumis et accepté pour publication dans la revue *BBMT* (Annexe 3).
- **2.2 Travaux complémentaires**
 - 2.2.1 Influence des données gazométriques à la naissance sur les capacités de survie des lymphocytes T de sang de cordon
 - 2.2.2 Glucocorticoïdes et sang placentaire
- **2.3 Conclusion**

PARTIE I

- Impact de l'utilisation du sérum anti-lymphocytaire dans les conditionnements myéloablatifs lors d'une allogreffe de sang placentaire

INTRODUCTION

Le sérum anti-lymphocytaire a été utilisé pour obtenir une déplétion lymphocytaire profonde dans le sang et les tissus périphériques du receveur afin de réduire le risque de rejet de greffe et de développement de la maladie du greffon contre l'hôte. Ce panel d'anticorps polyclonaux est dirigé contre un éventail large d'épitopes des cellules immunocompétentes.^{145,146}

L'utilisation du SAL dans les conditionnements de greffe de CSH reste controversée pour les patients recevant une allogreffe simple de sang de cordon après un conditionnement myéloablatif.²⁶ L'objectif de notre étude multicentrique est d'évaluer l'impact du SAL dans le conditionnement chez 91 patients qui ont bénéficié d'une telle transplantation dans trois centres français (Lille, Nantes et Bordeaux).

MATERIEL ET METHODES

Il s'agit d'une étude rétrospective, respectant les critères d'Helsinki. Elle inclut 91 patients greffés avec des greffons de sang placentaire (un cordon unique) entre janvier 2000 et décembre 2010 à Lille (n=38), Nantes (n=31) et Bordeaux (n=22). Nous avons respecté les critères d'inclusion et d'exclusion suivant :

- 1^{ère} greffe de CSH
- Les informations relatives aux patients ont été vérifiées dans le registre français des greffes de moelle osseuse.
- Eurocord a fourni les informations complémentaires relatives aux typages HLA des cordons.
- Les greffons présentaient au minimum 4 compatibilités HLA sur 6
- Les patients ont reçu un conditionnement myéloablatif

Sur les 91 patients, 46 ont reçu du SAL dans le conditionnement, 45 n'en ont pas reçu. La dose médiane de SAL de lapin administrée était de 5mg/kg de poids du receveur (avec un écart de 3,8 à 7,5 mg/kg) ; un patient n'a pas reçu la dose escomptée en raison d'une

intolérance au produit. Les patients ont reçu en moyenne du SAL pendant 2 jours consécutifs (avec des écarts de 1 à 5 jours). Le délai entre la dernière injection de SAL et la réalisation de la greffe était de 5 jours en moyenne (de 1 à 10 jours). Les patients de l'étude ont tous reçu de la Thymoglobuline (Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA) ; il s'agit du seul SAL autorisé et commercialisé en France.

Les caractéristiques des patients sont résumées dans le tableau 1. Les 2 groupes de patients étaient comparables en termes de répartition. Il existait une légère hétérogénéité en termes de diagnostic des hémopathies sous-jacentes et du statut de l'hémopathie à la greffe (selon les critères de l'IBMTR). Il existait également des différences dans l'administration du SAL, reflétant des pratiques différentes entre les 3 centres. L'utilisation du SAL n'était pas uniforme selon les centres : Lille et Nantes utilisèrent le SAL dans respectivement 63% et 61% des cas, tandis que Bordeaux dans 5 % des cas ($p=0,0003$).

Le traitement immunosuppresseur utilisé était principalement basé sur l'utilisation de la cyclosporine A et du méthotrexate. L'âge médian à la greffe était de 12 ans (de 0,7 an à 56 ans). Il y avait 54 hommes (59%) et 37 femmes (41%).

ANALYSE STATISTIQUES

L'analyse statistique relative à cette étude a été conduite en janvier 2013. La survie globale est définie comme l'intervalle de temps passé entre la date de greffe et la date de décès du patient. La rechute est définie comme étant la résurgence de l'affection hématologique sous-jacente avec ou sans évidence de reconstitution hématologique autologue (basée sur l'évaluation du chimérisme). La survie sans événement est définie comme étant la survie des patients qui ne présentent pas de signes de rechute. La mortalité non-liée à la rechute est définie comme étant le décès des patients sans participation évidente de l'hémopathie sous-jacente. Les variables des patients, de leurs maladies, et des événements post-greffes des deux groupes ont été comparées grâce au test exact de Fisher et de chi-deux pour les variables catégorielles, et au moyen du test de Mann et Whitney pour les variables continues. Les fonctions d'incidences cumulatives comme l'incidence de la rechute et la mortalité non-liée à la rechute ont été analysées avec la prise en compte de deux types de risques compétitifs : la rechute de l'hémopathie et le décès du patient en rémission.¹⁴⁷ Pour

analyser la survenue de GVH aiguë et chronique, nous avons considéré que le décès en rémission comme un événement compétitif. Les probabilités de survie globale (SG) et de survie sans événement (SSE) ont été calculées selon la méthode de Kaplan et Meier. Les analyses univariées ont été réalisées grâce au test du Log-Rank pour la SG et la SSE, et le test de Fine et Gray pour les fonctions d'incidences cumulatives. Les analyses multivariées ont été réalisées grâce au modèle de Cox.¹⁴⁸ Les différences entre les deux groupes en terme de distribution, et toutes les variables associées de manière significative avec un événement en post greffe ont été incluses dans le modèle statistique. Toutes les analyses sont menées avec un risque d'erreur de type 1 de 0,05. Les analyses statistiques ont été menées grâce aux logiciels SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) et R 2,13,2 (R Development Core Team, Vienne, Autriche).

RESULTATS

Prise de greffe et toxicité liée au conditionnement

Dans cette étude, 11 patients n'ont pas présenté de signes de prise de greffe. Parmi ces 11 patients, 9 sont décédés rapidement après la transplantation et 2 autres ont présenté une reconstitution autologue. L'intervalle médian pour obtenir un taux de neutrophiles supérieur à 500/mm³ était de 28 jours (avec un écart de 13 à 84 jours). Trois patients ont présenté un rejet du greffon après la prise de greffe (aux 58^{ème}, 60^{ème} et 84^{ème} jours). L'incidence cumulative de survenue de GVH aiguë de grade II-IV était de 35% au 100^{ème} jour ; l'incidence cumulative de survenue de GVH aiguë de grade III-IV était de 19%.

Sur les 62 patients qui ont survécu plus de 100 jours, 19 (31%) ont développé une GVH chronique. Six présentèrent une GVH chronique extensive (10%). Le tableau 2 résume les complications rencontrées après la transplantation dans les 2 groupes de patients.

L'incidence cumulative de GVH aiguë de grade II-IV était de 38 ± 8% dans le groupe sans SAL et de 32 ± 7% dans le groupe avec SAL (p=0,43). L'incidence cumulative de GVH aiguë de grade III-IV était de 22 ± 7% dans le groupe sans SAL et de 16 ± 6% dans le groupe avec SAL. Les patients dans le groupe sans SAL présentèrent des signes de GVH chronique plus fréquemment que dans le groupe avec SAL (respectivement 13 et 6%, p=0,04).

Survie

Avec un suivi médian de 33 mois (intervalle de 12 à 96 mois), la survie globale estimée à 3 ans est de $47 \pm 6\%$, la SSE est de $30 \pm 5\%$, l'incidence cumulative de rechute est de $48 \pm 5\%$ et la mortalité non-liée à la rechute (MLNR) est de $23 \pm 4\%$ (figure 1). L'analyse statistique univariée (tableau 3) fait apparaître une altération de la SG, de la SSE et de la MLNR chez les sujets de plus de 18 ans (respectivement avec un $p=0,004$; $p=0,03$ et $p=0,01$) ; de même, une séropositivité pour le cytomégalovirus (CMV) est associée avec une SG diminuée et une MLNR augmentée (avec respectivement un $p=0,002$ et $p=0,007$).

L'utilisation d'un plus faible contingent de cellules nucléées dans le greffon (inférieur ou égal à $4,6 \times 10^7$ cellules nucléées/kg) est associée avec à une augmentation importante de la MLNR ($p=0,006$). Enfin, une hémopathie mal contrôlée à la date de greffe (selon les critères de l'IBMTR) est associée avec à un risque augmenté de rechute ($p=0,03$). Il existe une tendance pour une SSE raccourcie dans le groupe SAL ($p=0,07$).

Chez les 29 patients adultes de l'étude, 12/19 du groupe sans SAL sont décédés, tandis que 9 des 10 adultes du groupe SAL sont décédés ($p=0,07$). Cette différence n'est pas significative, probablement en raison du faible effectif d'adultes dans cette étude. Quatre des 19 patients adultes du groupe sans SAL décédèrent d'une MLNR comparativement au 7 des 10 patients adultes du groupe SAL ($p=0,008$).

En analyse multivariée, la séropositivité pour le CMV est associée à une altération de la survie globale [HR= 1,89, 95%CI (1,01-3,54); $p=0,05$]. L'utilisation du SAL est la seule variable qui influence négativement à la fois la survie globale [HR= 1,99, 95%CI (1,11-3,59); $p=0,02$], la survie sans événement [HR= 1,83, 95%CI (1,08-3,1); $p=0,02$] et la mortalité non-liée à la rechute [HR= 2,54, 95%CI (1,03-6,26); $p=0,04$] (Tableau 4).

Causes de décès :

Le tableau 2 présente les principales causes de décès des patients. Douze d'entre eux (13%) sont décédés de complications infectieuses parmi lesquelles nous retrouvons 5 décès dus à une infection bactérienne, 2 à une infection virale, 3 à une infection fongique, et 2 d'infections d'origines diverses. Parmi ces 12 patients, 2 présentèrent également des signes de maladie véno-occlusive.

Dans le groupe SAL, les infections furent la principale cause de décès. 8/46 patients présentèrent une infection fatale comparativement au 4/45 du groupe sans SAL. Cette différence n'est néanmoins pas significative. A 1 an de la greffe, la mortalité non-liée à la rechute était de 30% dans le groupe SAL et de 15% dans le groupe sans SAL (p=0,48) (tableau 2).

DISCUSSION

L'élément le plus important de notre étude est que l'addition de SAL de lapin au conditionnement myéloablatif de greffe de sang placentaire semble influencer négativement les événements post-greffes. Nous avons observé une diminution de la survie globale et de la MNLR lors de l'ajout du SAL. A notre connaissance, il s'agit de l'étude rétrospective réalisée avec l'effectif de patients le plus large qui questionne sur le bénéfice du SAL lors d'une greffe de sang placentaire avec un conditionnement myéloablatif. Plusieurs autres travaux ont été publiés sur la tolérance du SAL dans le conditionnement.^{149,150} Cependant, aucun d'entre eux ne posait directement la question de l'impact du SAL sur les événements post-greffe. L'association du conditionnement myéloablatif et du risque d'échec de greffe lié au sang placentaire après une greffe simple cordon¹⁵¹ sont deux facteurs qui incitent à étudier l'impact du SAL sur cette catégorie de patients. Comme dans d'autres études,¹⁵²⁻¹⁵⁶ nous avons observé que les conditionnements myéloablatifs sans SAL s'accompagnent d'une incidence élevée de GVH aiguë. Cependant, ce bénéfice en terme de moindre développement de GVH aiguë sans addition de SAL ne s'est pas traduit en terme de bénéfice sur la survie globale.

Dans cette étude, les patients du groupe ayant reçu du SAL ont présenté un taux d'infections fatales et un taux de rechutes plus élevés que les patients du groupe sans SAL ; ces différences ne sont néanmoins pas significatives. Nous constatons également comme d'autres auteurs avant nous, que la reconstitution immunitaire post-allogreffe de sang placentaire est retardée et que ce retard permet d'expliquer une incidence élevée des complications infectieuses après conditionnement myéloablatif.^{79,84,85,157,158}

Pour mieux analyser l'influence du SAL sur notre cohorte de patients, nous avons souhaité analyser le rôle de la dose de SAL, de la durée de la perfusion et du délai qui courrait entre la dernière perfusion et la réalisation de la greffe. Malheureusement, les patients ayant reçu le SAL à une dose homogène de 5 mg/kg sur 2 jours de perfusion, la comparaison avec d'autres protocoles de SAL n'a pu être réalisée. Dans les différents protocoles actuellement utilisés en transplantation, la dose de SAL est relativement faible (5-7 mg/kg) dans les conditionnements pré-greffe.^{159,160}

Une alternative à l'utilisation du SAL dans le conditionnement pré-greffe pourrait être la généralisation d'un conditionnement comportant de la fludarabine. Cette molécule est effectivement connue pour son puissant effet immunosuppresseur, autorisant des prises de greffes⁸⁷. Cependant, son usage dans les greffes avec des incompatibilités HLA doit être confirmé. C'est en effet pour ces situations avec incompatibilités que le SAL a été recommandé.^{146,156,159} Nous sommes conscients des limites évidentes de cette étude rétrospective basée sur un nombre relativement faible de patients. Cette étude concerne par ailleurs 3 centres avec des pratiques qui diffèrent. Néanmoins, nos résultats suggèrent que l'utilisation du SAL dans les greffes à conditionnement myéloablatif doit être encadrée et doit éventuellement être évaluée dans le cadre d'un essai clinique. Nous ne pouvons pas tirer de conclusion quant aux conditionnements atténués, les greffes doubles cordons, ou les cordons ayant bénéficié d'une expansion *in vitro* préalable à la greffe. De même, nous ne pouvons pas tirer de conclusion sur l'utilisation préemptive du SAL en post greffe dans le traitement de la GVH aiguë.¹⁶¹ Ces résultats sont néanmoins conformes aux résultats après conditionnement atténué que nous avons présentés à l'ASH en décembre 2013 à la Nouvelle-Orléans¹⁶² (travaux exposés dans la partie 1.2 de cette thèse) ainsi qu'à ceux de l'étude de Lindemans.¹⁶³ Nous avons néanmoins besoin d'un protocole qui puisse évaluer l'impact de la dose et des modalités d'administration et de délais d'administration du SAL dans les greffes de sang placentaire.

Tableau 1 – Caractéristiques des patients

Caractéristiques	Total (N=91)	Groupe SAL (n=46)	Groupe sans SAL (n=45)	p
	Nbre de patients (%)	Nbre de patients (%)	Nbre de patients (%)	
Age				0,08
< 12	45 (50)	23 (50)	22 (49)	
> 12	46 (50)	23 (50)	23 (51)	
Sexe du receveur				0,9
Homme	54 (59)	27 (59)	27 (60)	
Femme	37 (41)	19 (41)	18 (40)	
Sexe du donneur				0,6
Homme	47 (52)	25 (54)	22 (49)	
Femme	44 (48)	21 (46)	23 (51)	
Sex mismatch				0,12
Donneur (femme) et receveur (homme)	25 (27)	10 (22)	15 (33)	
Donneur (homme) et receveur (femme)	18 (20)	8 (17)	10 (22)	
autre	48 (53)	28 (61)	20 (44)	
Statut CMV				0,87
Positif	25 (27)	13 (28)	12 (27)	
Négatif	66 (73)	33 (72)	33 (73)	
Maladie sous-jacente				0,58
Leucémies aiguës	66 (73)	34 (74)	32 (71)	
MDS & MPS	17 (19)	7 (15)	10 (22)	
Syndrome lymphoprolifératifs	8 (9)	5 (11)	3 (7)	
Disease status (IBMTR status)				0,08
Bon	36 (40)	17 (37)	19 (42)	
Intermédiaire	37 (41)	23 (50)	14 (31)	
Pauvre	17 (19)	5 (11)	12 (27)	
HLA mismatch				0,13
0	18 (21)	6 (14)	12 (29)	
1	30 (35)	19 (43)	11 (26)	
2	38 (44)	19 (43)	19 (45)	
Cellules nucléées totales (x 10 ⁷ /kg)				0,36
>0,46	44 (50)	24 (56)	20 (44)	
<0,46	44 (50)	19 (44)	25 (56)	
Conditioning regimen				0,11
TBI-based	51 (56)	22 (48)	29 (64)	
Busulfan-based	30 (34)	18 (39)	12 (29)	0,33
Traitement IS				-
CsA alone	18 (20)	9 (20)	9 (20)	
CsA+Pred	43 (47)	26 (57)	17 (38)	
CsA+MMF	16 (18)	2 (4)	14 (31)	
CsA+Pred+FK	2 (2)	0	2 (4)	
Other prophylaxis	11 (12)	9 (20)	2 (4)	

CsA: ciclosporine-A; Pred: prednisone; MMF: mycophenolate mofetil; FK: FK-506 ou tacrolimus; IBMTR: International Bone Marrow Transplant Registry.

Tableau 2 : Évènements post-greffe				
	Tous les patients (N=91)	Groupe SAL (n=46)	Groupe sans SAL (n=45)	p*
Prise de greffe (%)	80 (87%)	39 (84%)	40 (89%)	NS
Jours PNN>500/ μ l, médiane	28	29	28	NS
Jours plaquettes > 20×10^9 /L	33	36	33	NS
Causes de décès				
Infections	12	8**	4	NS
aGVHD	1	0	1	
Défaillance multiviscérale	7	5	2	
autre	4	1	3	

- Comparaison entre les groupes avec et sans SAL ; ** deux de ces patients ont développé une GVH aiguë sévère et 2 autres ont présenté également une maladie véno-occlusive.

Tableau 3 – Analyse univariée												
Caractéristiques	Survie Globale		SSE		MNL		Rechute		aGVHD de grades II-IV		aGVHD de grades III-IV	
	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p
Total	47±6		30±5		23 ±4		48±5		35±5		19±3	
SAL					30							
Oui	38±8	0,21	19±6	0,07	±7	0,48	51±8	0,44	32±7	0,43	16±6	0,43
Non	57±8		41±8		±6		45±8		38±8		22±7	
Statut de l'hémopathie					22							
Mauvais	44±9	0,97	23±8	0,43	±8	0,28	55±9	0,03	33±8	0,76	14±6	0,55
Intermédiaire	43±9		41±9		±8		30±8		34±9		23±7	
Bon	65±12		22±10		±8		66±13		43±14		21±11	
Age					16							
<18	55±7	0,004	33±6	0,03	±5	0,01	51±7	0,8	36±6	0,73	22±5	0,27
>18	30±9		21±8		±1		41±10		34±10		12±7	
Cellules nucléées totales					36							
<4,6 10 ⁷	41±8	0,15	28±7	0,52	±8	0,006	36±8	0,06	36±8	0,92	15±6	0,27
>4,6 10 ⁷	49±9		30±8		±5		59±8		37±8		24±7	
HLA-Ag mismatch					20							0,28
0-1	58±7	0,06	37±7	0,1	±6	0,73	43±8	0,17	30±7	0,14	16±5	
>1	28±9		11±7		±9		59±9		47±9		26±7	
CMV recipient serostatus					17							
Négatif	51±7	0,002	30±6	0,08	±5	0,007	53±7	0,34	35±6	0,82	19±5	0,99
Positive	37±10		28±9		±1		35±11		34±11		19±9	
Irradiation corporelle totale					22							
Non	50±8	0,91	33±7	0,64	±7	0,96	45±8	0,91	27±7	0,16	11±5	0,08
Oui	42±8		24±7		±7		52±8		41±7		25±6	

Tableau 4 – Analyse multivariée : effets du SAL, de l'âge et du statut CMV

Caractéristiques	Survie Globale			SSE			MNLr			Rechute		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
SAL												
Non	1			1			1			1		
Oui	1,99	1,11-3,59	0,02	1,83	1,08-3,10	0,02	2,54	1,03-6,26	0,04	1,49	0,78-2,86	0,23
Age												
<18	1			1			1			1		
>18	1,97	0,97-4,00	0,06	1,76	0,94-3,28	0,08	1,76	0,63-4,95	0,28	1,73	0,78-3,85	0,18
Cellules nucléées totales												
<4,6 10 ⁷	1			1			1			1		
>4,6 10 ⁷	0,99	0,55-1,8	0,99	0,99	0,79-2,44	0,99	0,38	0,12-1,16	0,09	1,62	0,76-3,45	0,21
Statut CMV												
Négatif	1			1			1			1		
Positif	1,89	1,01-3,54	0,05	1,39	0,79-2,44	0,26	2,41	0,95-6,1	0,06	0,95	0,44-2,05	0,9

Abréviations: HR: hazard ratio; MNLr: mortalité non liée à la rechute; SSE : Survie sans événement; CMV : Cytomegalovirus

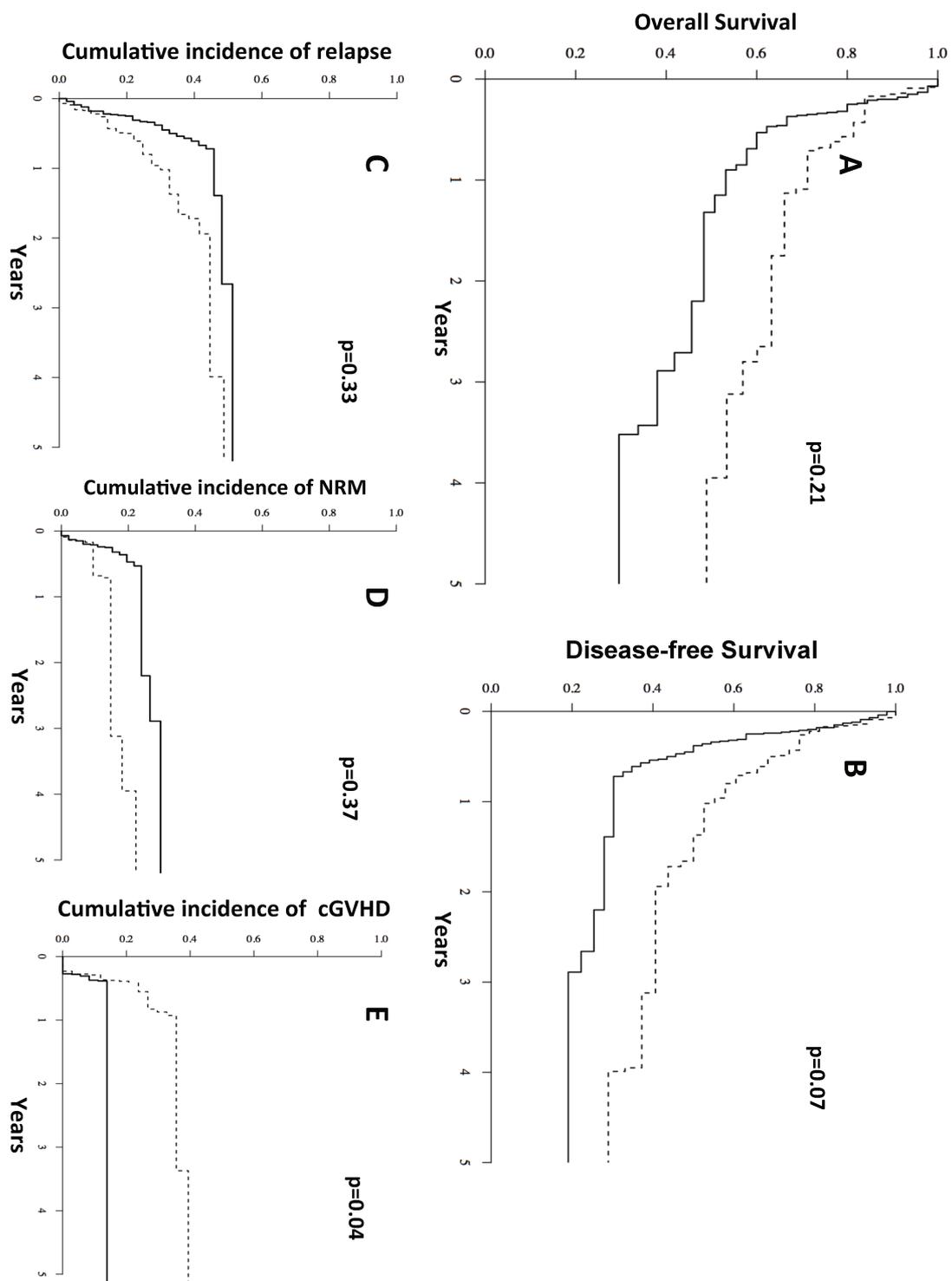


Figure 1: A. Survie globale à 3 ans des greffes de sang placentaires (le groupe SAL est représenté par une ligne pleine, le groupe sans SAL est représenté par une ligne pointillée) ; B. Survie sans événement ; C. Incidence cumulative de rechute ; D. Incidence cumulative de la mortalité non-liée à la rechute ; E. Incidence cumulative de GVH chronique.

- **1.2 Impact de l'utilisation du sérum anti-lymphocytaire dans les conditionnements atténués lors d'une allogreffe de sang placentaire**

INTRODUCTION

La faisabilité de la greffe de sang placentaire après un conditionnement atténué a été démontrée en 2003^{86,87,92}. L'utilisation du SAL dans le but d'obtenir une déplétion *in vivo* a également été testée dans les greffes à conditionnement atténué. L'objectif de cette étude multicentrique était d'évaluer l'impact de l'utilisation du SAL sur les événements post-greffes chez 661 patients ayant bénéficiés d'une allogreffe de sang placentaire avec des greffons simple ou double et un conditionnement atténué. Les patients proviennent de 76 centres EBMT (European bone Marrow transplant registry). Ce travail a été mené en collaboration avec le laboratoire Eurocord dirigé par le Pr. E. Gluckman.

PATIENTS ET METHODES

Les données proviennent des registres d'Eurocord et de l'European Blood and Marrow Transplant Group (EBMT). Les centres qui ont participé à ce travail ont dû vérifier attentivement les données du registre de l'EBMT. A ce titre, nous leur avons envoyé un questionnaire dont l'objectif était d'obtenir des informations détaillées sur les sources de SAL, la dose prescrite, et les modalités d'administration.

CRITERES D'INCLUSION

Nous avons analysés les données de 661 patients qui ont bénéficié d'une allogreffe de sang placentaire entre janvier 2004 et décembre 2010 dans 76 centres participants au registre de l'EBMT.

Les critères d'inclusion furent les suivants :

- âge supérieur à 18 ans
- 1^{ère} greffe avec un simple ou un double cordon
- allogreffe réalisée pour une affection hématologique maligne sous-jacente
- avoir reçu un conditionnement atténué de type Minneapolis

Pour permettre à notre population d'être aussi homogène que possible, nous avons sélectionné uniquement les adultes ayant reçu un conditionnement associant la fludarabine, le cyclophosphamide et une irradiation corporelle totale à faible dose (moins de 6 Gy) comme décrit par l'équipe de Brunstein.⁸⁸ Bien que le SAL puisse être incorporé à la discrétion du praticien dans le conditionnement, seulement 82 patients ont reçu du SAL tandis que les 579 autres n'en n'ont pas reçu.

Les modalités d'administration du SAL n'étaient disponibles que pour 47 patients. Le SAL était administré en général sur 3 jours (de 1 à 5 jours) et le SAL était interrompu en général 2 jours avant la réalisation de la greffe (de 1 à 7 jours).

Nous avons pu schématiquement séparer les patients en 3 catégories différentes : 17 d'entre eux ont stoppé la perfusion de SAL une journée avant la réalisation de la greffe ; 13 ont interrompu 2 jours avant la greffe et enfin les 17 autres l'ont interrompue entre 3 jours et plus avant la réalisation de la greffe.

Les informations relatives à la dose de SAL étaient disponibles pour 36 patients. Pour 19 d'entre eux, il s'agissait du SAL Freissenius, à la dose médiane de 20 mg/kg (range, 5-60 mg/Kg). Les 17 autres patients reçurent du SAL Genzyme à la dose médiane de 8 mg/kg (range, 4-15 mg/Kg). Il n'y avait pas de différence entre les deux types de SAL en termes de modalités d'administration.

DEFINITIONS

La récupération des neutrophiles correspond à l'obtention d'au moins 500 PNN/mm³ pendant au moins 3 jours consécutifs. La prise de greffe est définie comme une récupération de neutrophiles sans reconstitution autologue. Pour les patients qui ont fait l'objet d'une seconde greffe, leurs données ont été censurées à la date de la seconde greffe. L'échec de greffe est défini comme l'absence de récupération en neutrophiles au bout de 60 jours. La GVH aiguë est diagnostiquée et son évaluation a été réalisée suivant les critères couramment admis.¹⁶⁵ La GHV chronique est diagnostiquée également selon les critères classiques.¹⁶⁶ Elle est évaluée uniquement chez les patients dont la survie dépasse 100 jours avec une prise de greffe. La mortalité non-liée à la rechute (MNLR) est définie comme toutes les causes de décès à l'exception des décès liés à une évolutivité de la maladie sous-jacente. La survie globale (SG) est définie comme le temps écoulé entre la greffe et le décès du

patient et ce quelque soit sa cause ; et la survie sans-événement (SSE) correspond à la survie sans signe évident de rechute.

ANALYSES STATISTIQUES

Le suivi médian était de 36 mois (de 2 à 99 mois).

En plus de l'analyse portant sur l'utilisation du SAL, les variables suivantes ont également été considérées comme facteurs de risques pour l'analyse des événements post-greffes :

- Caractéristiques des patients : âge, sexe, statut CMV
- Caractéristiques des maladies sous-jacentes : diagnostics, statut de la maladie à la greffe (rémission complète, présence de l'hémopathie, maladie avancée et réfractaire).
- Caractéristiques de la greffe : année de la greffe, type de greffe (simple ou double cordons), traitement immunosuppresseur, sexe mismatch (donor femme/receveur homme), compatibilité HLA, compatibilité ABO, cellules nucléées totales et cellules CD34⁺ présentes dans le greffon.

RESULTATS

CARACTERISTIQUES DES PATIENTS

Les caractéristiques des patients, des modalités de greffes sont résumées dans le tableau 1, L'âge médian à la greffe était de 52 ans (de 18 à 72 ans). Les patients du groupe SAL ont tendance à être un peu plus âgés (52 ans vs. 54 ans, $p=0,068$). Les patients du groupe SAL présentaient une proportion plus importante de syndrome myélodysplasique et myéloprolifératifs que ceux du groupe sans SAL (31% versus 17%, $p=0,009$) ; ils présentaient également une légère tendance à avoir des maladies plus avancées ($p=0,063$). La proportion de leucémies aiguës est identiques dans les 2 groupes (49% versus 51%).

CARACTERISTIQUES DES GREFFES

Les conditionnements étaient tous atténués avec de la fludarabine (200 mg/m²) du cyclophosphamide (50 mg/kg) et une irradiation corporelle totale en une simple fraction (2Gy dans 86%, 4Gy pour 12%, et 6Gy pour 2% des patients).

EVENEMENTS POST-GREFFES

L'incidence cumulative de reconstitution en PNN à 60 jours était de 83±1% (84±1 % pour le groupe sans SAL et 82±4% pour le groupe avec SAL, p=0,17). Le temps médian pour la récupération en neutrophiles était de 20 jours (de 1 à 80 jours). Il y eu 103 échecs de greffe (15,6%) : 88 dans le groupe sans SAL et 15 dans le groupe avec SAL. Parmi ces 103 échecs, 33 patients étaient encore en vie 33 mois après la greffe. En analyse multivariée, il n'y avait pas d'impact du SAL sur la reconstitution en polynucléaires neutrophiles.

L'incidence cumulative de GVH de grade II-IV était respectivement de 15,4% et de 41% (p =0,0003) dans les groupes avec et sans SAL (Figure 1C). De même, l'incidence cumulative de GVH de grade III-IV était respectivement de 1,3 % et de 16% dans les groupes avec et sans SAL (p=0,0005). Dans l'analyse multivariée, le risque de GVH aiguë de grade II-IV était significativement plus faible dans le groupe SAL (HR 0,31, 95%CI 0,17-0,55, p<0,0001, Table 2). Parmi les patients qui ont survécu plus de 100 jours, l'incidence cumulative de GHV chronique était de 20% dans le groupe SAL et de 29% dans le groupe sans (p=0,072).

SURVIE GLOBALE

La survie globale à 3 ans était différente entre les 2 groupes (30±5% dans le groupe SAL vs. 48±2% dans le groupe sans SAL, p<0,0001). En analyse univariée, les autres facteurs de risque associés à une diminution de la survie globale étaient les suivants : un âge supérieur à 51 ans, une séropositivité pour le CMV, le diagnostic de SMD/SMP, une maladie avancée à la date de greffe, la présence d'incompatibilité HLA ≥ 2. L'analyse multivariée confirme l'impact négatif du SAL sur la SG (HR 1,69, 95%CI 1,19-2,41, p=0,003). L'intervalle entre la dernière injection de SAL et la réalisation de la greffe est corrélé à une diminution de la survie globale : la SG était de 6% pour les patients ayant interrompu 1 journée avant la greffe, de 38 % pour les patients présentant un intervalle de 2 jours ; et de 58% pour les patients ayant un intervalle de plus de 2 jours (p=0,022) (figure n°2).

MORTALITE NON-LIEE A LA RECHUTE ET RECHUTES

La MNLR était de 46% dans le groupe avec SAL and $26\pm 2\%$, dans le groupe sans ($p=0,00038$) (Figure 1D). Cette différence est confirmée en analyse multivariée (HR : 1,68, 95% CI 1,16-2,43, $p=0,0009$ pour le groupe avec SAL). De même, l'intervalle entre la dernière injection du SAL et la greffe sur la NRM était respectivement de 64%, 53% et 23% pour les patients ayant un intervalle de 1 jour, 2 jours, et 3 jours et plus ($p=0,030$).

L'incidence cumulative de rechutes n'était pas significativement différente entre les 2 groupes (29 ± 5 dans le groupe avec SAL vs. $34\pm 2\%$ dans le groupe sans, $p=0,60$).

CAUSES DE DECES

Comme montré dans le tableau n°3, 24% des patients sont décédés de rechute ou de progression dans le groupe SAL, tandis qu'ils étaient 27% dans le groupe sans ($p=0,58$). 28% des patients du groupe SAL décédèrent de syndrome infectieux contre 13% dans le groupe sans SAL ($p=0,0013$).

De plus, 6% des patients du groupe SAL sont décédés suite au développement d'un syndrome lymphoprolifératif non contrôlé (PTLD pour post-transplant lymphoproliferative disorders). Cette proportion est de 0,5% dans le groupe sans SAL ($p=0,001$).

DISCUSSION

Il s'agit à notre connaissance de la plus grande série rapportée sur l'impact du SAL dans le cadre d'une allogreffe de sang placentaire avec conditionnement atténué pour la prise en charge d'affections hématologiques malignes. Afin d'étudier une population aussi homogène que possible, nous n'avons inclus dans ce travail qu'exclusivement les patients ayant reçu un conditionnement atténué tel que décrit plus haut, ainsi que par Brunstein.⁸⁸

Comme dans d'autres travaux,¹⁶³ nous avons mis en évidence que le SAL a un impact tout à fait positif sur le contrôle de la GVH aiguë. En revanche, cet effet est profondément contrebalancé par une augmentation franche de la mortalité non-liée à la rechute et à une altération de la survie globale. Les patients ayant reçu du SAL dans le conditionnement présentent plus fréquemment des infections fatales et présentent également plus fréquemment des lymphomes du transplantés. Nous retrouvons ici la notion du retard à la reconstitution du système immunitaire chère à notre problématique plus globale. Ce retard est associé à une incidence évidemment plus élevée d'infections.^{3,19-21}

Comme lors de notre précédente étude, l'impact de la dose de SAL n'était pas évaluable car nous n'avons pas pu récupérer assez de données pour interpréter cette variable. Comme évoqué dans le travail de l'équipe de Lindemans et al,¹⁶³ l'intervalle qui s'écoule entre la dernière injection de SAL et la réalisation de la greffe semble avoir un impact important sur la survie puisque la survie globale des 17 patients ayant un intervalle restreint entre l'administration du SAL et la réalisation de la greffe (de l'ordre de 24 heures) ont présenté une survie globale médiocre (6%) comparativement aux deux autres groupes. Cette étude est une étude rétrospective, ces résultats devraient être confirmés dans un protocole prospectif évaluant également l'impact de la dose de SAL dans les conditionnements d'intensité réduite. Cependant, il paraît d'ores et déjà raisonnable, de proposer une administration du SAL respectant une période d'élimination d'au moins 48 heures.

Tableau 1 : caractéristiques des patients, des greffons et de la greffe				
Caractéristiques	Groupe sans SAL (n=579)	Groupe avec SAL (n=82)	Total (N=661)	P Value [‡]
Patients				
Age				
Médian	52	54	52	0,068
Range	18-69	19-72	18-72	
Sexe masculin- n (%)	289 (50)	49 (60)	338 (51)	0,10
Statut CMV- n (%)	338 (60)	54 (67)	392 (61)	0,18
Diagnostic - n (%)				
Leucémies aiguës	294 (51)	40 (49)	334 (51)	0,009
SMD, SMP et CML	101 (17)	25 (31)	126 (19)	
Syndrome lymphoprolifératif	184 (32)	17 (21)	201 (30)	
Statut de la maladie - n (%)				
Avancé	245 (43)	44 (54)	289 (44)	0,063
RC1 et RC2	328 (57)	38 (46)	366 (56)	
Antécédent d'autogreffe de CSP - n (%)	180 (32)	19 (23)	199 (30)	0,12
Greffe				
Cordon unique - n (%)	197 (34)	29 (35)	226 (34)	0,81
Compatibilité HLA - n (%)				
6/6 ou 5/6	152 (28)	21 (30)	173 (29)	0,76
<= 4/6	386 (72)	49 (70)	435 (72)	
Incompatibilité ABO -n (%)				
Compatibles/ inc. mineures	152 (29)	10 (20)	162 (28)	0,21
Majeures	374 (71)	39 (80)	413 (72)	
Sex mismatch –n (%)	187 (33)	36 (47)	223 (35)	0,013
CNT collectées médiane (range)	4,42 (0,41-12,21)	4,14 (1,99-13,67)	(0,41-13,67)	0,51
CNT perfusées – médiane (range)	3,5 (0,38-9,44)	3,54 (1,1-6,6)	(0,38-9,44)	0,95

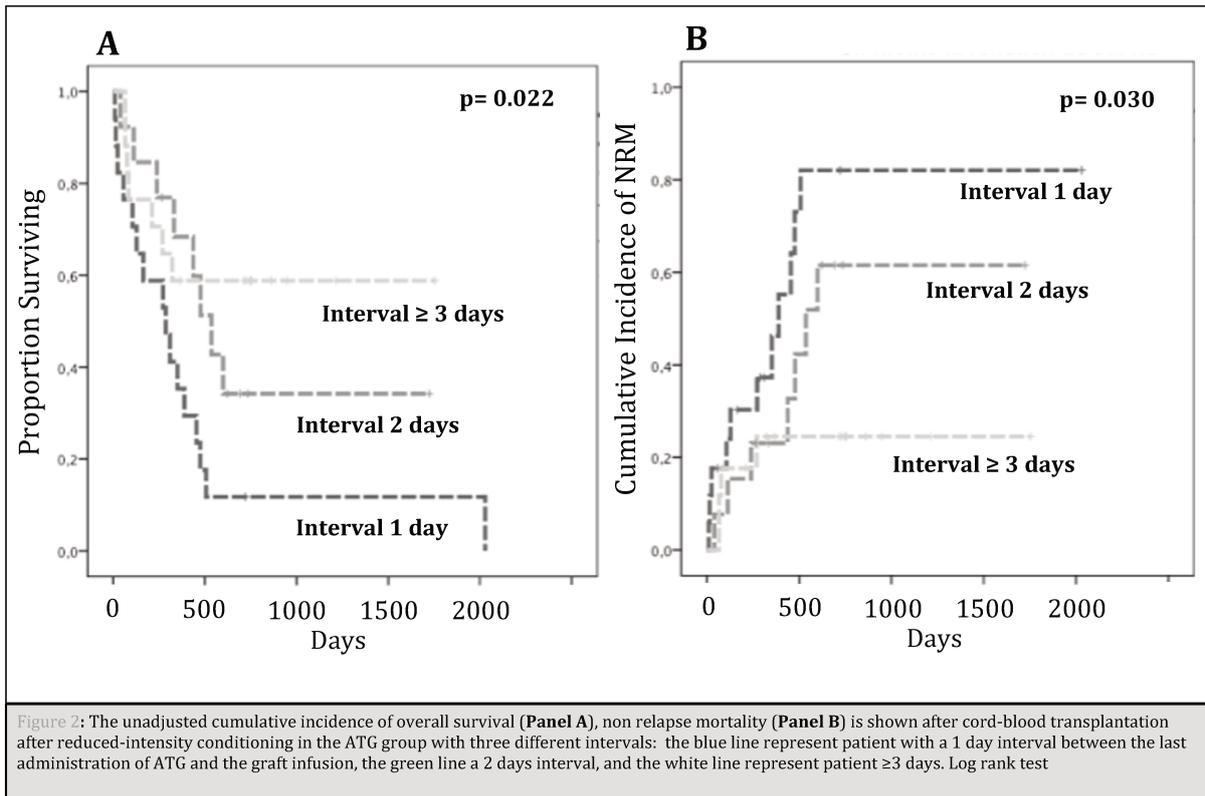
‡ Le test de chi-deux a été utilisé pour les variables catégorielles et le test de Mann-Whitney pour les variables continues.
CTF, cyclophosphamide+fludarabine+TBI; UCBT

Tableau 2 : Analyse multivariée des évènements post-greffe									
Caractéristiques	Survie globale à 3 ans			Mortalité non-liée à la rechute à 3 ans			GVH aigue de grade III-IV		
	HR	IC à 95%	P*	HR	IC à 95%	P*	HR	IC à 95%	P*
SAL									
Non	1			1			1		
Oui	1,69	[1,19 – 2,41]	0,003	1,68	[1,16-2,43]	0,0009	0,31	[0,17-0,55]	0,000

* IC désigne l'intervalle de confiance ; HR désigne le Hazard Ratio.

Tableau 3 : Causes de décès dans les 2 groupes			
	Utilisation du SAL		p value*
	Sans SAL	Avec SAL	
Rechute ou progression (n,%)	158 (27)	20 (24)	0,58
Décès non liés à la rechute (n,%)	148 (25)	37 (45)	0,0002
Infections	76 (13,1)	23 (28)	0,0013
Bactérienne	26 (4,5)	5 (6,1)	
Viral	18 (3,1)	6 (7,3)	
Parasitaire	4 (0,7)	3 (3,7)	
Fongique	12 (2,1)	2 (2,4)	
inconnu	16 (2,8)	7 (8,5)	0,016
Lymphoprolifération	3 (0,5)	5 (6,1)	0,001
Toxicité pulmonaire	2 (0,3)	2 (2,4)	
Toxicité système nerveux central	9 (6,1)	1	
GVHD	25 (16,9)	2	0,56
Syndrome hémorragique	4	-	
Défaillance multi-viscérale	5	-	
Toxicité rénale	3	-	

* La valeur du p pour les décès de toute cause est < 0,001, elle est déterminée par le test t de Fisher



- **1.3 Résultats complémentaires.**
 - **1.3.1 Détermination du nombre de cellules viables disponibles au sein des greffons de sang placentaire**

Matériels et Méthodes.

- Patients :

Nous avons recueilli les données relatives aux greffons de sang placentaire de toutes les greffes réalisées entre 2000 et 2010 à Lille, Nantes et Bordeaux. 235 greffes de sang placentaire ont été réalisées dans cet intervalle dans ces trois centres français. Les critères d'éligibilité étaient les suivants : réalisation d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques à partir d'un seul ou de deux cordons de sang placentaire lorsqu'étaient disponibles le nombre de cellules nucléées totales au recueil, après la décongélation, ainsi que le pourcentage de cellules viables dans le greffon. Les 235 patients ont été greffés quasi-exclusivement dans le cadre du traitement d'une hémopathie maligne (97%). Les caractéristiques des patients sont résumées dans le tableau 1 ci-dessous. Nous avons recueilli les informations relatives aux greffons quelque soit le conditionnement.

Caractéristiques des patients	<i>n</i>	%
<i>Nombre</i>	235	100
<i>Hommes/Femmes</i>	125/110	53,2/48,8
<i>Adultes</i>	152	64,7
<i>Enfants (<18 ans)</i>	83	35,3
Centres		
<i>Lille</i>	56	23,8
<i>Nantes</i>	103	43,8
<i>Bordeaux</i>	76	32,4
Diagnostics		
<i>Leucémies aiguës lymphoblastiques</i>	55	23,4
<i>Leucémies aiguës myéloblastiques</i>	74	31,5
<i>Leucémies aiguës (autres)</i>	15	6,4
<i>Lymphomes</i>	32	13,6
<i>Aplasies médullaires</i>	4	1,7
<i>Syndromes myélodysplasiques</i>	36	15,3
<i>Leucémies lymphoïdes chroniques</i>	5	2,1
<i>Leucémies myéloïde chroniques</i>	5	2,1
<i>Syndromes myéloprolifératifs</i>	6	2,5
<i>Tumeur solide</i>	1	0,4
<i>Autres</i>	2	0,8

Tableau 1 :

- Caractéristiques du conditionnement

Sur les 235 patients de cette cohorte, on peut noter que 115 patients ont bénéficié d'un conditionnement standard et parmi eux, 43,5% ont reçu du SAL. 120 patients ont bénéficiés d'un conditionnement atténué et parmi eux, 73% ont reçu du SAL.

- Caractéristiques des greffons

Les données recueillies auprès des 3 centres greffeurs (Lille, Nantes et Bordeaux) ont permis de renseigner la quantité de cellules nucléées totales disponibles au recueil du sang placentaire, la quantité de cellules nucléées totales disponibles à la décongélation et enfin le pourcentage de cellules viables. La viabilité a été appréciée le plus souvent après marquage des cellules au 7-AAD (7-Amino-Actinomycin), marqueur de viabilité cellulaire qui s'intercale dans la double hélice d'ADN. Cette analyse était parfois réalisée par coloration à l'acridine orange, un fluorochrome qui se fixe également sur l'ADN.

Résultats

Dans notre cohorte, le taux de recouvrement après décongélation atteint en médiane 80%, avec des valeurs extrêmes qui varient de 0 à 100%. 25% des greffons présentent un taux de recouvrement inférieur à 73%, et 25% d'entre eux présentent un taux de recouvrement après décongélation supérieur à 89%.

La viabilité médiane des cellules nucléées totales est de 39% avec un minimum de 0% et un maximum de 100%. Les 25% des greffons les plus altérés présentent ratio de viabilité des cellules nucléées totales inférieure à 30% ; tandis que les 25 % des meilleurs greffons présentent ratio de viabilité supérieure à 50% (figure 1).

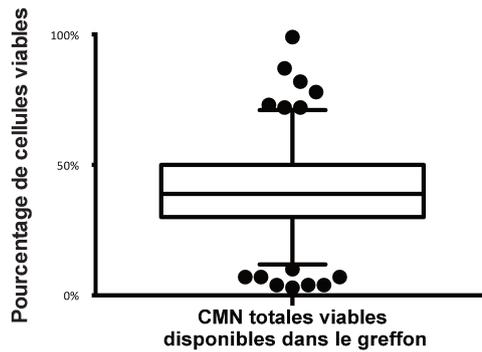


Figure n°1 : Boîte à moustaches représentant la répartition des cellules mononucléées totales viables disponibles dans les greffons de la cohorte de 235 patients greffés entre 2000 et 2010 à Lille, Nantes et Bordeaux ; la boîte désigne l'intervalle interquartile, les moustaches désignent les valeurs entre le 5° et le 95° percentiles, les points désignent les valeurs extrêmes.

Si l'on considère la récupération de cellules viables dans le greffon en fonction du nombre de cellules mononucléées totales disponibles avant l'étape de congélation, le ratio plonge brusquement. Ainsi, le taux de cellules viables après décongélation ne représente en moyenne que 41% des cellules mononucléées totales disponibles avant la décongélation, la médiane est de 40% ; 25% de nos greffons présente un taux de cellules viables inférieur ou égal à 32% et 10% des greffons présentent un rendement de cellules viables inférieur à 25% (figure n°2). Ces chiffres, particulièrement faibles, illustrent l'importance de l'apoptose des cellules nucléées totales présentes dans les greffons de sang placentaire lors des étapes de congélation/décongélation.

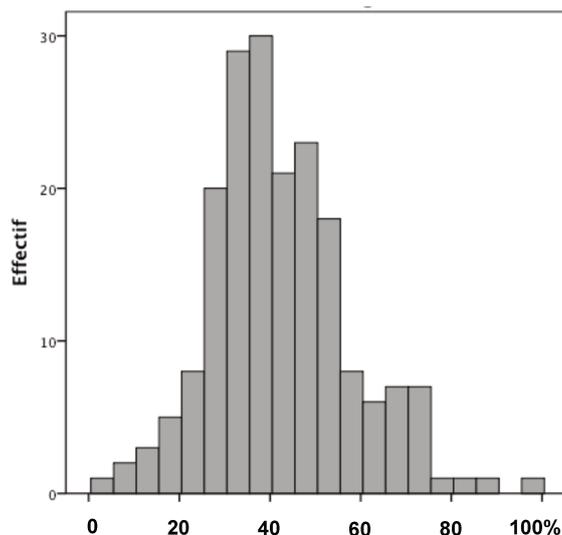


Figure n°2 : Histogramme en bâton illustrant les effectifs des greffons de sang placentaire selon le pourcentage de récupération de cellules mononucléées viables par rapport aux cellules mononucléées disponibles dans le greffon avant congélation ; cohorte complémentaire de Lille, Nantes et Bordeaux, (n=235).

▪ **1.3.2 Effet de l'utilisation du SAL en fonction du nombre de cellules mononucléées totales disponibles dans le greffon.**

Dans la cohorte de 91 patients inclus dans la publication de BMT,²⁷ les patients ont tous été greffés après un conditionnement de type MAC. La dose de cellules mononucléées totales disponibles dans le greffon était, avant décongélation, en moyenne de $0,55 \times 10^7/\text{kg}$ de poids du receveur (médiane= 0,46, minimum=0,047, maximum=2,22). Pour connaître l'impact de l'utilisation du SAL sur les greffons relativement pauvres en cellules mononucléées totales, nous avons scindé en deux notre population de patients : a. population recevant moins de $0,46 \times 10^7/\text{kg}$; b. population recevant plus de $0,46 \times 10^7/\text{kg}$.

L'analyse de la survie globale fait apparaître que la population (a.) présente une altération importante de la SG en présence de SAL. Cette différence est significative avec une survie moyenne dans le groupe sans SAL de 22,5 mois et de 12,9 mois dans le groupe SAL ($p=0,009$), tandis que les greffons plus riches de la population (b.) permettent d'absorber l'impact de l'ajout du SAL dans le conditionnement ($p=0,674$) (28 mois de survie moyenne sans SAL, et 23 mois avec SAL) (figure n°3).

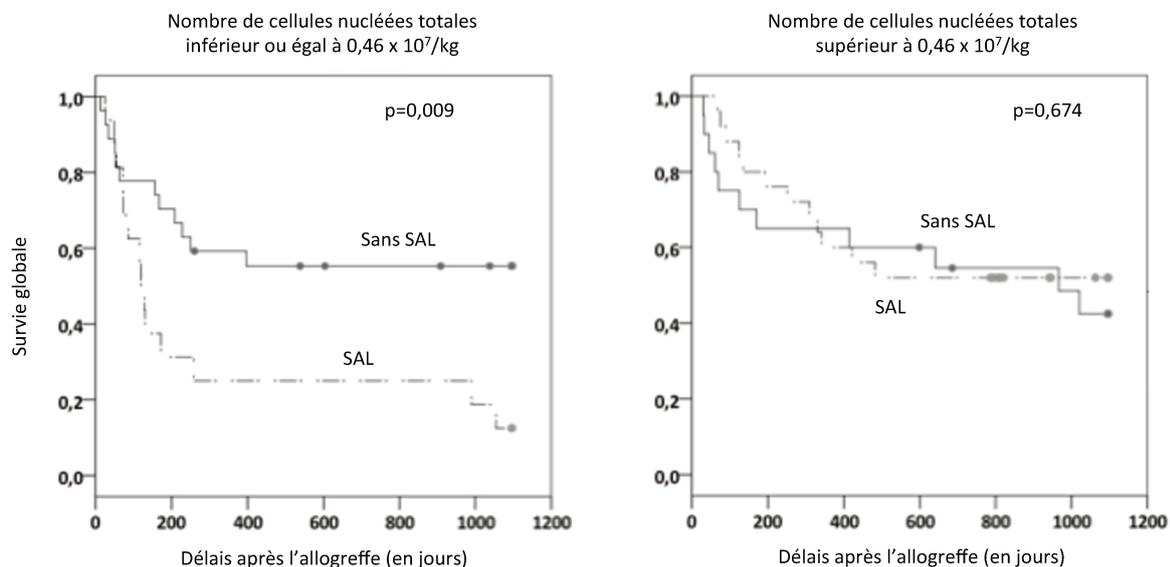


Figure n°3: Courbes de Kaplan-Meier : Survie globale des patients ayant reçu un greffon avec une quantité inférieure ou égale à $0,46 \times 10^7/\text{kg}$ ou supérieure à $0,46 \times 10^7/\text{kg}$, avec et sans sérum anti-lymphocytaire. Les courbes noires continues représentent les patients sans SAL, les courbes discontinues représentent les patients avec SAL.

Cette différence dans la survie globale peut être expliquée par une augmentation de la mortalité non-liée à la rechute (MNLR). La différence entre le groupe a. et le groupe b. n'est pas aussi franche que dans l'analyse de la survie globale, néanmoins, la mortalité non-liée à la rechute semble être plus importante dans le groupe a. en présence de SAL ($p=0,054$). Dans le groupe de patients b. la différence entre SAL et sans SAL n'est pas significative (figure n°4).

Il n'y a aucune différence entre ces groupes en terme de survenue de rechute. Il n'y a pas non plus, dans cette analyse, de différence significative en terme de survenue de GVH aiguë de grade II-IV et III-IV.

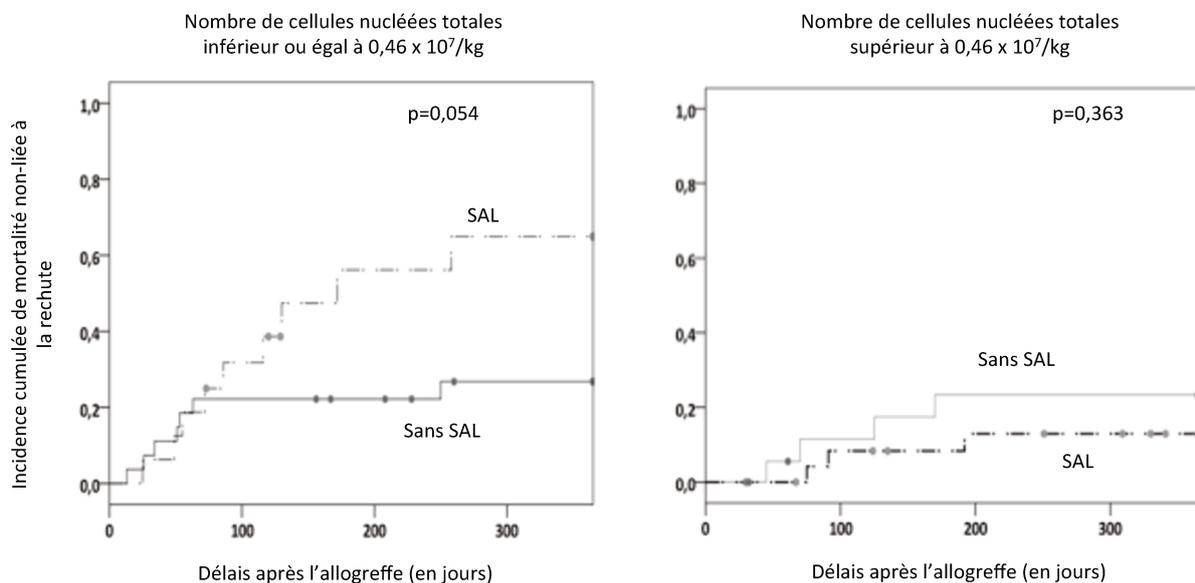


Figure n°4: Courbes de Kaplan-Meier : Incidences cumulatives de la mortalité non-liée à la rechute. des patients ayant un greffon avec une quantité inférieure ou égale à $0,46 \times 10^7/\text{kg}$ ou supérieure à $0,46 \times 10^7/\text{kg}$, avec et sans Sérum anti-lymphocytaires. Les courbes noires continues représentent les patients sans SAL, les courbes discontinues représentent les patients avec SAL.

- **1.4 Conclusion de ces travaux complémentaires.**

La cohorte de 235 patients et de leur greffon démontre que la viabilité des cellules mononuclées totales disponibles dans le greffon est une donnée relative. Le choix porté sur un cordon banqué ne peut intégrer aujourd'hui le nombre réel de cellules mononuclées perfusées et viables lors de la transplantation médullaire. Dans la littérature, les cellules mononuclées totales sont représentées à environ 33% par des lymphocytes.¹⁶⁸ Il existe

dans cette cohorte une fragilité importante de cette population lymphocytaire. Cette fragilité peut être mise en parallèle avec l'effet délétère observé sur la survie globale et sur la mortalité liée à la greffe observée dans nos deux premières études.

Les travaux complémentaires sur la cohorte de 91 patients portant sur l'impact différentiel du sérum anti-lymphocytaire en fonction de la quantité de cellules nucléées totales disponibles dans le greffon démontre, même si ces résultats ne sont retrouvés qu'en analyse univariée, qu'il existe une relation assez directe entre la quantité de cellules immunocompétentes présentes dans le greffon et l'impact de la perfusion du SAL. La persistance d'un panel large d'anticorps anti-lymphocytes T dans le sang du receveur doit participer à la lymphodéplétion du greffon de sang placentaire. Cette lymphodéplétion devient particulièrement préjudiciable lorsque les greffons ne sont pas naturellement riches en cellules immunocompétentes.

Le contingent lymphocytaire disponible dans le greffon participe à l'expansion homéostatique. Cette disponibilité peut être empêchée par deux éléments de nature différente. Premièrement, il est possible que les cellules immunocompétentes présentes dans le sang placentaires soient déjà très altérés ; notre travail nous indique qu'environ seulement 40% d'entre elles sont viables ; deuxièmement, il est nécessaire que cette proportion de cellules immunocompétentes ne soit pas totalement détruite par l'ajout de sérum anti-lymphocytaire dans le conditionnement.

Ces différents résultats nous ont conduit à analyser plus avant les capacités de survie des lymphocytes T des greffons de sang placentaire dont l'expansion homéostatique est critique pour permettre la reconstitution initiale du compartiment T. Ce travail fondamental comprend 2 axes :

- l'analyse de la viabilité des lymphocytes T de sang de cordon et des facteurs pouvant conduire à une altération de cette viabilité
- l'évaluation de l'effet de l'Interleukine-7 sur les cellules T de sang placentaire afin d'améliorer leur capacité de survie.

Le travail publié récemment par l'équipe de Kielsen sur l'analyse de l'effet du SAL chez les receveurs démontre que le SAL entraîne une lymphodéplétion profonde et que les taux d'IL-7

plasmatiques dosés en post-greffe sont plus élevés chez les receveurs qui ont reçu du SAL par rapport à ceux qui n'en ont pas reçu.¹⁶⁹

PARTIE II

Après analyse des capacités de survie des lymphocytes T de sang placentaire, nous avons étudié comment l'exposition de ces cellules à de faibles doses d'Interleukine-7 peut améliorer leur survie sans majorer leur potentiel alloréactif.

- **2.1 L'exposition quotidienne des lymphocytes T de sang de cordon à de faibles concentrations d'IL-7 améliore leur survie sans potentialiser leur réponse proliférative à une stimulation alloréactive.**

INTRODUCTION

Comparativement aux sources conventionnelles de CSH, le sang placentaire autorise des incompatibilités HLA plus nombreuses comme indiqué dans notre introduction générale. Les propriétés intrinsèques des cellules de sang de cordon sont avancées pour expliquer cette tolérance relative. Par ailleurs, certains receveurs de greffons de sang placentaire présentent de grandes difficultés à reconstituer leur compartiment immunitaire T dans les mois suivant la greffe. Nous avons rappelé que les lymphocytes T présents au sein du sang de cordon sont essentiellement des cellules T naïves parmi lesquelles existe un contingent important d'émigrants thymiques récents. Ces cellules sont particulièrement sensibles à l'apoptose^{170,171} et ceci pourrait contribuer au retard important de certaines reconstitutions. Dans notre problématique d'identifier certains facteurs susceptibles de limiter la reconstitution immunitaire post-greffe, nous avons évalué et comparé la viabilité de sangs de cordon fraîchement recueillis et après décongélation. Secondairement, pour améliorer leur viabilité, nous avons testé l'effet de l'IL-7 sur ces cellules.

L'interleukine 7 est une cytokine essentielle à l'homéostasie des lymphocytes T¹⁷². Nous avons précédemment décrit l'effet de l'administration d'IL-7 recombinant chez des patients lymphopéniques pour améliorer la reconstitution en lymphocytes T.^{173,174} De fortes concentrations sont capables d'améliorer la survie des lymphocytes T de sang placentaire en culture et en l'absence de stimulation^{37,175} et pourraient induire la production d'interféron- γ ainsi que d'autres cytokines lors de stimulation allogénique.¹⁷⁶ De forte concentration d'IL-7 peuvent aussi aboutir à une expansion de lymphocytes T auto et alloréactifs¹⁷⁷ avec pour corollaire le risque de potentialiser la réaction de GVH comme ceci a été démontré dans

certaines modèles pré-cliniques.¹⁷⁸ Dans certaines études, il est possible de trouver une association entre de fortes concentrations systémiques d'IL-7 et l'importance de la GVH.^{71,179}

L'ensemble de ces éléments nous a conduit à privilégier d'emblée l'étude de l'effet de faibles doses d'IL-7 sur les lymphocytes T de sang de cordon, notre objectif étant de trouver la dose minimale efficace pour assurer la survie des lymphocytes T de sang placentaire sans pour autant potentialiser leur activation et leur alloréactivité.

MATERIEL ET METHODE

A. Lymphocytes T de sang placentaire et lymphocytes T de sujets adultes

Les échantillons de sang placentaire et de sang d'adultes sains ont été recueillis conformément aux règles du comité d'éthique du CHRU de Lille (DC 2011-1288). Les échantillons de sang placentaires (de 50 à 100 mL) ont été obtenus après la naissance de 39 nouveau-nés nés à terme, immédiatement avant la délivrance. Les méthodes de recueil étaient tout à fait superposables à celles utilisées pour le recueil des sangs de cordons ombilicaux destinés à la collection de la banque de sang placentaire de l'Établissement Français du sang de Lille-Nord de France. Les caractéristiques relatives aux naissances sont précisées dans le tableau 1. Nous avons dosé dans les plasmas de sang placentaires la concentration en IL-7 grâce à une méthode ELISA (IL-7 highly-sensitive Quantikine ELISA kits, R&D systems, Minneapolis, MN, USA). Les cellules mononucléées sont isolées sur un gradient de Ficoll dans les 3 heures suivant le recueil puis lavées dans une solution tampon. Pour l'étude initiale de la viabilité des cellules T de sang de cordon, une partie des cellules est étudiée d'emblée tandis qu'une autre est placée dans un milieu spécifique pour la cryopréservation contenant 10% de DMSO Recovery Cell Culture Freezing Medium, Gibco, Invitrogen, Oslo, Norvège) avant d'être cryopréservée. Les cellules mononucléées et les lymphocytes T d'adultes testés dans la première partie de notre étude sont préparés de la même manière, à partir du sang périphérique de volontaires sains.

Pour l'étude des effets de l'IL-7, les cellules mononucléées ont été systématiquement décongelées au préalable pour se rapprocher des conditions d'utilisation en pratique clinique.

Les lymphocytes T sont obtenus grâce à une technique de tri immuno-magnétique (EasySep Human T cell Enrichment kit, StemCell Technologies, Vancouver, Canada).

Les monocytes nécessaires aux stimulations allogéniques sont également obtenus à partir du sang périphérique de volontaires sains, grâce à un tri immuno-magnétique (EasySep Monocyte Enrichment kit, StemCell Technologies).

B. Analyses phénotypiques des lymphocytes T

Les populations lymphocytaires T ont été phénotypées avant mise en culture et à différents temps de culture. Tous les anticorps conjugués et leur contrôle isotypique proviennent de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) hormis l'anticorps monoclonal dirigé contre le CD127 (chaîne de l'IL-7R α) et de son contrôle isotypique qui provienne de Bioscience (Paris, France). De même l'anticorps monoclonal dirigé contre la protéine kinase-7 (PTK7) est de Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Germany). La numération des lymphocytes viables est réalisée par cytométrie en flux en simple plateforme, par une technique de comptage par billes : 100 μ L d'une solution de billes (Flowcount fluorospheres, Beckman Coulter) est ajoutée à 100 μ L de sang après des étapes de lyse ou de lavage décrites précédemment, et une numération est réalisée ensuite sur le cytomètre FC 500 après homogénéisation. La viabilité cellulaire est évaluée par un double marquage avec 50 nM d'iodure de 3,3'-dihexyloxycarbocyanine (DiOC6(3); Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et du iodure de propidium (IP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Nous avons évalué l'expression du CD127 et du CD31 afin de déterminer la proportion de lymphocytes positifs pour ces marqueurs ainsi que leur intensité de fixation. Pour évaluer la prolifération cellulaire, les cellules ont été exposées préalablement à la culture au carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, 5 μ M; Invitrogen).

C. Les cultures sans stimulation

Les lymphocytes T sont mis en puits dans des plaques de 96-puits à la concentration de 1×10^5 /puits en présence de RPMI supplémenté avec 2 mM L-glutamate, 2 mM pyruvate, 10% de sérum AB inactivé (J. Boy Institute, Reims, France). Suivant les expérimentations, les lymphocytes T ont été cultivés ou non avec de l'IL-7 recombinant (R&D systems) à des concentrations de 25 à 1000 pg/mL.

D. Réactions lymphocytaires mixtes

Les réactions lymphocytaires mixtes sont réalisées en triplicates, avec des lymphocytes T de sang de cordon préalablement marqués au CFSE à la concentration de 1×10^5 cellules/puits. La stimulation allogénique est réalisée par des monocytes d'adultes (1×10^4 cellules/puits) présentant 4 à 6 incompatibilités HLA et au moins une incompatibilité portant sur HLA-DR.

RESULTATS

La viabilité des cellules T varie fortement en fonction des cordons dans les cultures réalisées en conditions basales, sans stimulation.

Plus de 98% des lymphocytes T fraîchement collectés ou cryopréservés sont viables à J0 avant toute mise en culture comme en témoigne la fixation par le DiOC₆ et l'absence de signal en iodure de propidium (IP). Nous observons une perte rapide de la viabilité des lymphocytes T de sang placentaire fraîchement collectés et ceci contraste fortement avec les résultats de viabilité observés pour les lymphocytes T recueillis chez des adultes sains. A J7, après une semaine de culture sans stimulation, nous observons la mortalité quasi-complète des cellules T de sang placentaire.

Il existe néanmoins une profonde variation de la proportion de lymphocytes T viables entre les différents cordons après 4 jours de culture (17,4–79,7%) (Figure 1A). Nous avons observé des résultats superposables même si la viabilité est globalement moins bonne après l'étape de cryopréservation/décongélation. Ainsi, après 4 jours de culture, il existe une forte corrélation entre le nombre de lymphocytes T encore viables sans étape de congélation préalable et ceux provenant des mêmes cordons et qui ont été préalablement congelés ($\rho = 0,785$, $p < 0,001$) (Figure 1B). Parmi les caractéristiques des donneurs de sang placentaire résumées dans le tableau 1, nous avons mis en évidence deux corrélations entre le degré de viabilité à J4 et les caractéristiques du donneur : le poids de l'enfant à la naissance ($\rho = 0,376$; $p = 0,031$) et une corrélation positive entre la valeur du pH veineux à la naissance et le nombre de lymphocytes viables à J4 ($\rho = 0,397$; $p = 0,027$). Ces 2 éléments ont été confirmés dans une analyse multivariée (respectivement $p = 0,023$ et $p = 0,005$)

L'ajout quotidien d'IL-7 à faible dose améliore la survie des lymphocytes T de sang placentaire préalablement congelés.

Dans ces cultures, les lymphocytes T de sang placentaires sont issus de prélèvements qui ont été congelés. Nous avons initialement testé l'ajout d'IL-7 uniquement le premier jour de culture. Dans ces conditions, l'effet protecteur observé n'était pas durable dans le temps car au-delà des 4 premiers jours de culture, nous observions le même phénomène d'apoptose qu'en l'absence d'IL-7. Cet effet transitoire pouvait être attribué à la consommation et/ou à la dégradation de l'IL-7 : la mesure de la concentration d'IL-7 dans les surnageants des puits de culture à différents temps montre une décroissance progressive des concentrations d'IL-7 mesurées.

Ces premiers résultats nous ont conduits à tester l'effet d'un ajout quotidien d'IL-7 à différentes concentrations (de 25 à 100 pg/mL) sur les lymphocytes T de cordon cryopréservés puis décongelés.

Nous avons observé une amélioration croissante de la viabilité jusqu'à la dose de 100 pg/mL ajoutée quotidiennement : la viabilité des lymphocytes T est alors fortement préservée sur 7 jours de culture (figure 2A). Le nombre de lymphocytes T viables après 7 jours de culture était corrélé à un haut niveau d'expression du CD127, chaîne α du récepteur à l'IL-7, mesuré par l'intensité moyenne de fluorescence en cytométrie de flux ($p = 0,023$ and $p = 0,005$) au même point d'analyse. Dans ces conditions d'exposition, la proportion de lymphocytes T qui se sont divisés reste faible : moins de 20 % de ces lymphocytes T a effectué une division comme en témoigne la courbe de dilution du CFSE (Figure 2B). Avec des concentrations plus élevées d'IL-7 (250 pg/mL), les lymphocytes T se mettent à se diviser davantage (Figure 2B), sans pour autant améliorer leur survie globale. Sous exposition à l'IL-7, la proportion de lymphocytes viables reste identique en terme de sous-populations T CD4⁺ et CD8⁺ : le ratio CD4⁺/CD8⁺ reste parfaitement constant durant une semaine de culture. Les émigrants thymiques récents sont identifiés grâce à la co-expression des marqueurs de surface CD31⁺ et PTK7⁺.^{170,180,181} Leur proportion n'est pas modifiée par l'ajout d'IL-7 aux différentes concentrations testées sur une semaine de culture.

L'alloréactivité des lymphocytes de sang placentaire n'est pas potentialisée en présence d'IL-7 à faible concentration.

Pour étudier les conséquences d'une forte stimulation allogénique en présence d'IL-7, les cellules allogéniques co-cultivées avec les lymphocytes T de sang placentaire sont des monocytes d'adultes présentant au moins 4 incompatibilités HLA. Nous avons observé une modification mineure en terme d'incorporation de thymidine tritiée lors de l'ajout d'IL-7 à la dose de 50 et de 100 pg/mL, comparativement aux cultures mixtes conduites en l'absence d'IL-7 (Figure 3A). Lors de l'étude de l'impact fonctionnel, nous avons mesuré par ELISA la production d'interféron- γ produit par les lymphocytes T dans ces conditions de stimulations allogéniques avec et sans IL-7 et nos résultats ne montrent pas de différence significative (Figure 3B). En revanche, nous avons constaté une augmentation modérée mais néanmoins significative du nombre de lymphocytes viables dans les cultures mixtes réalisées en présence d'IL-7 (augmentation médiane : 58%, $p = 0,0001$) (Figure 3C).

Pour analyser plus finement cette augmentation du nombre de lymphocytes T viables dans les cultures mixtes avec ajout d'IL-7, nous avons énuméré séparément les cellules ayant réalisé une réponse proliférative (i.e. qui présentent une dilution du CFSE et qui sont des grands lymphoblastes sur le diagramme taille/structure), et les cellules n'ayant pas présentés de réponse proliférative (i.e. absence de dilution du CFSE et petits lymphocytes sur le diagramme taille/structure). Cette étude différentielle nous indique que l'ajout d'IL-7 quotidiennement dans les cultures mixtes a amélioré de manière très significative la viabilité des petits lymphocytes qui n'ont pas participé à la réponse allogéniques ($p=0,007$) tandis que les grandes lymphoblastes impliqués dans la réponse allogénique et qui ont réalisé plusieurs cycles de division ne sont pas significativement augmentés par l'ajout d'IL-7 (Figure 4).

DISCUSSION

Dans ce travail nous avons montré que la viabilité des lymphocytes T varie selon les sangs de cordon et que cette viabilité peut être améliorée par l'ajout d'IL-7 à très faible dose, et ceci, sans potentialiser la réponse allogénique.

Parmi les 39 échantillons de sang placentaire étudiés dans ce travail, nous avons constaté comme dans d'autres travaux, une très grande sensibilité à l'apoptose.^{171,182} Cette sensibilité est variable en fonction des cordons : certains présentent une viabilité tout à fait correcte

avec près de 70% de cellules viables après 4 jours de culture, tandis que d'autres après le même délai de culture présentent un taux de cellules viables effondré, proche des 10%. Ces résultats ont été obtenus alors que les conditions de recueil des cordons étaient rigoureusement les mêmes pour nos 39 cordons étudiés.

Nous pourrions proposer de réaliser systématiquement une rapide évaluation de la viabilité intrinsèque des cordons par leur mise en culture en même temps que le recueil pour stockage d'une poche de sang placentaire. Ainsi, les cordons qui présenteraient une très forte sensibilité à l'apoptose pourraient être écartés car on peut imaginer *in vivo* leur faible capacité d'expansion homéostatique. Il est intéressant également de noter l'influence notable du pH veineux sur cette viabilité ultérieure, sachant qu'il s'agit déjà d'un paramètre étudié en pédiatrie et connu pour être associé à un des complications néonatales sévères en cas d'acidité excessive.

L'IL-7 est une cytokine reconnue par son action préventive sur l'apoptose des lymphocytes T naïfs et des ETR,^{37,175} mais également reconnue pour abaisser le seuil d'activation de ces mêmes lymphocytes T avec à la clef une aggravation possible de la réponse alloréactive.¹⁷⁷ C'est dans ce contexte précis que nous avons évalué l'impact de l'IL-7 sur la survie des lymphocytes T. Le meilleur compromis que nous avons observé était à 100 pg/mL ajouté quotidiennement permettant d'améliorer la survie des lymphocytes. A la dose de 100 pg/mL l'expression du CD127 n'est pas modifiée ce qui indique que les faibles concentrations d'IL-7 n'induisent pas de régulation négative de son récepteur et que les lymphocytes T gardent intact leur capacité à se lier à l'IL-7. La stabilité du ratio CD4⁺/CD8⁺ ainsi que celui du taux de lymphocytes T CD31⁺/PTK7⁺ indique que les lymphocytes T sont préservés à l'identique et que nous ne favorisons pas une sous-population par rapport à une autre et notamment pas une population de lymphocytes T immatures (les ETR). Cela confirme également que la plupart des lymphocytes T reste quiescent car l'expression de la protéine de surface PTK7 est généralement perdue lors de la prolifération cellulaire induite par l'action d'une cytokine.¹⁷⁰

En dépit d'une stimulation allogénique avec des monocytes HLA-incompatibles, l'action de l'IL-7 à la dose de 100 pg/mL ajoutée quotidiennement ne semble pas modifier profondément la réponse alloréactive des lymphocytes T présents dans les cultures mixtes. Le nombre de lymphocytes viables dans les puits de cultures avec IL-7 et stimulation

alloréactive augmente faiblement et le gain de survie, grâce à l'analyse fine du gradient de dilution du CFSE et à la numération des cellules viables, est attribué à une augmentation significative du taux de lymphocytes quiescents, non engagés dans la réponse allogénique.

Ces données indiquent que l'ajout quotidien d'IL-7 promeut la survie des lymphocytes T de sang de cordon sans potentialiser leur capacité de prolifération en réponse à une stimulation alloréactive. La survie en quiescence des lymphocytes T est possible grâce à cette faible concentration quotidienne.¹⁸³ Cette concentration est 10 à 100 fois plus faible que les pics d'IL-7 obtenus après ajout d'IL-7 observés dans des essais cliniques,^{173,174} mais est néanmoins supérieur aux pics d'IL-7 mesurés dans le sang périphérique au décours d'une procédure d'allogreffe avec un conditionnement myéloablatif.^{5,10,12,21,22}

L'IL-7 recombinante a été récemment utilisé dans le cadre d'un essai thérapeutique au décours d'une allogreffe de CSH, démontrant une amélioration significative de la reconstitution immunitaire sans pour autant aboutir à une augmentation de l'incidence de la GVH. Dans cet essai, il s'agissait de greffon T déplété. Le risque d'augmenter significativement l'alloréactivité en utilisant l'IL-7 avec des greffons non-manipulés ne peut être occulté. Dans la perspective de développement de ce type d'immunothérapie, l'amélioration de la survie des lymphocytes T de sang placentaire est néanmoins un objectif raisonnable.

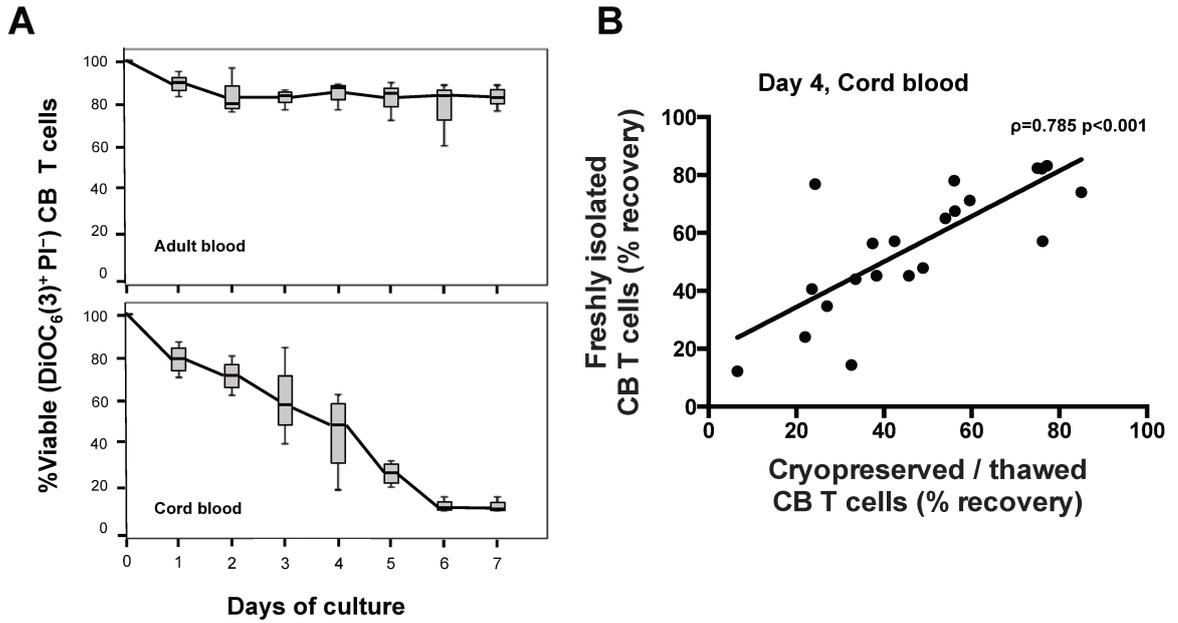


Figure 1. Perte de la viabilité des lymphocytes T de sang placentaire (cord blood) en culture sans stimulation. Les cellules viables sont les cellules DiOC₆(3)-positives et iodure de propidium (PI)-négatives **(A)** Différences dans la viabilité cellulaire entre les cellules T d'adulte (en haut) et de sang placentaire (avant congélation) en bas). Toutes ces cultures ont été conduites en parallèle sur 7 jours (6 adultes, 15 CB). Les boîtes-à-moustaches représente la médiane (barre centrale), l'intervalle interquartile (boite) et les moustaches représentent 1,5 fois l'intervalle IQ. **(B)** Viabilité cellulaire des cellules fraîches après 4 jours de culture comparée à la viabilité des cellules T cryopréservées et décongelées des mêmes donneurs (21 premiers cordons).

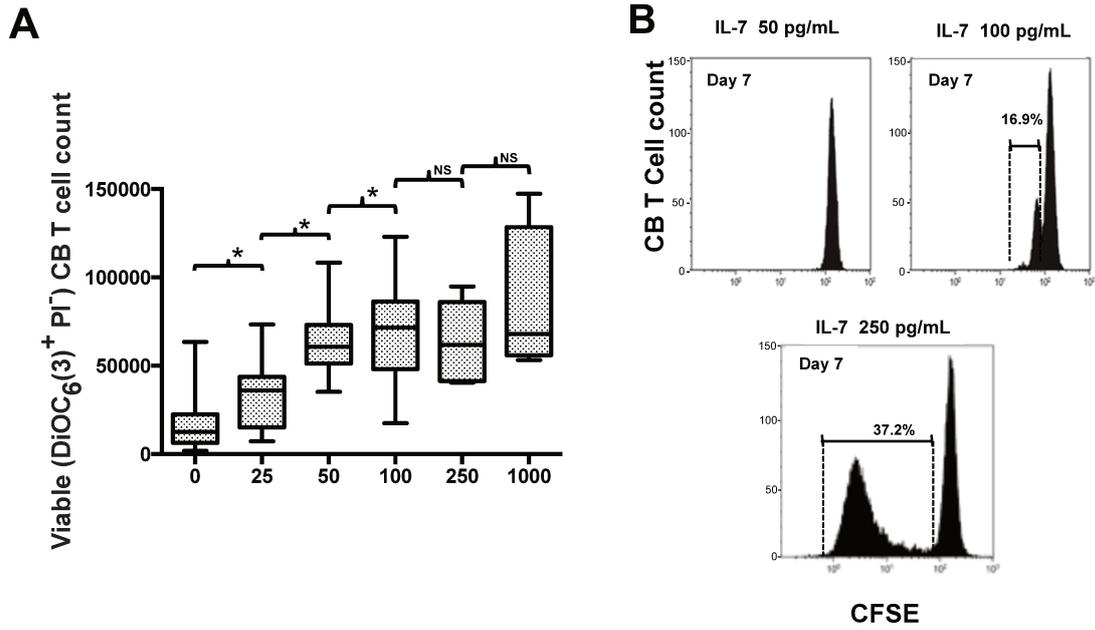


Figure 2. L'ajout d'interleukine-7 améliore la survie des cellules T de sang de cordon cryopréservées et décongelées. **(A)** Numération de cellules T viables (DiOC₆(3)-positives et PI-négatives) issues de 17 donneurs mises en culture à la concentration de 1×10^5 T cellules/puits et cultivées sur 7 jours sans et avec ajout d'IL-7 quotidiennement aux concentrations indiquées. Les données sont représentées avec des boîtes-à-moustaches comme décrites dans la figure 1. Les différences significatives sont repérées par une astérisque; * $p < 0,05$, **(B)** Analyse en cytométrie de flux de la prolifération cellulaire après 7 jours de culture après un marquage au CFSE lors de l'ajout d'IL-7 aux doses de 50, 100 et 250 pg/mL comme indiqué. Résultat représentatif d'une des 17 expérimentations.

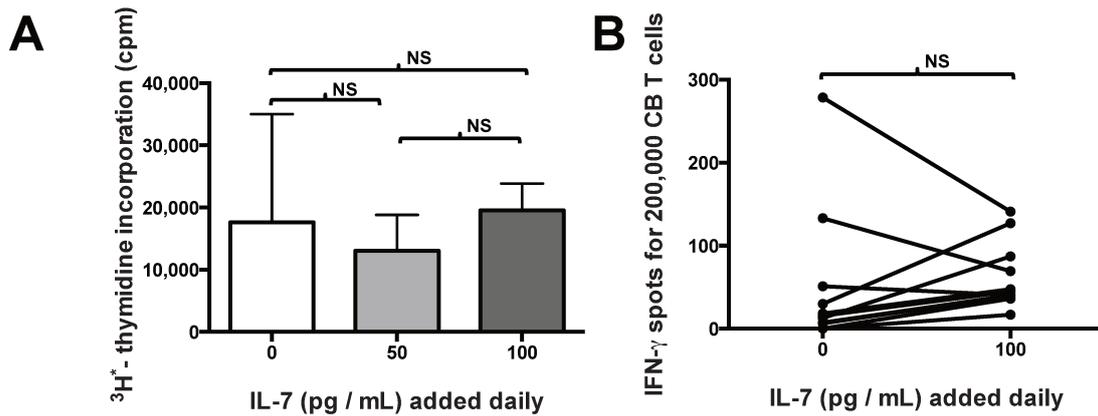


Figure 3. Potentiel d'alloréactivité limité des lymphocytes T de sang placentaire lors de l'ajout quotidien d'IL-7. Les cultures lymphocytaires mixtes ont été réalisées en triplicata avec des lymphocytes T cryopréservés et décongelés à la concentration de 1×10^5 cellules/puits et la stimulation allogénique est réalisée grâce à des monocytes d'adultes avec 4 à 6 incompatibilité HLA. En raison de la faible quantité de cellules T de SP disponibles, les cultures lymphocytaires mixtes ont été conduites en parallèle avec une seule concentration d'IL-7 (7 cultures avec de l'IL-7 à 50 pg/mL et 9 cultures avec de l'IL-7 à 100 pg/mL). **(A)** Incorporation de la thymidine tritiée (^3H -thymidine) après 5 jours de culture mixte. Les boîtes-à-moustaches ont la même signification que sur la figure 1. **(B)** ELISPOT d'Interferon- γ ELISPOT réalisé avec 2×10^5 cellules T viables de SP recueillis à la fin des cultures mixtes. Les résultats sont exprimés en nombre de spots CB T, à partir de cultures mixtes réalisés à partir de 11 SP différents, réalisées sur 5 jours sans et avec IL-7 à la dose de 100 pg/mL. NS signifie non significatif.

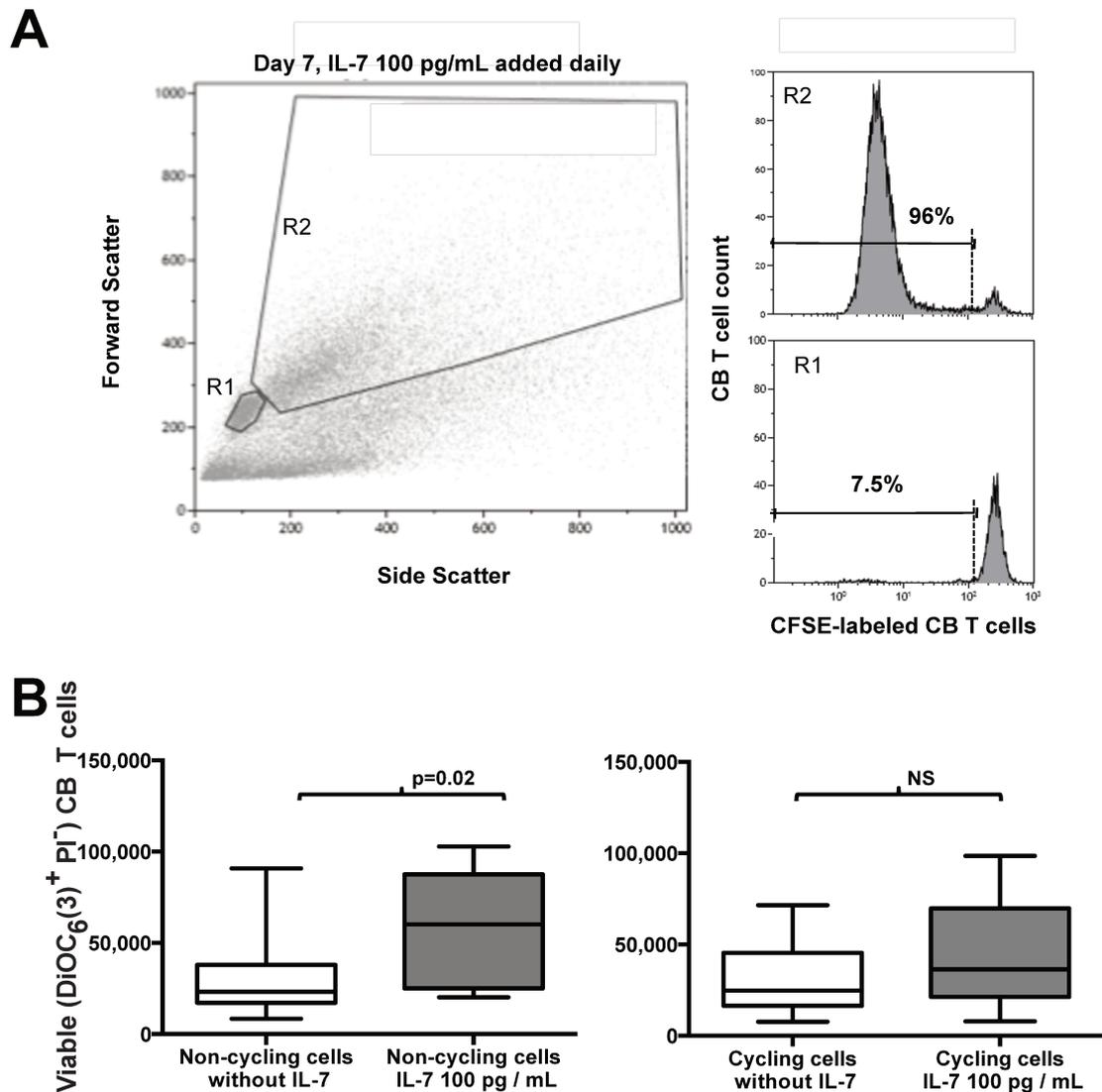


Figure 4. L'ajout quotidien d'IL-7 (100 pg/mL) recombinant permet d'améliorer la survie des lymphocytes T qui ne sont pas en cycle (non-cycling cells) sans potentialiser la réponse alloréactive dans les cultures lymphocytaires mixtes. Les cellules T sont cryopréservées et décongelées, marquées au CFSE, et mises en culture (1×10^5 cellules/puits) en présence de monocytes d'adulte avec 4 à 6 incompatibilités, en l'absence ou en la présence d'IL-7 à la dose de 100 pg/mL **(A)** Stratégie de sélection des lymphocytes T pour identifier les répondeurs des non-répondeurs. A gauche, histogramme biparamétrique taille/structure des cellules T après 7 jours de cultures en présence d'IL-7, la sélection R1 est réalisée pour retenir les petites cellules en excluant les cellules mortes et les débris cellulaires ; la sélection R2 est réalisée pour obtenir les lymphoblastes. A droite : histogrammes monoparamétriques représentant la dilution de fluorescence du CFSE, sélectionné sur les petits lymphocytes (R1) et les grands lymphoblastes R2. **(B)** Numération absolue des cellules non en cycles (non cycling cells, avec le CFSE non dilué) et des cellules en cycles (cycling cells, avec une forte dilution du CFSE) après 7 jours de cultures mixtes (n=13). Les boîtes-à-moustaches sont telle que décrites dans la figure 1 ; NS : non significatif.

Table 1: Analyses des associations entre les principales caractéristiques cliniques du sang placentaire et des donneurs et la viabilité des cellules T après 4 jours de culture sans supplémentation de cytokine exogène ou de facteurs de croissance.

	Median (range)	Corrélation avec la viabilité des cellules t de SP ^a			
		Spearman's ρ	<i>p</i> value	β^b	<i>p</i> value
Age gestationnel (semaines)	40 (37,8-42)	0,022	NS		NS
Poids du nouveau-né (kg)	3,49 (1,98-4,43)	-0,376	0,031	-0,471	0,023
Sexe du nouveau-né (M/F) ^c	12 / 22		NS		NS
Score d'Apgar	10 (2-10)	0,054	NS		NS
pH veineux au cordon	7,37 (7,14-7,48)	0,397	0,027	0,609	0,005
Niveau d'IL-7 plasmatique au cordon (pg/mL) ^d	0 (0-6,67)	0,335	NS		NS
ETR: cellules CD4 ⁺ CD31 ⁺ PTK7 ⁺ (%)	76,6 (61-85)	-0,59	NS		NS

SP= Sang placentaire; NS= Non significatif; ETR= émigrants thymiques récents

^a les lymphocytes T cryopréservés sont recueillis et mis en culture sans ajout de cytokine exogène ; les cellules viable (DiOC₆ (3)-positives et PI-négatives) sont décomptées après 4 jour

^b Analyse multivariée. Ne sont représentées que les valeurs significatives ($p < 0,05$)

^c Test de Mann-Whitney

^d Valeurs normales chez l'adultes sain: médiane à 2 pg/mL (range 0,6 to 7,7 pg/mL).

- **2.2 Travaux complémentaires**
 - **2.2.1 Influence des données gazométriques recueillies à la naissance**

Dans la littérature, il existe une association reconnue entre des niveaux abaissés de pH veineux ou artériel mesuré au cordon ombilical à la naissance et une morbi/mortalité élevée chez les nouveau-nés. Dans une méta-analyse récente publiée dans le British Medical Journal, Malin et al. rapporte une association extrêmement forte entre un pH artériel bas et la survenue de complications multiples chez l'enfant. Sur 51 articles totalisant plus de 480000 nouveau-nés, un pH artériel bas (défini comme étant au moins inférieur à 7,20), est associé avec une augmentation significative de la mortalité (OR=16,9, IC= 9,7 à 29,5), d'encéphalopathie ischémique (OR= 13,8, IC= 6,6 à 28.9), d'hémorragie intra-ventriculaire et de paralysie cérébrale (avec respectivement un OR à 2,9 et à 2,3). Les auteurs de cette étude rétrospective suggèrent de renseigner systématiquement cette donnée dans toutes les situations.¹⁸⁴ De fait, la mesure des pH veineux et du pH artériel sont des mesures réalisées systématiquement à la naissance. L'objectif de notre travail étant de renseigner tous les éléments attentatoires à la viabilité des cellules immunocompétentes présentes dans le cordon ombilical, nous avons voulu évaluer l'effet de cette acidité sur les lymphocytes T de sang placentaire.

Matériel et Méthodes :

-Sujets de la 1ère cohorte : les échantillons de sang de cordons ombilical ont été recueillis avec l'accord du comité d'éthique du centre hospitalo-universitaire de Lille (DC 2011-1288). Les échantillons de sang de cordons (entre 50 et 100 mL) ont été obtenus à partir de 39 nouveau-nés nés à terme à la maternité Jeanne de Flandre (entre 38 et 42 semaines de grossesse). Le recueil a été réalisé immédiatement après l'accouchement par voie basse et avant la délivrance. Les grossesses étaient des grossesses uniques sans complication. Les conditions de prélèvement étaient identiques à celles nécessaires pour une banque de sang placentaire. Les mères ont préalablement signé un consentement éclairé. Nous avons également recueillis les informations relatives à l'accouchement et au nouveau-né comme le pH veineux du cordon, le pH artériel, le sexe, le poids et la taille de l'enfant.

-Sujets de la 2^{ème} cohorte : nous avons également recueillis les données d'une cohorte contrôle de sang placentaire prélevé à la maternité de Besançon. Ces cordons ont alimentés la banque de sang placentaire, et ensuite ont été cédés pour réalisation d'une allogreffe de CSH. Nous avons voulu renseigner les données gazométriques disponibles pour les cordons banqués, ainsi que leur score d'Apgar. Nous avons récupéré les informations pour 45 cordons banqués. Ces informations nous ont été aimablement confiées par le Dr. Fabienne Pouthier de l'Etablissement Français du Sang de Besançon.

Résultats

Nous avons réalisé une culture de 30 échantillons de lymphocytes T CD3+ en l'absence de toute stimulation allogénique. La culture lymphocytaire en absence de stimulation allogénique, et en l'absence d'IL-7, Nous avons constaté une diminution rapide de la viabilité telle que décrite dans l'article précédent ; avec un maximum de mortalité observée dès J4, Après 7 jours de culture, l'ensemble des lymphocytes T CD3+ des échantillons de sang placentaire sont quasiment tous indétectables, les puits étant le siège d'une apoptose massive. Nous avons retrouvé une corrélation positive entre le nombre de lymphocytes T CD4+ survivants dans les puits à J4 et le pH veineux pris aux cordons à la naissance. Ces résultats sont superposables aux résultats de l'article précédent.

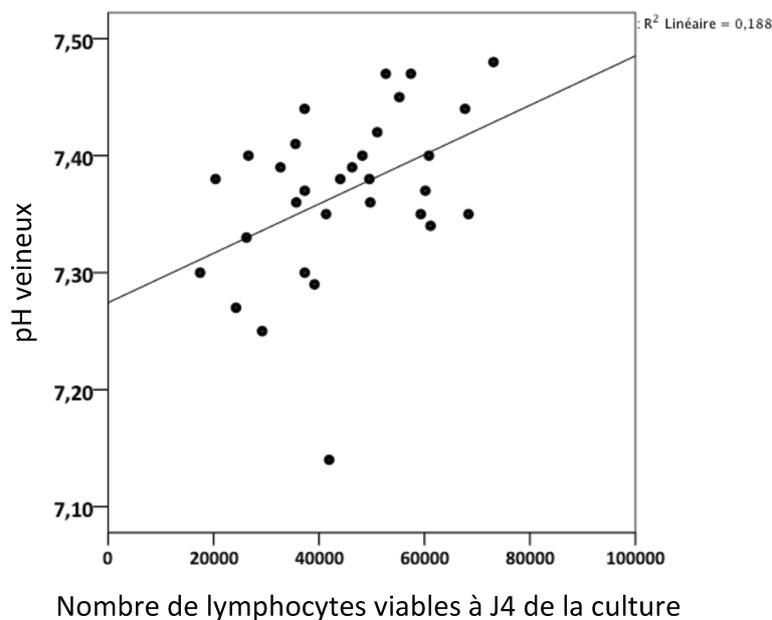


Figure n°1: Corrélation mesurée entre le pH veineux à la naissance et le nombre absolu de lymphocytes T viables présents dans les puits de culture (10^5 Lymphocytes T mis en culture à J0). La barre horizontale désigne la valeur seuil de pH à 7,2.

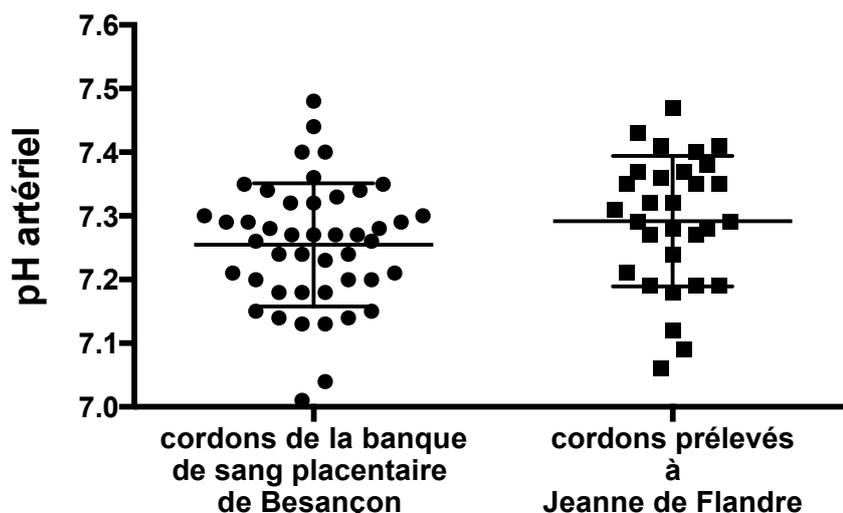


Figure n°2: Dot plot représentant la valeur moyenne et la déviation standard de la répartition de la valeur du pH artériel des 45 cordons prélevés dans la banque de sang placentaire de Besançon et de celles de 30 greffons de sang placentaire prélevés à Jeanne de Flandre.

Les valeurs de pH a été évaluées dans nos deux échantillons de sang placentaires et sont résumées par la figure n°2. Dans les 2 échantillons de population de sang placentaire testés 25% des cordons recueillis présentent un pH artériel inférieur à 7,20 et 10% des greffons prélevés présentent un pH inférieur à 7,13. Cette répartition est particulièrement basse.

Il existe une corrélation très forte entre le pH veineux et le pH artériel (R de Pearson à 0,718, $p < 0,0001$) ; ces 2 valeurs reflétant la même réalité biologique de l'acidité du sang placentaire. Les autres paramètres anthropométriques du nouveau-né sont principalement lié au volume de la poche (poids : rho de Spearman= 0,444 $p=0,03$ et taille : rho de Spearman= 0,556 $p=0,009$).

2.2.2 Glucocorticoïdes et sang placentaire

Introduction

L'environnement placentaire pourrait disposer d'une influence sur les lymphocytes T de sang placentaire. En effet, sur le plan endocrinien, la grossesse est marquée par l'augmentation progressive du taux de cortisol qui peut atteindre jusqu'à 60 ng/mL en fin de gestation (figure n°3). Les glucocorticoïdes (GC) sont reconnus pour être des régulateurs essentiels du développement et de l'homéostasie du système immunitaire inné et adaptatif. Au niveau cellulaire, les GC altèrent l'activation, la différenciation et la maturation de la plupart des

cellules immunitaires.^{185,186} Pendant la grossesse, la 11 β -HSD2 permet le rapide métabolisme du cortisol et de la corticostérone en leur formes bio-inactives : la cortisone et la 11-déhydrocorticostérone. Sa fonction est alors de préserver le fœtus contre les effets délétères des glucocorticoïdes.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ Cette enzyme est responsable d'un important gradient materno-fœtal de cortisol qui permet à la majorité du cortisol fœtal de provenir des surrénales fœtales. Il existe des caractéristiques particulières de la teneur du sang placentaire en GC. Dans une étude ancienne, Kojima rapporte des taux de cortisol placentaire de 89,1 ng/mL, de cortisone de 96,7 ng/mL évalué sur une série de 24 patients.¹⁹⁰ Plus récemment, dans un autre contexte, l'équipe de Huh et. Al retrouvait sur une série de 286 sangs placentaires, un taux de cortisol de 125ng/mL et un taux de cortisone de 88ng/mL.¹⁹¹ Chez l'adulte les taux observés habituellement sont 70 ng/mL et de 27,3 ng/mL respectivement dans une série de 107 patients.¹²⁷ Cette élévation de la cortisone au sein du sang placentaire serait due à une intense conversion du cortisol maternel grâce à la présence spécifique de la 11 β -HSD2 à la fois dans les reins, les poumons, les glandes surrénales, les gonades, le foie et le colon du fœtus¹⁹³ mais également dans le placenta.^{194,195}

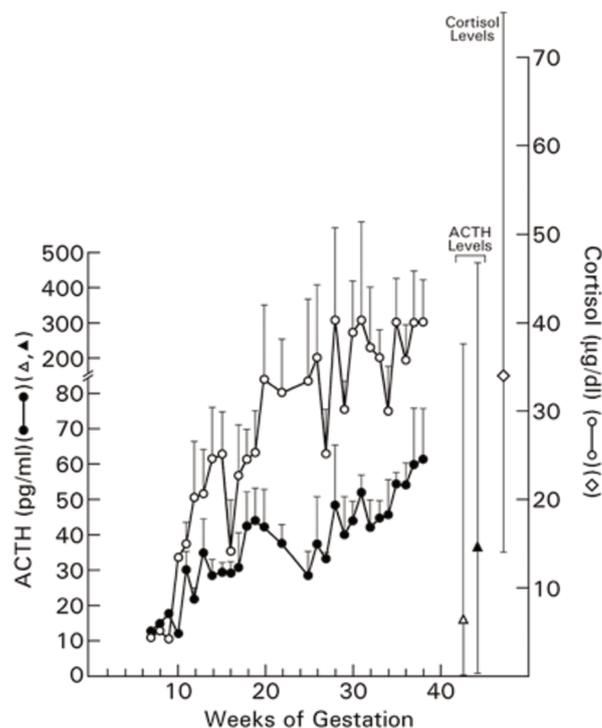


Figure n°3: Variation de la cortisolémie (o) et de la concentration en ACTH (•) au cours de la grossesse chez des sujets contrôle. D'après Carr et al.¹⁹⁶

Le travail de l'équipe de Zhang publié en 2005 permet d'éclairer l'action de la cortisone sur les lymphocytes T.¹⁹⁷ En effet, il est généralement admis que la cortisone est l'isoforme bio-inactive du cortisol. Ce travail démontre qu'il existe cependant une voie de métabolisation possible de la cortisone au sein des lymphocytes T. Dans le cytosol des lymphocytes T murin, l'enzyme 11 β -hydroxyglucostéroïde déshydrogénase de type 1 (β -HSD1) est capable de faire fonctionner la navette cortisol-cortisone dans le sens inverse de celui de la β -HSD2, l'équipe de Zhang démontre ainsi que les lymphocytes T ont la capacité de générer des GC ayant une activité biologique à partir des métabolites inactifs circulants ; cette activité permet de fournir une source appréciable de GC bioactif dans le plasma de sang placentaire. Dans ce travail, la cortisone présente les mêmes capacités que le cortisol en culture sur des lymphocytes T murins : un pouvoir immunosuppresseur puissant capable d'inhiber une réponse fonctionnelle de type Th1, après stimulation par anti-CD3, Ce défaut de réponse fonctionnelle est évalué par la production diminuée d'IL-2 et d'INF- γ . Ce défaut de fonctionnalité est annulé par l'ajout d'un inhibiteur de l'enzyme ou d'un inhibiteur du récepteur aux glucocorticoïdes : le RU 486,¹⁹⁷

Les conséquences en terme d'effet sur la viabilité et de la réponse allogénique d'une telle concentration de cortisone reste inconnues.

Matériels et Méthodes :

Ces éléments de la littérature, nous ont conduit à doser de manière systématique à la fois la cortisolémie, la cortisonémie, le taux de progestérone et le taux de vitamine D dans les échantillons de sang placentaires que nous mettions en culture. Le dosage de la cortisolémie, de la cortisonémie, a été réalisé au moyen d'une technique de spectrométrie de masse couplée à une chromatographie en phase gazeuse sur les sujets de la 1ère cohorte telle que définie en 2.2.1. En effet, au sein du laboratoire d'analyse du centre de biopathologie du CHRU de Lille, l'analyse courante de la cortisolémie est réalisée par immunochimiluminescence et il n'existait pas de méthode de dosage de la cortisonémie. Dans cette situation, le recours à la spectrométrie de masse a permis de doser les deux isoformes des glucocorticoïdes.

Résultats

Les taux de cortisone que nous avons dosés dans les 39 échantillons de sang placentaire sont très significativement supérieurs aux taux observés chez les adultes ($p=0,0002$, test t de Student; figure n°4). Cette différence n'est logiquement pas retrouvée dans l'analyse de la cortisolémie : le dosage de cortisol placentaire est superposable aux taux de cortisol des adultes témoins.

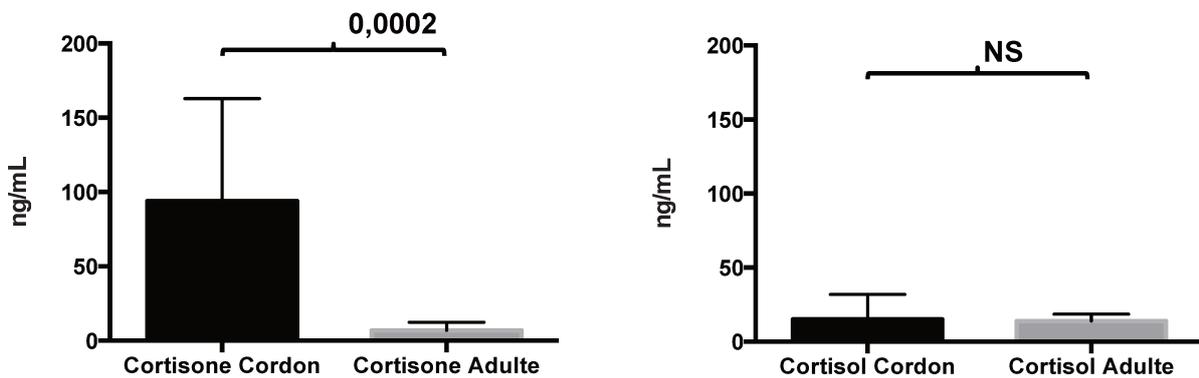


Figure n°4 : Diagramme en bâton, désignant la concentration moyenne (et sa déviation standard) en cortisone et en cortisol dans le sang placentaire de 39 cordons et de 10 adultes témoins.

Nous avons également dosé la Vitamine D et la progestérone présents dans le sang placentaire (figure n°5). Nous n'avons pas mis en évidence d'activité biologique concernant ces 2 éléments qui pouvaient éventuellement avoir un impact sur les cellules immunocompétentes présentes dans le sang placentaire. Leur répartition est homogène suivant les cordons.

• 2.3 Conclusion de ces travaux complémentaires

Il existe un seuil de pH artériel en néonatalogie défini à 7,20 en deçà duquel il existe une augmentation accrue de la morbidité et de la mortalité chez les nouveau-nés.^{198,199} Il nous a paru raisonnable d'interroger les données dont nous disposons afin de connaître qu'elle était la proportion de cordon qui ne respectaient pas ce seuil dans nos cohortes et dans une cohorte de cordons prélevés pour des collections de banque de SP. Dans les 2 cohortes de cordons dont nous disposons, le pH artériel est inférieur à 7,20 dans 25% des cas. Les

cellules présentes aux seins des différents greffons sont donc exposées dans au moins 25% des cas à une hypoxie transitoire. L'hypoxie, même transitoire, peut aboutir à une dérégulation de l'ARNm de l'IL-2.^{200,201} L'expression empêchée de l'IL-2 peut participer également au défaut de reconstitution immunologique en post-greffe. Ce taux de 25% est important et pourrait expliquer pour une partie la très grande sensibilité de certains greffons de sang placentaire. Il est difficile d'envisager de transposer directement ce seuil dans la perspective de greffe de CSH. Néanmoins, il serait facile de renseigner cette donnée toutes les banques de sang placentaire.

L'autre aspect de nos travaux complémentaires est la très forte concentration en cortisone retrouvée dans le plasma de nos échantillons de sang placentaire. Les taux retrouvés sont particulièrement hauts, et sont surtout vingt fois plus élevés que chez les adultes témoins (médiane de 94 ng/mL comparativement à 4 ng/mL retrouvée chez les adultes). Franchimont a publié en 2002 un travail qui explique les effets des glucocorticoïdes sur la fonction des lymphocytes T en régulant positivement le récepteur à l'IL-7 (IL-7R α).²⁰² Ce récepteur est inductible par les corticoïdes et permet aux lymphocytes T de sang de cordon d'être sensible à l'IL-7 et de résister à l'apoptose. Cet excès de GC dans le sang placentaire pourrait participer à un certain degré au conditionnement des lymphocytes T.

PERSPECTIVES

- **1. Place de l'allogreffe de sang placentaire dans le choix d'un donneur en 2014**

Lorsque qu'un donneur familial ou non-apparenté HLA-identique n'est pas disponible, le recours à la greffe de sang placentaire est aujourd'hui concurrencé par le recours à une greffe de CSH réalisée à partir d'un donneur haplo-identique avec une compatibilité HLA 6/12²⁰³.

Le travail de Brunstein publié dans Blood en 2011 réalise une analyse comparative d'allogreffes de CSH issues de donneurs non apparentés où 50 patients ont été greffés avec des doubles cordons et une compatibilité HLA de 4 à 6/6 tandis que les 50 autres ont bénéficié de donneurs haplo-identiques avec une compatibilité de 6/12. Dans les deux cas, le conditionnement était un conditionnement atténué avec une ICT de 2 Gy, de la fludarabine à la dose de 200mg/m², de l'Endoxan à la dose de 50mg/kg ainsi qu'une immunosuppression par mycophénolate mofétil dans les greffes avec double cordon. Pour les greffes avec un donneur haplo-identique, la fludarabine était réduite à 150 mg/m², l'Endoxan était administré à la dose de 14,5 mg/kg à J-6 et à J-5, et à nouveau à la dose de 50mg/kg/jour à J2 et J3 de la greffe. La probabilité de survie et la survie sans progression observées à 1 an étaient respectivement de 54% et de 46% après allogreffe double cordon (n=50). Pour les greffes avec donneur haplo-identique, ces chiffres étaient de 62% et de 48% (n=50). L'incidence cumulative de GVH aiguë de grade II-IV était de 40% après greffe double cordon et de 32% après greffe haplo-identique. L'incidence de la mortalité non-liée à la rechute (NRM) et l'incidence de la rechute étaient chiffrées à 24 et 31% après greffe double cordon et à 7% et 45% après allogreffe haplo-identique.

L'ensemble de ces résultats soulignent les difficultés mais aussi l'intérêt qu'offrent ces deux types de sources comme source alternative de cellules souches hématopoïétiques de donneur non-apparenté en l'absence de donneur géno-identique.¹⁰³

De nombreuses stratégies sont en cours d'investigation pour lever les obstacles spécifiques engendrés par ces greffes. Dans le cas de la greffe de sang placentaire, un des obstacles principaux à dépasser est celui du faible nombre de cellules souches qui aboutit malheureusement à un allongement de la prise de greffe et une augmentation du risque d'échec de la prise de greffe, particulièrement chez les patients adultes.

Les stratégies aujourd'hui proposées visent avant tout, mais pas exclusivement, à augmenter la dose cellulaire disponible. Ainsi, au côté de la double greffe de sang placentaire^{151,204} figurent l'injection directe intra-osseuse du greffon,²⁰⁵ la co-infusion avec l'unité de sang placentaire d'un greffon haplo-identique T déplété,^{206,207} l'addition systémique de cellules souches mésenchymateuses (MSCs)⁶¹ et enfin l'utilisation d'agents améliorant la domiciliation ou « homing » des cellules souches de sang placentaire dans la moelle.²⁰⁹

- **2. Quels sont les axes d'amélioration de la greffe de sang placentaire ?**

- **2.1 La greffe double cordon**

Les greffes de sang placentaire réalisées avec 2 cordons ont été décrites initialement en 2001 par l'équipe de Minnéapolis.²¹⁰ En 2009, Eurocord a publié des recommandations pour la réalisation d'une greffe avec double cordon.²¹¹ De manière synthétique, lorsqu'un greffon ne contient pas suffisamment de cellules nucléées totales ($<2,5 \cdot 10^7$ /kg avant la décongélation ou $<2,0 \cdot 10^7$ /kg après), il faut envisager une greffe double cordon pour obtenir un taux de CNT $> 3,0 \cdot 10^7$ /kg en cas d'une incompatibilité HLA. Ces greffes réalisées avec 2 unités de sang placentaire sont désormais utilisées en routine pour les patients adultes. Elles permettent d'atteindre la dose cellulaire adéquate et leur pratique a permis à une plus large population d'adulte d'accéder à une allogreffe de sang placentaire. Les greffes avec double cordon font preuve d'un taux de prise de greffe élevé (85 à 100%) avec un temps médian de sortie d'aplasie qui varie de 9 à 33 jours, en fonction du conditionnement et de l'utilisation

de facteur de croissance comme le G-CSF.^{88,100,212} Il n'y a pas de différence significative en terme de taux de prise de greffe entre le greffe simple et une greffe double cordon. Le travail mené par Verneris et al retrouve un taux de rechute plus faible après greffe double cordon.^{88,213} La mortalité non liée à la rechute est plus élevée chez les receveurs de greffe de sang placentaire avec 2 unités qu'avec les autres sources cellulaires (avec ou sans-mismatch) et survient principalement dans les 100 premiers jours post-greffe. Chez ces receveurs, l'analyse des facteurs de risque de la MNLr fait apparaître un risque plus élevé chez les patients présentant une reconstitution myéloïde retardée. La double greffe de sang de cordon n'a pour objectif que d'atteindre un seuil cellulaire suffisant : dans un travail publié tout récemment, l'équipe de Wagner, comparant 111 patients recevant une greffe double-cordon à 113 patients recevant une greffe simple-cordon, retrouvait une survie globale tout à fait comparable. Les greffes simple-cordons présentaient une meilleure reconstitution plaquettaire et une incidence cumulative de GVH aiguë plus faible.²¹⁴

▪ 2.2 Expansion des cellules souches de sang placentaire

• 2.2.1 Le ligand du récepteur de Notch et autres facteurs

Le retard significatif dans la récupération myéloïde est un obstacle majeur dans le développement de cette greffe qui pourrait être contourné par l'expansion préalable *ex vivo* des cellules souches et des progéniteurs contenus dans le greffon. L'expansion *ex vivo* des cellules souches hématopoïétiques issues de sang placentaire et des progéniteurs avant leur injection chez le receveur est actuellement en cours d'étude.

Une première approche consiste à réaliser des cultures de cellules CD34⁺ ou CD133⁺ en présence d'une collection de cytokines et de facteurs de croissance (comme le stem cell factor (SCF), la thrombopoïétine, le G-CSF et/ou le ligand du FMS-like tyrosine de type 3 (FLT3-L)).^{215,216} Le milieu de culture optimal n'est pas encore finalisé et d'autres équipes ont

démontré également l'intérêt de l'IL-3 et de l'IL-6.²¹⁷ L'équipe d'E. Shpall a publié un travail dans lequel les cellules CD34⁺ sont séparées en deux fractions distinctes : l'une (entre 40 et 60%) est cultivée en présence de SCF, de G-CSF, de TPO tandis que l'autre est greffée sans manipulation préalable concomitamment à la première après un conditionnement de type myéloablatif. La quantité de cellules nucléées totale est en médiane de $0,99 \times 10^7$ /kg. Le délai de récupération d'un taux de polynucléaires neutrophiles supérieur à 500/mm³ est de 28 jours (médiane, entre 15 et 49 jours) et de 106 jours pour la récupération plaquettaire (de 38 à 345 jours).²¹⁵

Basé sur cette même approche, un essai clinique de phase I/II a été réalisé avec une partie des cellules CD133⁺ isolées et mis en culture avec du SCF, du FLTR3-L, de l'IL6, de la TPO et en présence d'un chélateur du cuivre (TEPA).²¹⁸ Les cellules nucléées totales étaient multipliées par 219 (entre 2 et 260). Les deux parties ont été greffées en même temps à la dose médiane de $1,8 \times 10^7$ /kg. Dans cette étude, 9 des 10 patients ont présenté une prise de greffe avec une récupération de neutrophiles en 30 jours (16 à 46 jours) et une récupération plaquettaire de 48 jours (de 35 à 105 jours).

D'autres résultats très prometteurs ont été publiés par l'équipe de C Delaney de Seattle.²¹⁹ Il s'agit d'une expansion des cellules souches basées sur le ligand du récepteur Notch Delta1 en association avec du SCF, du FLT3, de la thrombopoïétine, de l'IL-3 et de l'IL6, permettant la génération *ex vivo* de cellules CD34⁺. Les résultats préliminaires publiés en 2010 démontrent à la fois la faisabilité et la sécurité d'une telle technique avec une réduction très significative du temps de la reconstitution myéloïde.²¹⁹ Les données plus récentes (non encore publiées) de cette étude qui porte désormais sur 17 patients retrouve un délai médian jusqu'à la récupération de plus de 500 PNN/mm³ de 11 jours. Les cellules ayant subi l'expansion préalable contribuent presque exclusivement à la reconstitution myéloïde

observée à la fin de la première semaine, démontrant ainsi une capacité accrue de cellules multipliées à réaliser une reconstitution myéloïde de qualité. Une prise de greffe est constatée chez 15 des 17 patients de cette étude avant le 21^{ème} jour, indépendamment de la persistance ou non des cellules multipliées *in vivo*.

▪ 2.2.2 Les cellules souches mésenchymateuses

Un autre travail rapporté par Robinson démontre la possibilité d'accroître fortement le nombre de cellules nucléées et de cellules CD34⁺ du cordon en utilisant une stratégie reposant sur une co-culture des cellules nucléées du sang placentaire avec des cellules souches mésenchymateuses.²²⁰ Basées sur ces résultats, un essai clinique a été débuté pour évaluer la faisabilité de la réalisation de cette co-culture de cellules mononuclées de sang placentaire soit avec des cellules souches mésenchymateuses d'un apparenté haplo-identique, soit avec des cellules souches mésenchymateuses commercialisées (NCT : 00498316). Les premiers résultats de cet essai apparaissent prometteurs. Ils sont similaires quelque soit la source des cellules souches mésenchymateuse, avec une prise de greffe rapide et une reconstitution du nombre de PNN en 15 jours, et du nombre de plaquette en 42 jours.²²¹ La prise de greffe à long terme est majoritairement le fait du cordon ayant subi l'expansion. L'ensemble de ces résultats a permis de justifier la mise en place d'un essai prospectif international comparant des greffes avec 2 unités à des greffes associant également deux unités mais dont l'une a bénéficié d'une expansion par co-culture avec des cellules souches mésenchymateuses.

▪ 2.2.3 Chélateur du cuivre et nicotinamide

Une autre étude, qui porte cette fois sur l'expansion réalisée à partir d'une seule unité de sang placentaire a été réalisée par l'entreprise Gamida Cell. Dans cette configuration, une unité de sang placentaire est fractionnée en deux parties dont l'une est cultivée avec des

facteurs de croissance conjugués avec un chélateur du cuivre, le tétraéthylpentamine.²²² Les résultats des analyses préliminaires révèlent une accélération de la prise de greffe et l'amélioration de la survie par rapport à des cohortes historiques.²¹⁸ Dans d'autres études précliniques réalisées par cette institution, les cellules CD34⁺ de sang placentaire cultivées *ex vivo* avec des facteurs de croissance (TPO, SC Factor, IL-6 et FLT-3) et la nicotinamide démontrent une capacité de migration accrue dans la moelle osseuse grâce à la liaison au stromal cell-derived factor 1 (sdf-1

- **2.3 Amélioration de la localisation dans la moelle osseuse.**

- **2.3.1 L'injection intra-osseuse du greffon**

Dans une étude de phase I/II, 32 patients affectés par une leucémie aigüe ont reçu une greffe de sang placentaire directement en intra-osseux.²⁰⁵ La reconstitution en PNN est alors en moyenne 23 jours (de 14 à 44 jours, n=28) et la reconstitution plaquettaire à 36 jours (de 16 à 64 jours). Cette stratégie de greffe intra-médullaire directe a été reprise par l'équipe d'Okada après un conditionnement atténué avec une très bonne tolérance et une durée médiane de récupération des neutrophiles de 17 jours.²²³

Une étude rétrospective récente a été menée par Eurocord, comparant des greffes réalisées à partir d'un cordon injecté par voie intra-médullaire directe à des greffes double-cordons classiques : l'injection intra-médullaire est associée à une meilleure prise de greffe à J30 (76% versus 62%, p=0,014), à une amélioration de la reconstitution plaquettaire à J180 (74% versus 64%, p=0,003). L'injection intra-médullaire était également associée à une diminution de la GVH aigüe.²²⁴

- **2.3.2 L'utilisation de la fucosyl-transférase-IV**

Une stratégie alternative pour raccourcir la durée de reconstitution myéloïde pourrait passer par la correction de la diminution de la fucosylation des molécules de surfaces des cellules

de sang placentaire. En effet, cette diminution empêcherait la relocalisation des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse.²²⁵ Les modèles pré-cliniques murins de xénogreffe développés par l'équipe de Robinson démontrent que les cellules CD34⁺ humaines traitées par de la fucosyltransférase-VI avant leur réintroduction chez la souris sont capables de réaliser une prise de greffe plus rapide et avec une plus grande quantité de cellules circulantes par rapport aux cellules CD34⁺ non traitées.²⁰⁹ Un essai clinique basé sur cette constatation est ouvert aux Etats-Unis : les receveurs reçoivent une double greffe de sang placentaire et une des deux unités greffées est fucosylée (NCT 01471067). Dans des essais futurs, la combinaison d'une expansion à une opération de fucosylation pourrait aboutir à une reconstitution hématologique très rapide.

- **2.3.3 La Prostaglandine E₂**

D'autres approches ont été développées pour améliorer le « homing » des cellules souches de sang placentaire et/ou des progéniteurs. L'équipe de North a identifié la prostaglandine E₂ (PGE₂) comme ayant la capacité d'augmenter la formation de cellules souches hématopoïétiques chez le Zebrafish.²²⁶ En effet la PGE₂ est capable d'améliorer le « homing », la survie et la prolifération.²²⁷ L'équipe de Cutler réalise actuellement un essai clinique qui évalue le prétraitement *ex vivo* d'une ou de 2 unités de sang placentaire par de la PGE avant leur perfusion (NCT 00890500). Ceci conduit à une reconstitution myéloïde rapide (PNN>500 à J17) et le greffon traité par PGE₂ correspond au greffon dominant.²²⁸

▪ 2.4 Immunothérapie et allogreffe de sang placentaire.

• 2.4.1 Expansion des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de virus à partir de sang placentaire

Les greffes de sang placentaire présentent une mortalité et une morbidité significative du fait de complications infectieuses virales par le cytomégalovirus (CMV), le virus d'Epstein-Barr (EBV) ou l'adénovirus (Ad.) Cette susceptibilité aux complications infectieuses virales est principalement attribuée à une immaturité et à l'inexpérience de cellules T de sang de cordon qui n'ont pas encore été confrontées à des antigènes. La présence de cellules T mémoires spécifiques de virus est essentielle dans les greffes de CSP, conférant au receveur une protection contre les infections virales, les réactivations et mêmes contre la rechute (immunité hétérologue). Dans le cas de greffes allogéniques de CSH avec donneurs adultes, il est possible d'avoir recours à la réinjection des lymphocytes du donneur (DLI) pour traiter des infections virales, mais ceci augmente en contrepartie le risque de GVHD.²²⁹⁻²³¹

Il est donc nécessaire d'évaluer la meilleure stratégie et son applicabilité chez le receveur d'une greffe de sang placentaire. Plusieurs obstacles doivent être contournés et en tout premier lieu le caractère naïf et le faible nombre de cellules T contenues dans le greffon.²³²

Différents chercheurs ont élaboré des protocoles pour développer des cellules T issues de sang placentaire spécifiques pour l'EBV et le CMV.^{233,234} L'équipe d'Elizabeth Shpall (Houston) et de Coleen Delaney (Seattle) ont développé un modèle reposant sur des cellules présentatrices d'antigènes issues de sang placentaire (cellules dendritiques et lignées cellulaires de lymphoblastes infectées par l'EBV) et transfectées avec un antigène Ad5f35pp65. Ces cellules présentatrices d'antigènes sont alors utilisées pour produire un grand nombre de lymphocytes T spécifiques du CMV, de l'Adénovirus et de l'EBV. Un essai clinique de phase I est actuellement conduit pour évaluer l'innocuité de l'injection

intraveineuse de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques du CMV et l'Adénovirus (NCT 01017705). Les lymphocytes T spécifiques des virus EBV, CMV et Adénovirus, sont générés à partir des 20% de la poche, les patients recevant par ailleurs 80% de l'unité de sang placentaire sans modification. A ce jour 10 patients ont été inclus et ont eu une prise de greffe avec un taux de PNN>500 en moins de 30 jours et un taux de plaquettes> 20 000 en moins de 60 jours. Sept d'entre eux ont bénéficié de l'immunothérapie à une période médiane de 83 jours post-greffe. Aucun patient n'a jusqu'à présent présenté un effet secondaire lié à cette perfusion ou développé de GHV. Tous sont restés indemnes d'infection ou de réactivation par CMV/EBV/Adénovirus pendant une période de 2 mois à 2 ans après l'allogreffe et pour un patient ayant présenté une réactivation précoce du CMV, le contrôle de l'infection a été obtenu par 2 perfusions de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques. Il Les clones de lymphocytes T présents dans les lymphocytes T perfusés mais absents chez le receveur avant la perfusion sont détectés plus d'un an après le traitement. Ainsi, le développement à partir du sang placentaire de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de ces virus est possible et peut faciliter le contrôle d'une infection ou d'une réactivation virale *in vivo*.

- **2.4.2 Le ciblage des antigènes leucémiques.**

Bien que le contrôle des complications virales soit une avancée incontestable dans la gestion des événements post-greffe de sang placentaire, avoir la capacité de traiter la rechute de l'hémopathie sous-jacente reste fondamental. Une des pistes novatrices repose sur le développement *ex vivo* de lymphocytes T exprimant à leur surface des récepteurs, exogènes (CAR : chimeric antigen receptors), spécifiques d'antigènes tumoraux pour le traitement des hémopathies malignes et certaines tumeurs solides.²³⁵ Un des avantages majeurs des CAR est leur reconnaissance des molécules natives par une voie indépendante du CMH.

Les syndromes lymphoprolifératifs B sont des cibles particulièrement intéressantes dans cette perspective étant donné qu'ils expriment de manière quasi-invariable le CD19, un antigène restreint aux lymphocytes B et absent de la surface des cellules souches hématopoïétiques. Comme démontrés dans plusieurs essais, les lymphocytes T exprimant un CAR transgénique spécifique pour le CD19 semblent être très efficace pour éliminer les tumeurs CD19⁺.^{236,237}

Récemment, cette approche a été adaptée dans le cadre de la greffe de sang placentaire grâce à l'expansion de lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer les CAR CD19 ou CD20. Afin de développer une stratégie reposant sur des lymphocytes T « bispécifiques » (dirigés à la fois contre des cibles virales et tumorales) pour des patients recevant une greffe de sang placentaire, l'équipe de Micklethwaite a transduit des lymphocytes T spécifiques de virus issus de sang périphérique et de sang placentaire avec un CAR spécifique du CD19. Ces lymphocytes T génétiquement modifiés s'avèrent capables d'exercer cette double activité anti-virale et anti-tumorale.²³¹

- **2.4.3 Les cellules NK dérivées de sang placentaire.**

Etant donné le concept prometteur de l'allogreffe isolée de cellules NK, plusieurs groupes ont tenté d'isoler les cellules NK du sang périphériques de donneurs sains.²³⁸ Dans le cadre de l'allogreffe de sang placentaire, l'isolement de cellules NK est extrêmement limité en raison du faible nombre de cellules disponibles. De nouvelles méthodes d'expansion *in vitro* des cellules NK sont envisagées. L'utilisation de cytokines, de cellules présentatrices d'antigènes artificielles, un dispositif de perméabilité cellulaire reposant sur un gaz (G-REX) ont été proposés. Les cellules NK en expansion grâce à ces différents agents conservent des propriétés cytolytiques contre de multiples cibles tumorales *in vitro* et, lorsqu'elles sont perfusées dans un modèle murin de LAM ou de LLC, présentent une activité anti-

leucémique. Ceci permet d'entrevoir la possibilité d'utiliser des cellules NK dérivées de sang placentaire pour prévenir la rechute.²³⁹ Beaucoup d'étapes restent bien sûr encore à franchir et notamment de démontrer que les cellules NK multipliées *ex vivo* conservent cette capacité anti-tumorale chez les receveurs sans engendrer de dommages collatéraux.

L'ensemble de ces perspectives n'est pas au même stade d'avancement et l'utilisation des cellules immunitaires de sang placentaire à visée thérapeutique est toujours à ses balbutiements. Ces approches n'en demeurent pas moins essentielles à développer et tout particulièrement l'immunothérapie qui permet d'envisager une amélioration considérable de la technique de l'allogreffe de sang placentaire dans le traitement des affections hématologiques malignes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Thomas ED. A history of haemopoietic cell transplantation. *Br J Haematol* 1999;105(2):330–9.
2. Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J* 1956;2(4993):626–7.
3. Thomas ED, Kasakura S, Cavins JA, Ferrebee JW. MARROW TRANSPLANTS IN LETHALLY IRRADIATED DOGS: THE EFFECT OF METHOTREXATE ON SURVIVAL OF THE HOST AND THE HOMOGRAFT. *Transplantation* 1963;1:571–4.
4. Van Bekkum DW, de Vries MJ, van der Waay D. Lesions characteristic of secondary disease in germfree heterologous radiation chimeras. *J Natl Cancer Inst* 1967;38(2):223–31.
5. Mathe G, Bernard J. [Trial of treatment of experimental leukemia by the graft of normal hematopoietic cells]. *Sangre (Barc)* 1959;30:789–801.
6. Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res* 1965;25(9):1525–31.
7. Bortin MM. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation* 1970;9(6):571–87.
8. Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol* 1958;20(1-4):156–66.
9. Van Rood JJ. The detection of transplantation antigens in leukocytes. *Semin Hematol* 1968;5(2):187–214.
10. Storb R, Raff RF, Appelbaum FR, et al. Comparison of fractionated to single-dose total body irradiation in conditioning canine littermates for DLA-identical marrow grafts. *Blood* 1989;74(3):1139–43.
11. Santos GW, Owens AH. Allogeneic marrow transplants in cyclophosphamide treated mice. *Transplant Proc* 1969;1(1):44–6.
12. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;273(5272):242–5.
13. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* 2007;7(5):340–52.
14. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* 2004;4(5):371–80.
15. Dausset J, Colombani J, Feingold N, Rapaport F. [A LEUKOCYTE GROUP SYSTEM AND ITS RELATIONS WITH HISTOCOMPATIBILITY]. *Nouv Rev Fr Hématologie* 1965;5:17–22.
16. Mullighan CG, Petersdorf EW. Genomic polymorphism and allogeneic hematopoietic transplantation outcome. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2006;12(1 Suppl 1):19–27.
17. Knudtzon S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 1974;43(3):357–61.
18. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(10):3828–32.

19. Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, et al. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med* 1983;309(22):1347–53.
20. Besinger WI. High-dose preparatory regimens. In: Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell Publishing Chichester; 2009. p. 316–32.
21. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998;91(3):756–63.
22. Blaise D, Vey N, Faucher C, Mohty M. Current status of reduced-intensity-conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007;92(4):533–41.
23. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2009;15(12):1628–33.
24. Giralt S, Estey E, Albitar M, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997;89(12):4531–6.
25. Soiffer RJ, Lerademacher J, Ho V, et al. Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Blood* 2011;117(25):6963–70.
26. Mohty M, Gaugler B. Advances in umbilical cord transplantation: the role of thymoglobulin/ATG in cord blood transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010;23(2):275–82.
27. Pascal LB, Mohty M, Ruggeri A, et al. Impact of rabbit ATG-containing myeloablative conditioning regimens on the outcome of patients undergoing unrelated single-unit cord blood transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2014;
28. Terasako K, Sato K, Sato M, et al. The effect of different ATG preparations on immune recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for severe aplastic anemia. *Hematol Amst Neth* 2010;15(3):165–9.
29. Freitas AA, Agnes F, Coutinho GC. Cellular competition modulates survival and selection of CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 1996;26(11):2640–9.
30. Heitger A, Neu N, Kern H, et al. Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA+) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997;90(2):850–7.
31. Roux E, Dumont-Girard F, Starobinski M, et al. Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood* 2000;96(6):2299–303.
32. Lewin SR, Heller G, Zhang L, et al. Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Blood* 2002;100(6):2235–42.

33. Miller JFAP. The golden anniversary of the thymus. *Nat Rev Immunol* 2011;11(7):489–95.
34. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* 2000;355(9218):1875–81.
35. Sprent J, Tough DF. Lymphocyte life-span and memory. *Science* 1994;265(5177):1395–400.
36. Kohler S, Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood* 2009;113(4):769–74.
37. Azevedo RI, Soares MVD, Barata JT, et al. IL-7 Sustains CD31 Expression in Human Naive CD4+ T Cells and Preferentially Expands the CD31+ Subset in a PI3K-Dependent Manner. *Blood* 2009;113(13):2999–3007.
38. Hakim FT, Memon SA, Cepeda R, et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest* 2005;115(4):930–9.
39. Rocha B, Vassalli P, Guy-Grand D. The extrathymic T-cell development pathway. *Immunol Today* 1992;13(11):449–54.
40. Mackall CL, Bare CV, Granger LA, Sharrow SO, Titus JA, Gress RE. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J Immunol Baltim Md* 1996;156(12):4609–16.
41. La Gruta NL, Driell IR, Gleeson PA. Peripheral T cell expansion in lymphopenic mice results in a restricted T cell repertoire. *Eur J Immunol* 2000;30(12):3380–6.
42. Dulude G, Roy DC, Perreault C. The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. *J Exp Med* 1999;189(8):1329–42.
43. Mackall CL, Granger L, Sheard MA, Cepeda R, Gress RE. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood* 1993;82(8):2585–94.
44. Jameson SC. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2002;2(8):547–56.
45. Hazenberg MD, Otto SA, de Pauw ES, et al. T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events. *Blood* 2002;99(9):3449–53.
46. Klein AK, Patel DD, Gooding ME, et al. T-Cell recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2001;7(8):454–66.
47. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, et al. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 1997;89(10):3700–7.
48. Guimond M, Veenstra RG, Grindler DJ, et al. Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2009;10(2):149–57.

49. Storek J, Joseph A, Espino G, et al. Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2001;98(13):3505–12.
50. Poulin J-F, Sylvestre M, Champagne P, et al. Evidence for adequate thymic function but impaired naive T-cell survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the absence of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2003;102(13):4600–7.
51. Nordøy T, Kolstad A, Endresen P, et al. Persistent changes in the immune system 4-10 years after ABMT. *Bone Marrow Transplant* 1999;24(8):873–8.
52. Kilpatrick RD, Rickabaugh T, Hultin LE, et al. Homeostasis of the naive CD4+ T cell compartment during aging. *J Immunol Baltim Md 1950* 2008;180(3):1499–507.
53. Dumont-Girard F, Roux E, van Lier RA, et al. Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants. *Blood* 1998;92(11):4464–71.
54. Banwell CM, Partington KM, Jenkinson EJ, Anderson G. Studies on the role of IL-7 presentation by mesenchymal fibroblasts during early thymocyte development. *Eur J Immunol* 2000;30(8):2125–9.
55. Jiang Q, Li WQ, Aiello FB, et al. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(4-5):513–33.
56. Takada K, Jameson SC. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol* 2009;9(12):823–32.
57. Krawczenko A, Kieda C, Duś D. The biological role and potential therapeutic application of interleukin 7. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005;53(6):518–25.
58. Palmer MJ, Mahajan VS, Trajman LC, Irvine DJ, Lauffenburger DA, Chen J. Interleukin-7 receptor signaling network: an integrated systems perspective. *Cell Mol Immunol* 2008;5(2):79–89.
59. Crawley JB, Willcocks J, Foxwell BM. Interleukin-7 induces T cell proliferation in the absence of Erk/MAP kinase activity. *Eur J Immunol* 1996;26(11):2717–23.
60. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity* 2008;29(6):848–62.
61. Wofford JA, Wieman HL, Jacobs SR, Zhao Y, Rathmell JC. IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood* 2008;111(4):2101–11.
62. Sinclair C, Saini M, van der Loeff IS, Sakaguchi S, Seddon B. The Long-Term Survival Potential of Mature T Lymphocytes Is Programmed During Development in the Thymus. *Sci Signal* 2011;4(199):ra77.
63. Burgering BMT. A brief introduction to FOXOlogy. *Oncogene* 2008;27(16):2258–62.
64. Kerdiles YM, Beisner DR, Tinoco R, et al. Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol* 2009;10(2):176–84.
65. Carlson CM, Endrizzi BT, Wu J, et al. Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* 2006;442(7100):299–302.

66. Kittipatarin C, Khaled AR. Interlinking interleukin-7. *Cytokine* 2007;39(1):75–83.
67. Goldrath AW, Bevan MJ. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity* 1999;11(2):183–90.
68. Boyman O, Létourneau S, Krieg C, Sprent J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur J Immunol* 2009;39(8):2088–94.
69. Hataye J, Moon JJ, Khoruts A, Reilly C, Jenkins MK. Naive and memory CD4+ T cell survival controlled by clonal abundance. *Science* 2006;312(5770):114–6.
70. Beq S, Rozlan S, Gautier D, et al. Injection of glycosylated recombinant simian IL-7 provokes rapid and massive T-cell homing in rhesus macaques. *Blood* 2009;114(4):816–25.
71. Thiant S, Yakoub-Agha I, Magro L, et al. Plasma levels of IL-7 and IL-15 in the first month after myeloablative BMT are predictive biomarkers of both acute GVHD and relapse. *Bone Marrow Transplant* 2010;45(10):1546–52.
72. Haluszczak C, Akue AD, Hamilton SE, et al. The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *J Exp Med* 2009;206(2):435–48.
73. Ende M, Ende N. Hematopoietic transplantation by means of fetal (cord) blood. A new method. *Va Med Mon* 1972;99(3):276–80.
74. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(9):4109–13.
75. Forestier F, Daffos F, Catherine N, Renard M, Andreux JP. Developmental hematopoiesis in normal human fetal blood. *Blood* 1991;77(11):2360–3.
76. Linch DC, Knott LJ, Rodeck CH, Huehns ER. Studies of circulating hemopoietic progenitor cells in human fetal blood. *Blood* 1982;59(5):976–9.
77. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321(17):1174–8.
78. Barker JN, Krepski TP, DeFor TE, Davies SM, Wagner JE, Weisdorf DJ. Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2002;8(5):257–60.
79. Gluckman E, Rocha V, Arcese W, et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol* 2004;32(4):397–407.
80. Barker JN, Scaradavou A, Stevens CE. Combined effect of total nucleated cell dose and HLA match on transplantation outcome in 1061 cord blood recipients with hematologic malignancies. *Blood* 2010;115(9):1843–9.
81. Welte K, Foeken L, Gluckman E, Navarrete C, Cord Blood Working Group of the World Marrow Donor Association. International exchange of cord blood units: the registry aspects. *Bone Marrow Transplant* 2010;45(5):825–31.
82. Barker JN, Byam C, Scaradavou A. How I treat: the selection and acquisition of unrelated cord blood grafts. *Blood* 2011;117(8):2332–9.

83. Gluckman E, Ruggeri A, Volt F, Cunha R, Boudjedir K, Rocha V. Milestones in umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol* 2011;154(4):441–7.
84. Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, et al. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med* 2001;344(24):1815–22.
85. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 1998;339(22):1565–77.
86. Ballen KK, Spitzer TR, Yeap BY, et al. Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2007;13(1):82–9.
87. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, Miller JS, Wagner JE. Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning. *Blood* 2003;102(5):1915–9.
88. Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ, et al. Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood* 2007;110(8):3064–70.
89. Chao NJ, Koh L-P, Long GD, et al. Adult recipients of umbilical cord blood transplants after nonmyeloablative preparative regimens. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2004;10(8):569–75.
90. Miyakoshi S, Yuji K, Kami M, et al. Successful engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for adult patients with advanced hematological diseases. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2004;10(11):3586–92.
91. Talvensaaari K, Clave E, Douay C, et al. A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood* 2002;99(4):1458–64.
92. Moretta A, Maccario R, Fagioli F, et al. Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp Hematol* 2001;29(3):371–9.
93. Nihues T, Rocha V, Filipovich AH, et al. Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children -- a Eurocord analysis. *Br J Haematol* 2001;114(1):42–8.
94. Locatelli F, Maccario R, Comoli P, et al. Hematopoietic and immune recovery after transplantation of cord blood progenitor cells in children. *Bone Marrow Transplant* 1996;18(6):1095–101.
95. Szabolcs P, Niedzwiecki D. Immune reconstitution after unrelated cord blood transplantation. *Cytotherapy* 2007;9(2):111–22.
96. Rocha V, Gluckman E, Eurocord and European Blood and Marrow Transplant Group. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2006;12(1 Suppl 1):34–41.
97. Rocha V, Labopin M, Sanz G, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med* 2004;351(22):2276–85.

98. Parody R, Martino R, Rovira M, et al. Severe infections after unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: comparison of cord blood transplantation with peripheral blood and bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2006;12(7):734–48.
99. Barker JN, Hough RE, van Burik J-AH, et al. Serious infections after unrelated donor transplantation in 136 children: impact of stem cell source. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2005;11(5):362–70.
100. Brunstein CG, Gutman JA, Weisdorf DJ, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood* 2010;116(22):4693–9.
101. Kumar P, Defor TE, Brunstein C, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult acute lymphocytic leukemia: impact of donor source on survival. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2008;14(12):1394–400.
102. Ringdén O, Okas M, Uhlin M, Uzunel M, Remberger M, Mattsson J. Unrelated cord blood and mismatched unrelated volunteer donor transplants, two alternatives in patients who lack an HLA-identical donor. *Bone Marrow Transplant* 2008;42(10):643–8.
103. Brunstein CG, Fuchs EJ, Carter SL, et al. Alternative donor transplantation after reduced intensity conditioning: results of parallel phase 2 trials using partially HLA-mismatched related bone marrow or unrelated double umbilical cord blood grafts. *Blood* 2011;118(2):282–8.
104. Ma DD, Varga DE, Biggs JC. Donor marrow progenitors (CFU-Mix, BFU-E and CFU-GM) and haemopoietic engraftment following HLA matched sibling bone marrow transplantation. *Leuk Res* 1987;11(2):141–7.
105. Douay L, Gorin NC, Mary JY, et al. Recovery of CFU-GM from cryopreserved marrow and in vivo evaluation after autologous bone marrow transplantation are predictive of engraftment. *Exp Hematol* 1986;14(5):358–65.
106. Faille A, Maraninchi D, Gluckman E, et al. Granulocyte progenitor compartments after allogeneic bone marrow grafts. *Scand J Haematol* 1981;26(3):202–14.
107. Spitzer G, Verma DS, Fisher R, et al. The myeloid progenitor cell--its value in predicting hematopoietic recovery after autologous bone marrow transplantation. *Blood* 1980;55(2):317–23.
108. Jones RJ, Sharkis SJ, Celano P, Colvin OM, Rowley SD, Sensenbrenner LL. Progenitor cell assays predict hematopoietic reconstitution after syngeneic transplantation in mice. *Blood* 1987;70(4):1186–92.
109. Rowley SD, Zuehlis M, Braine HG, et al. CFU-GM content of bone marrow graft correlates with time to hematologic reconstitution following autologous bone marrow transplantation with 4-hydroperoxycyclophosphamide-purged bone marrow. *Blood* 1987;70(1):271–5.
110. Brandt J, Baird N, Lu L, Srour E, Hoffman R. Characterization of a human hematopoietic progenitor cell capable of forming blast cell containing colonies in vitro. *J Clin Invest* 1988;82(3):1017–27.

111. Nakahata T, Ogawa M. Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. *J Clin Invest* 1982;70(6):1324–8.
112. Leary AG, Ogawa M, Strauss LC, Civin CI. Single cell origin of multilineage colonies in culture. Evidence that differentiation of multipotent progenitors and restriction of proliferative potential of monopotent progenitors are stochastic processes. *J Clin Invest* 1984;74(6):2193–7.
113. Williams DE, Boswell HS, Floyd AD, Broxmeyer HE. Pluripotential hematopoietic stem cells in post-5-fluorouracil murine bone marrow express the Thy-1 antigen. *J Immunol Baltim Md* 1950 1985;135(2):1004–11.
114. Hamza NS, Lisgaris M, Yadavalli G, et al. Kinetics of myeloid and lymphocyte recovery and infectious complications after unrelated umbilical cord blood versus HLA-matched unrelated donor allogeneic transplantation in adults. *Br J Haematol* 2004;124(4):488–98.
115. Broxmeyer HE, Cooper S. High-efficiency recovery of immature haematopoietic progenitor cells with extensive proliferative capacity from human cord blood cryopreserved for 10 years. *Clin Exp Immunol* 1997;107 Suppl 1:45–53.
116. Broxmeyer HE, Srour EF, Hangoc G, Cooper S, Anderson SA, Bodine DM. High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(2):645–50.
117. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, 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* 1998;339(17):1186–93.
118. Naderi N, Pourfathollah AA, Alimoghaddam K, Moazzeni SM. Cord blood dendritic cells prevent the differentiation of naïve T-helper cells towards Th1 irrespective of their subtype. *Clin Exp Med* 2009;9(1):29–36.
119. Brahmi Z, Hommel-Berrey G, Smith F, Thomson B. NK cells recover early and mediate cytotoxicity via perforin/granzyme and Fas/FasL pathways in umbilical cord blood recipients. *Hum Immunol* 2001;62(8):782–90.
120. Godfrey WR, Spoden DJ, Ge YG, et al. Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* 2005;105(2):750–8.
121. Theilgaard-Mönch K, Raaschou-Jensen K, Palm H, et al. Flow cytometric assessment of lymphocyte subsets, lymphoid progenitors, and hematopoietic stem cells in allogeneic stem cell grafts. *Bone Marrow Transplant* 2001;28(11):1073–82.
122. Morita CT, Parker CM, Brenner MB, Band H. TCR usage and functional capabilities of human gamma delta T cells at birth. *J Immunol Baltim Md* 1950 1994;153(9):3979–88.
123. Takahata Y, Nomura A, Takada H, et al. CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp Hematol* 2004;32(7):622–9.
124. Mold JE, Michaëlsson J, Burt TD, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* 2008;322(5907):1562–5.

125. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998;396(6712):690–5.
126. Junge S, Kloeckener-Gruissem B, Zufferey R, et al. Correlation between recent thymic emigrants and CD31+ (PECAM-1) CD4+ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur J Immunol* 2007;37(11):3270–80.
127. Szabolcs P, Park K-D, Reese M, Marti L, Broadwater G, Kurtzberg J. Coexistent naïve phenotype and higher cycling rate of cord blood T cells as compared to adult peripheral blood. *Exp Hematol* 2003;31(8):708–14.
128. Risdon G, Gaddy J, Horie M, Broxmeyer HE. Alloantigen priming induces a state of unresponsiveness in human umbilical cord blood T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(6):2413–7.
129. Hagihara M, Chargui J, Gansuud B, et al. Umbilical cord blood T lymphocytes are induced to apoptosis after being allo-primed in vitro. *Bone Marrow Transplant* 1999;24(11):1229–33.
130. El Ghalbzouri A, Drénou B, Blancheteau V, et al. An in vitro model of allogeneic stimulation of cord blood: Induction of Fas independent apoptosis. *Hum Immunol* 1999;60(7):598–607.
131. Cantó E, Rodriguez-Sanchez JL, Vidal S. Distinctive response of naïve lymphocytes from cord blood to primary activation via TCR. *J Leukoc Biol* 2003;74(6):998–1007.
132. Lin S-J, Lee C-C, Cheng P-J, See L-C, Kuo M-L. Susceptibility to Fas and tumor necrosis factor-alpha receptor mediated apoptosis of anti-CD3/anti-CD28-activated umbilical cord blood T cells. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol* 2009;20(4):392–8.
133. Chipeta J, Komeda Y, Zhang XL, Sakurai M, Azuma E. Intracellular cytokine profiles of cord and adult blood lymphocytes. *Blood* 1999;93(3):1120–2.
134. Kadereit S, Mohammad SF, Miller RE, et al. Reduced NFAT1 protein expression in human umbilical cord blood T lymphocytes. *Blood* 1999;94(9):3101–7.
135. Weitzel RP, Lesniewski ML, Haviernik P, et al. microRNA 184 regulates expression of NFAT1 in umbilical cord blood CD4+ T cells. *Blood* 2009;113(26):6648–57.
136. Kaminski BA, Kadereit S, Miller RE, et al. Reduced expression of NFAT-associated genes in UCB versus adult CD4+ T lymphocytes during primary stimulation. *Blood* 2003;102(13):4608–17.
137. Lesniewski ML, Haviernik P, Weitzel RP, et al. Regulation of IL-2 expression by transcription factor BACH2 in umbilical cord blood CD4+ T cells. *Leukemia* 2008;22(12):2201–7.
138. Jullien P, Cron RQ, Dabbagh K, et al. Decreased CD154 expression by neonatal CD4+ T cells is due to limitations in both proximal and distal events of T cell activation. *Int Immunol* 2003;15(12):1461–72.
139. Matthews NC, Wadhwa M, Bird C, Borrás FE, Navarrete CV. Sustained expression of CD154 (CD40L) and proinflammatory cytokine production by alloantigen-stimulated umbilical cord blood T cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2000;164(12):6206–12.

140. Bofill M, Almirall E, McQuaid A, et al. Differential expression of the cytokine receptors for human interleukin (IL)-12 and IL-18 on lymphocytes of both CD45RA and CD45RO phenotype from tonsils, cord and adult peripheral blood. *Clin Exp Immunol* 2004;138(3):460–5.
141. White GP, Watt PM, Holt BJ, Holt PG. Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO- T cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 2002;168(6):2820–7.
142. Chen L, Cohen AC, Lewis DB. Impaired allogeneic activation and T-helper 1 differentiation of human cord blood naive CD4 T cells. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2006;12(2):160–71.
143. Merindol N, Charrier E, Duval M, Soudeyans H. Complementary and contrasting roles of NK cells and T cells in pediatric umbilical cord blood transplantation. *J Leukoc Biol* 2011;90(1):49–60.
144. Mold JE, Venkatasubrahmanyam S, Burt TD, et al. Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans. *Science* 2010;330(6011):1695–9.
145. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia* 2007;21(7):1387–94.
146. Bacigalupo A, Lamparelli T, Bruzzi P, et al. Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). *Blood* 2001;98(10):2942–7.
147. Gooley TA, Leisenring W, Crowley J, Storer BE. Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representations of old estimators. *Stat Med* 1999;18(6):695–706.
148. Cox DR. Regression models and life-tables. *J R Stat Soc Ser B Methodol* 1972;187–220.
149. Sanz J, Boluda JCH, Martín C, et al. Single-unit umbilical cord blood transplantation from unrelated donors in patients with hematological malignancy using busulfan, thiotepa, fludarabine and ATG as myeloablative conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant* 2012;47(10):1287–93.
150. Ciurea SO, Saliba RM, Hamerschlak N, et al. Fludarabine, melphalan, thiotepa and anti-thymocyte globulin conditioning for unrelated cord blood transplant. *Leuk Lymphoma* 2012;53(5):901–6.
151. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 2005;105(3):1343–7.
152. Mohty M, Labopin M, Balère ML, 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 Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. *Leukemia* 2010;24(11):1867–74.

153. Blaise D, Tabrizi R, Boher J-M, et al. Randomized study of 2 reduced-intensity conditioning strategies for human leukocyte antigen-matched, related allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: prospective clinical and socioeconomic evaluation. *Cancer* 2013;119(3):602–11.
154. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, et al. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2009;10(9):855–64.
155. Soiffer RJ, Lerademacher J, Ho V, et al. Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Blood* 2011;117(25):6963–70.
156. Bacigalupo A, Lamparelli T, Barisione G, et al. Thymoglobulin prevents chronic graft-versus-host disease, chronic lung dysfunction, and late transplant-related mortality: long-term follow-up of a randomized trial in patients undergoing unrelated donor transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2006;12(5):560–5.
157. Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM, Rubinstein P. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood* 2000;96(8):2717–22.
158. Gluckman E, Rocha V, Chevret S. Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Rev Clin Exp Hematol* 2001;5(2):87–99.
159. Mohty M, Bay J-O, Faucher C, et al. Graft-versus-host disease following allogeneic transplantation from HLA-identical sibling with antithymocyte globulin-based reduced-intensity preparative regimen. *Blood* 2003;102(2):470–6.
160. Waller EK, Langston AA, Lonial S, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-thymocyte globulin in recipients of partially HLA-matched blood hematopoietic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2003;9(7):460–71.
161. Bacigalupo A, Lamparelli T, Milone G, et al. Pre-emptive treatment of acute GVHD: a randomized multicenter trial of rabbit anti-thymocyte globulin, given on day+7 after alternative donor transplants. *Bone Marrow Transplant* 2010;45(2):385–91.
162. Ruggeri A, Tucunduva L, Blaise D, et al. Impact Of Rabbit Anti-Thymocyte Globulin-Containing Reduced-Intensity Conditioning Regimens On Outcomes Of Adults Undergoing Unrelated Cord Blood Transplantation For Hematological Malignancies. *Blood* 2013;122(21):412–412.
163. Lindemans CA, Chiesa R, Amrolia PJ, et al. Impact of thymoglobulin prior to pediatric unrelated umbilical cord blood transplantation on immune reconstitution and clinical outcome. *Blood* 2014;123(1):126–32.
164. Komanduri KV, St John LS, de Lima M, et al. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood* 2007;110(13):4543–51.

165. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18(4):295–304.
166. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* 1980;69(2):204–17.
167. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004;351(22):2265–75.
168. Revenu T, Trifan V, Nacu L, et al. Collection, isolation and characterization of the stem cells of umbilical cord blood. *Romanian J Morphol Embryol Rev Roum Morphol Embryol* 2013;54(2):291–7.
169. Kielsen K, Jordan KK, Uhlving HH, et al. T cell reconstitution in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: Prognostic Significance of Plasma Interleukin-7. *Scand J Immunol* 2014;n/a – n/a.
170. Haines CJ, Giffon TD, Lu L-S, et al. Human CD4+ T cell recent thymic emigrants are identified by protein tyrosine kinase 7 and have reduced immune function. *J Exp Med* 2009;206(2):275–85.
171. Hassan J, Reen DJ. Human Recent Thymic Emigrants—Identification, Expansion, And Survival Characteristics. *J Immunol* 2001;167(4):1970–6.
172. Mackall CL, Fry TJ, Gress RE. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol* 2011;11(5):330–42.
173. Sportès C, Babb RR, Krumlauf MC, et al. Phase I Study of Recombinant Human Interleukin-7 Administration in Subjects with Refractory Malignancy. *Clin Cancer Res* 2010;16(2):727–35.
174. Perales M-A, Goldberg JD, Yuan J, et al. Recombinant human interleukin-7 (CYT107) promotes T-cell recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2012;120(24):4882–91.
175. Hassan J, Reen DJ. IL-7 promotes the survival and maturation but not differentiation of human post-thymic CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1998;28(10):3057–65.
176. Davis CC, Marti LC, Sempowski GD, Jeyaraj DA, Szabolcs P. Interleukin-7 Permits Th1/Tc1 Maturation and Promotes Ex vivo Expansion of Cord Blood T Cells: A Critical Step toward Adoptive Immunotherapy after Cord Blood Transplantation. *Cancer Res* 2010;70(13):5249–58.
177. Heninger A-K, Theil A, Wilhelm C, et al. IL-7 abrogates suppressive activity of human CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells and allows expansion of alloreactive and autoreactive T cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2012;189(12):5649–58.
178. Sinha ML, Fry TJ, Fowler DH, Miller G, Mackall CL. Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. *Blood* 2002;100(7):2642–9.
179. Dean RM, Fry T, Mackall C, et al. Association of Serum Interleukin-7 Levels With the Development of Acute Graft-Versus-Host Disease. *J Clin Oncol* 2008;26(35):5735–41.

180. Lewis DB, Haines C, Ross D. Protein tyrosine kinase 7: a novel surface marker for human recent thymic emigrants with potential clinical utility. *J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc* 2011;31 Suppl 1:S72–81.
181. Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, et al. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med* 2002;195(6):789–94.
182. Swainson L, Kinet S, Mongellaz C, Sourisseau M, Henriques T, Taylor N. IL-7-induced proliferation of recent thymic emigrants requires activation of the PI3K pathway. *Blood* 2007;109(3):1034–42.
183. Kimura MY, Pobezinsky LA, Guinter TI, et al. IL-7 signaling must be intermittent, not continuous, during CD8⁺ T cell homeostasis to promote cell survival instead of cell death. *Nat Immunol* 2013;14(2):143–51.
184. Malin GL, Morris RK, Khan KS. Strength of association between umbilical cord pH and perinatal and long term outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2010;340:c1471.
185. Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS. Glucocorticoids in T cell development and function*. *Annu Rev Immunol* 2000;18:309–45.
186. Davis TE, Kis-Toth K, Szanto A, Tsokos GC. Glucocorticoids suppress T cell function by up-regulating microRNA-98. *Arthritis Rheum* 2013;65(7):1882–90.
187. McTernan CL, Draper N, Nicholson H, et al. Reduced placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 mRNA levels in human pregnancies complicated by intrauterine growth restriction: an analysis of possible mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(10):4979–83.
188. Murphy VE, Clifton VL. Alterations in human placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 with gestational age and labour. *Placenta* 2003;24(7):739–44.
189. Hirasawa G, Takeyama J, Sasano H, et al. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(3):1306–9.
190. Kojima S, Yanaihara T, Nakayama T. Serum steroid levels in children at birth and in early neonatal period. *Am J Obstet Gynecol* 1981;140(8):961–5.
191. Huh SY, Andrew R, Rich-Edwards JW, Kleinman KP, Seckl JR, Gillman MW. Association between umbilical cord glucocorticoids and blood pressure at age 3 years. *BMC Med* 2008;6:25.
192. Nomura S, Fujitaka M, Jinno K, Sakura N, Ueda K. Clinical significance of cortisone and cortisone/cortisol ratio in evaluating children with adrenal diseases. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 1996;256(1):1–11.
193. Stewart PM, Murry BA, Mason JI. Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human fetal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78(6):1529–32.

194. Stewart PM, Rogerson FM, Mason JI. Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid and activity in human placenta and fetal membranes: its relationship to birth weight and putative role in fetal adrenal steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(3):885–90.
195. Krozowski Z, MaGuire JA, Stein-Oakley AN, Dowling J, Smith RE, Andrews RK. Immunohistochemical localization of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme in human kidney and placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(7):2203–9.
196. Carr BR, Parker CR, Madden JD, MacDonald PC, Porter JC. Maternal plasma adrenocorticotropin and cortisol relationships throughout human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1981;139(4):416–22.
197. Zhang TY, Ding X, Daynes RA. The expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I by lymphocytes provides a novel means for intracrine regulation of glucocorticoid activities. *J Immunol Baltim Md* 1950 2005;174(2):879–89.
198. Kato EH, Yamada H, Matsumoto Y, Hattori S, Makinoda S, Fujimoto S. Relation between perinatal factors and outcome of very low birth weight infants. *J Perinat Med* 1996;24(6):677–86.
199. Casey BM, Goldaber KG, McIntire DD, Leveno KJ. Outcomes among term infants when two-hour postnatal pH is compared with pH at delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184(3):447–50.
200. Zuckerberg AL, Goldberg LI, Lederman HM. Effects of hypoxia on interleukin-2 mRNA expression by T lymphocytes. *Crit Care Med* 1994;22(2):197–203.
201. Gaber T, Tran CL, Schellmann S, et al. Pathophysiological hypoxia affects the redox state and IL-2 signalling of human CD4+ T cells and concomitantly impairs survival and proliferation. *Eur J Immunol* 2013;43(6):1588–97.
202. Franchimont D, Galon J, Vacchio MS, et al. Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor alpha. *J Immunol Baltim Md* 1950 2002;168(5):2212–8.
203. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2008;14(6):641–50.
204. Dahlberg A, Delaney C, Bernstein ID. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 2011;117(23):6083–90.
205. Frassoni F, Gualandi F, Podestà M, et al. Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *Lancet Oncol* 2008;9(9):831–9.
206. Fernández MN, Regidor C, Cabrera R, et al. Unrelated umbilical cord blood transplants in adults: Early recovery of neutrophils by supportive co-transplantation of a low number of highly purified peripheral blood CD34+ cells from an HLA-haploidentical donor. *Exp Hematol* 2003;31(6):535–44.
207. Bautista G, Cabrera JR, Regidor C, et al. Cord blood transplants supported by co-infusion of mobilized hematopoietic stem cells from a third-party donor. *Bone Marrow Transplant* 2009;43(5):365–73.

208. Macmillan ML, Blazar BR, DeFor TE, Wagner JE. Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone Marrow Transplant* 2009;43(6):447–54.
209. Robinson SN, Simmons PJ, Thomas MW, et al. Ex vivo fucosylation improves human cord blood engraftment in NOD-SCID IL-2R γ (null) mice. *Exp Hematol* 2012;40(6):445–56.
210. Barker JN, Weisdorf DJ, Wagner JE. Creation of a double chimera after the transplantation of umbilical-cord blood from two partially matched unrelated donors. *N Engl J Med* 2001;344(24):1870–1.
211. Danby R, Rocha V. Improving engraftment and immune reconstitution in umbilical cord blood transplantation. *Front Immunol* 2014;5:68.
212. Somers JAE, Brand A, van Hensbergen Y, et al. Double umbilical cord blood transplantation: a study of early engraftment kinetics in leukocyte subsets using HLA-specific monoclonal antibodies. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2013;19(2):266–73.
213. Verneris MR, Brunstein CG, Barker J, et al. Relapse risk after umbilical cord blood transplantation: enhanced graft-versus-leukemia effect in recipients of 2 units. *Blood* 2009;114(19):4293–9.
214. Wagner JE, Eapen M, Carter S, et al. One-unit versus two-unit cord-blood transplantation for hematologic cancers. *N Engl J Med* 2014;371(18):1685–94.
215. Shpall EJ, Quinones R, Giller R, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2002;8(7):368–76.
216. Levac K, Karanu F, Bhatia M. Identification of growth factor conditions that reduce ex vivo cord blood progenitor expansion but do not alter human repopulating cell function in vivo. *Haematologica* 2005;90(2):166–72.
217. Bordeaux-Rego P, Luzo A, Costa FF, Olalla Saad ST, Crosara-Alberto DP. Both interleukin-3 and interleukin-6 are necessary for better ex vivo expansion of CD133+ cells from umbilical cord blood. *Stem Cells Dev* 2010;19(3):413–22.
218. De Lima M, McMannis J, Gee A, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant* 2008;41(9):771–8.
219. Delaney C, Heimfeld S, Brashem-Stein C, Voorhies H, Manger RL, Bernstein ID. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med* 2010;16(2):232–6.
220. Robinson SN, Ng J, Niu T, et al. Superior ex vivo cord blood expansion following coculture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2006;37(4):359–66.
221. De Lima M, McNiece I, Robinson SN, et al. Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *N Engl J Med* 2012;367(24):2305–15.

222. Peled T, Mandel J, Goudsmid RN, et al. Pre-clinical development of cord blood-derived progenitor cell graft expanded ex vivo with cytokines and the polyamine copper chelator tetraethylenepentamine. *Cytotherapy* 2004;6(4):344–55.
223. Okada M, Yoshihara S, Taniguchi K, et al. Intrabone marrow transplantation of unwashed cord blood using reduced-intensity conditioning treatment: a phase I study. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2012;18(4):633–9.
224. Rocha V, Labopin M, Ruggeri A, et al. Unrelated cord blood transplantation: outcomes after single-unit intrabone injection compared with double-unit intravenous injection in patients with hematological malignancies. *Transplantation* 2013;95(10):1284–91.
225. Xia L, McDaniel JM, Yago T, Doeden A, McEver RP. Surface fucosylation of human cord blood cells augments binding to P-selectin and E-selectin and enhances engraftment in bone marrow. *Blood* 2004;104(10):3091–6.
226. North TE, Goessling W, Walkley CR, et al. Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nature* 2007;447(7147):1007–11.
227. Hoggatt J, Singh P, Sampath J, Pelus LM. Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. *Blood* 2009;113(22):5444–55.
228. Cutler C, Multani P, Robbins D, et al. Prostaglandin-modulated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2013;122(17):3074–81.
229. Leen AM, Myers GD, Sili U, et al. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med* 2006;12(10):1160–6.
230. Doubrovina E, Oflaz-Sozmen B, Prockop SE, et al. Adoptive immunotherapy with unselected or EBV-specific T cells for biopsy-proven EBV+ lymphomas after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2012;119(11):2644–56.
231. Micklethwaite KP, Savoldo B, Hanley PJ, et al. Derivation of human T lymphocytes from cord blood and peripheral blood with antiviral and antileukemic specificity from a single culture as protection against infection and relapse after stem cell transplantation. *Blood* 2010;115(13):2695–703.
232. Hanley PJ, Cruz CRY, Savoldo B, et al. Functionally active virus-specific T cells that target CMV, adenovirus, and EBV can be expanded from naive T-cell populations in cord blood and will target a range of viral epitopes. *Blood* 2009;114(9):1958–67.
233. Park K-D, Marti L, Kurtzberg J, Szabolcs P. In vitro priming and expansion of cytomegalovirus-specific Th1 and Tc1 T cells from naive cord blood lymphocytes. *Blood* 2006;108(5):1770–3.
234. Sun Q, Burton RL, Pollok KE, Emanuel DJ, Lucas KG. CD4(+) Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocytes from human umbilical cord blood. *Cell Immunol* 1999;195(2):81–8.
235. Kohn DB, Dotti G, Brentjens R, et al. CARs on track in the clinic. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2011;19(3):432–8.
236. Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* 2012;119(12):2709–20.

237. Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 2011;3(95):95ra73.
238. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 2005;105(8):3051–7.
239. Xing D, Ramsay AG, Gribben JG, et al. Cord blood natural killer cells exhibit impaired lytic immunological synapse formation that is reversed with IL-2 ex vivo expansion. *J Immunother Hagerstown Md* 1997 2010;33(7):684–96.

ANNEXES

Annexe 1

Impact of rabbit ATG-containing myeloablative conditioning regimens on the outcome of patients undergoing unrelated single-unit cord blood transplantation for hematological malignancies

Running Title: ATG in conditioning regimens for cord blood transplantation

Laurent Pascal,^{1,2} Mohamad Mohty,^{3,4,5,6} Annalisa Ruggeri,⁷ Luciana Tucunduva,⁷ Noël Milpied,⁸ Patrice Chevallier,⁶ Reza Tabrizi,⁸ Myriam Labalette,² Eliane Gluckman,⁷ Myriam Labopin⁹ and Ibrahim Yakoub-Agha^{2,10}

1 Onco-hématologie, Université Catholique de Lille, Lille, France

2 EA2686, Laboratoire d'Immunologie HLA, CHRU de Lille, France

3 Service d'Hématologie Clinique et de Thérapie Cellulaire, Hôpital Saint Antoine, APHP, Paris, France

4 Université Pierre et Marie Curie, Paris, France,

5 INSERM, UMRs 938, Paris, France

6 Centre Hospitalier et Universitaire de Nantes, Hématologie Clinique, Nantes, France

5 INSERM, UMRs 938, Paris, France

6 Centre Hospitalier et Universitaire de Nantes, Hématologie Clinique, Nantes, France

7 Eurocord, Hôpital Saint Louis APHP, Université Paris-Diderot, Paris, France

8 Hôpital Haut-Lévêque, Avenue de Magellan, 33604 Pessac, France

9 Centre International greffes and Acute Leukemia Working Party (ALWP), EBMT Paris Office, Hôpital Saint-Antoine, France

10. Centre Hospitalier et Universitaire de Lille, UAM Allogreffe de CSH, Lille, France

Correspondence:

Prof. Ibrahim Yakoub-Agha, MD, PhD

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

Running head: ATG for cord blood transplantation

Abstract

This study aimed to assess the impact of antithymocyte globulin (ATG) on patient outcome in a retrospective series of 91 patients (median age: 12 years) who underwent unrelated single-unit cord blood transplantation (allo-CBT) following a myeloablative-conditioning regimen. Cord blood units were HLA-matched (6/6, n=18; 21%), one-antigen mismatched (n=30, 35%) or 2-antigen mismatched (n=38; 44%). In this series, the overall survival (OS), non-relapse mortality (NRM) and relapse cumulative incidence (CI) were $47\pm 6\%$, $23\pm 4\%$ and $48\pm 5\%$, respectively. Among 46 patients who received ATG as part of the conditioning regimen, the incidence of acute and chronic graft versus host disease (GVHD) was lower than in the group of 45 patients who did not receive ATG (20% vs. 43%; $p=0.03$).

However, multivariate statistical analysis revealed that the ATG use was associated with decreased OS and event-free survival (EFS) rates and a high incidence of NRM [HR = 1.99, 95% CI: 1.11-3.59, $p=0.02$], [HR = 1.83, 95% CI: 1.08-3.10, $p=0.02$] and [HR = 2.54, 95% CI: 1.03-6.26, $p=0.04$], respectively. Therefore, our results do not support the use of ATG as part of a myeloablative-conditioning regimen prior to single-unit allo-CBT in younger patients with hematological malignancies.

Key points: ATG-based myeloablative conditioning in patients receiving allo-CBT is a matter of concern.

INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-SCT) is a curative therapeutic approach in a wide variety of otherwise incurable hematological disorders.(1) Unrelated umbilical cord blood transplantation (UCBT) has emerged as a valid alternative source of stem cells in patients lacking a suitable HLA-matched related or unrelated donor.(2–6) The feasibility of non-myeloablative conditioning in UCBT was demonstrated in 2003.(7) In comparison to conventional bone marrow and peripheral blood cell grafts, UCB contains significantly fewer CD34⁺ cells and mature lymphocytes.(8) The latter could be responsible for an increased risk of late engraftment and graft failure and for a delayed post-transplant immune reconstitution leading to a high incidence of early non-relapse mortality (NRM).(9) One of the strategies developed to reduce the risk of graft rejection has been to provide for *in vivo* recipient T-cell depletion in blood and lymphoid tissues by using antithymocyte globulin (ATG), a set of polyclonal antibodies directed against a wide range of immune cell epitopes.(10)(11) However, ATG use in combination with a conditioning regimen prior to allo-SCT is still controversial, especially for patients receiving a myeloablative single-unit allo-CBT.(12) The aim of this multicenter retrospective study was to assess the impact of ATG on the outcome of 91 consecutive patients who underwent a single-unit allo-CBT following a myeloablative conditioning regimen at three French transplant centers.

PATIENTS AND METHODS

This study is a retrospective study and was conducted according to the Declaration of Helsinki and included 91 consecutive patients who underwent a myeloablative single-unit allo-CBT in Lille (n=38), Nantes (n=31) and Bordeaux (n=22) between January 2000 and December 2010. The following inclusion and exclusion criteria were used: only patients who underwent their first UCBT were selected. Participating centers were asked to verify the data recorded for each patient in the French Bone Marrow Transplantation Registry. Eurocord provided additional information. HLA matching data were also cross-checked, and grafts were matched for at least 4 out of 6 HLA loci by standard cord criteria (i.e. low resolution for HLA-A and HLA-B and high resolution for HLA-DR). All patients received a myeloablative conditioning and were divided into ATG (n=46) and no-ATG (n=45) groups. Except for one patient who discontinued ATG due to intolerance, the median ATG dose administered to ATG group patients was 5 mg/kg of recipient body weight (range 3.8-7.5 mg/kg), and the median number of treatment days was 2 (range 1-5). The drug was stopped at a median time of 5 days prior to transplantation (range 1 to 10 days). Only patients receiving the drug Thymoglobuline (Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA) were included in the study because this drug was the only ATG brand name licensed for use in allo-SCT in France.

As shown in table 1, the two groups were comparable in terms of patient and graft characteristics and transplantation modalities. While we acknowledge that the population is heterogeneous according to type of diagnosis and disease status. There is also a significant difference between the three centers, reflecting different practice. ATG has been added to conventional cyclosporine A + MTX prophylaxis in many centers for patient undergoing an unrelated donor transplant. This practice has not become uniform, and although GVHD seems to be reduced with ATG, the increase risk of infections has discouraged other center from using ATG pre-transplant. The ATG prophylaxis was not distributed equally among centers; Lille and Nantes use ATG in 37% and 39% of cases respectively, but Bordeaux used the ATG only in 13% of cases ($p=0.0003$). The median age at transplantation was 12 years (range 0.7-56), and there were 54 (59%) males and 37 (41%) females.

STATISTICAL ANALYSES

The patients' clinical endpoints of this study were analyzed as of January 1st, 2013. Overall survival (OS) was defined as the time interval from allo-UCBT to the patients' death, regardless of the cause of death. Relapse was defined as the recurrence of the underlying hematological malignancies with or without evidence of autologous bone marrow reconstitution based upon available hematopoietic chimerism data. Event-free survival (EFS) was defined as patients' survival with no evidence of disease relapse. Non-relapse mortality (NRM) was defined as patients' death without evidence of relapse of their hematological malignancies. Patient-, disease- and transplant-related variables of the two study groups were compared using Chi-square or Fisher's exact test for categorical variables and Mann-Whitney test for continuous variables, respectively. Cumulative incidence functions (CIF) were used to estimate relapse incidence (RI) and NRM in the presence of two competing risks: relapse of malignancy or death in remission.⁽¹³⁾ To study acute and chronic graft versus host disease (GVHD), we considered death in remission as a competing event. Probabilities of EFS and OS were calculated using the Kaplan-Meier estimate. Univariate analyses were performed using the log rank test for OS and LFS and Gray's test for CIF. Multivariate analyses were performed using the Cox proportional-hazard model.⁽¹⁴⁾ Differences between the two groups with regard to distribution and all variables significantly associated with one of the outcome studied were included in the statistical model. All statistical tests were two-sided with type I error rate fixed at 0.05. Statistical analyses were performed using SPSS 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and R 2.13.2 (R Development Core Team, Vienna, Austria) software packages.

RESULTS

Engraftment and Transplant-related Toxicity

In this study, 11 patients did not show evidence of neutrophil engraftment following allo-UCBT; of these patients, 9 died soon after graft infusion, and 2 others developed autologous marrow cell reconstitution. The estimated median time interval to reach a neutrophil count of 0.5×10^9 G/L was 28 days after transplant (range 13-84 days). Three patients eventually rejected their grafts after sustained engraftment (at days 58, 60 and 84). The 100-day cumulative incidence of grade II-IV and grade III-IV acute GVHD were 35% and 19%, respectively. Of the 62 evaluable patients who survived more than 100 days, 19 (31%) developed chronic GVHD, including 6 cases (10%) with extensive grade. Table 2 summarizes the post-transplant complications observed in both patient groups. The cumulative incidence of grade II-IV aGVHD was $38 \pm 8\%$ in the “no-ATG” group versus $32 \pm 7\%$ in the ATG group ($p=0.43$). The cumulative incidence of grade III-IV aGVHD was $22 \pm 7\%$ in the “no-ATG” group and $16 \pm 6\%$ in the ATG group ($p=0.43$). Patients from the “no-ATG” group developed chronic GVHD more frequently than those from the ATG group (13 versus 6, $p=0.04$).

Survival

With a median follow-up period of 33 (range 12-96) months, the estimated 3-year OS, EFS, CI of relapse and NRM rates were $47 \pm 6\%$, $30 \pm 5\%$, $48 \pm 5\%$ and $23 \pm 4\%$, respectively (figure 1). In univariate statistical analysis (Table 3), older transplant recipients (age >18 years) were found to have worse OS, EFS and NRM ($p=0.004$, $p=0.03$ and $p=0.01$, respectively), whereas pretransplant positive cytomegalovirus (CMV) serostatus was correlated with worse OS and NRM ($p=0.002$ and $p=0.007$, respectively). Infusion of a low total nucleated cell dose (less than 4.6×10^7 nucleated cells/kg) was associated with an increased NRM ($p=0.006$). In addition, poor disease status at the time of transplant was associated with an increased risk of relapse ($p=0.03$). A trend towards shorter EFS was noted in the ATG group ($P=0.07$). Pretransplant positive CMV serostatus was found to be associated with a worse OS [HR= 1.89, 95%CI (1.01-3.54); $p=0.05$]. No impact of ATG on acute GVHD development was detected regardless of their grades. Of 29 adults, for the overall mortality 12 out of 19 patients in the no-ATG group and 9 out of 10 patients in the ATG group died ($p=0.07$). We could speculate that the trend for the higher toxicity in the ATG group did not reach the significance due to the small number of adult patients. For the transplant related mortality, 4 out of 19 patients in the no-ATG group and 7 out of 10 in the ATG group died ($p=0.008$) (Log Rank test). In multivariate statistical analyses (Table 4), ATG use was the only variable that adversely influenced OS, EFS and NRM [HR= 1.99, 95%CI (1.11-3.59); $p=0.02$], [HR= 1.83, 95%CI (1.08-3.1); $p=0.02$] and [HR= 2.54, 95%CI (1.03-6.26); $p=0.04$], respectively.

Cause of death

As shown in table 2, twelve (13%) patients died of post-transplant infectious causes, including 5 bacterial, 2 viral, 3 fungal and 2 mixed infections. Two of these infected patients also developed a veno-occlusive disease. In the ATG group, infections were the main cause of death. Eight out of 46 patients from the ATG-group developed fatal infections as compared to 4/45 patients from the no-ATG group, but this difference was not statistically significant. At one year after transplant, NRM was 30 % in the ATG group and 15 % in the no-ATG group ($p=0.48$; table 3).

DISCUSSION

The most important finding of our study is that the addition of rabbit ATG to the myeloablative-conditioning regimen prior to single-unit allo-CBT adversely influenced patients' outcomes, particularly their survival and NRM. To the best of our knowledge, this is the largest study of this kind on the role of ATG in the myeloablative conditioning regimens in the setting of single unit allo-CBT. Previous studies have reported on ATG in the pre-transplantation setting.(15,16) However, none of these reports specifically addressed the impact of ATG on patient outcome.

In this study, only patients who received standard myeloablative conditioning were included. Because the incidence of delayed neutrophil recovery and graft failure is commonly reported to be higher in transplant patients infused with a single unit of cord blood,(17) we deliberately chose to limit our study to this category of patients based on the hypothesis that administration of ATG prior to transplant could have a significant impact on patient outcome in this setting. Information about HLA-matching between donor and recipient was verified in the databases of the French National Donor Registry and Eurocord. In addition, these results were meticulously cross-checked using different verification methods (e.g., matching of several sources of data, on-site verification and computerized search for discrepancies or errors).

In agreement with other reports (18–22), we observed that the myeloablative conditioning regimen lacking ATG resulted in a higher incidence of acute GVHD development. One may ask why the beneficial effect of ATG in reducing acute GVHD does not translate into benefits in patient survival. Indeed, measuring the outcome of allo-SCT therapy is challenging because the net outcome is affected by several complex variables. In the present study, patients from the ATG group were noted to experience fatal infections and relapse of their disease more frequently than those from the no-ATG group, although this difference was not statistically significant. As reported by other authors, delayed immune reconstitution following allo-CBT has been known to be associated with a high incidence of infections and relapse especially after myeloablative conditioning. (23–27)

To further characterize the adverse influence of ATG in our patient cohort, we sought to analyze the role of the dosing of ATG, duration of perfusion and timing on patients' outcome. However, because the majority of patients received ATG at the total dose of 5 mg/kg with a median of 2 days of perfusion, comparisons with other ATG protocols lacked sufficient statistical power. In addition, based on our experience and various other reports, it is likely that the use of low to moderate doses (5-7 mg/kg) of ATG prior to allogeneic stem cell transplantation can decrease the risk of GVHD without compromising other post-transplant outcomes.(28,29)

An alternative approach to ATG administration could be the use of a fludarabine-based regimen because this chemotherapeutic agent is known to have a powerful immunosuppressive effect resulting in long-lasting engraftment(7); however, its use in HLA-mismatched transplantation needs to be established. In fact, it is because of ATG's beneficial effects in cases of HLA-disparities that ATG has been recommended. (11,22,28)

While we acknowledge the limitations of our retrospective study based on a relatively small number of mostly young patients, in three different centers with different practices, our results suggest that the use of ATG during myeloablative conditioning of patients receiving single-unit allo-CBT should be handled cautiously outside the clinical trial setting. From our study, no conclusions can be drawn with certainty concerning patients who received non-myeloablative conditioning and those transplanted with double-unit CB or with in vitro expanded CB. Similarly, no conclusion can be drawn regarding the pre-emptive use of ATG as defined by Bacigalupo, to prevent early aGVHD.(30) There is an interest of evaluating ATG in reduced-intensity conditioning and double UCBT: we conducted a separate study from our group in another cohort of patients. These results have been reported recently at the last ASH meeting showing the same trend of results.(31) It is also concordant results with Lindemans.(32) Our study emphasizes the need to delineate the indications for the use of ATG and to perform prospective protocols that investigate the dose, scheduling and timing of ATG in allo-CBT.

ACKNOWLEDGEMENTS

Ibrahim Yakoub-Agha would like to thank the "association Capucine" and "l'équipe du CHTI de l'EDHEC" for their generous support of his clinical and basic research work.

AUTHORSHIP

Contributions: L.P. designed the study, enrolled patients, contributed to the analysis and wrote the manuscript; M.M. enrolled patients and commented on the manuscript; A.R. and L.T. contributed to data collections, N.M enrolled patients and commented on the manuscript, P.C. and R.T. contributed to data collection, M.L contributed to the study design and the manuscript, E.G. provided scientific criticism and wrote the manuscript, M. L. performed the data analysis, and I.Y.-A. designed and supervised the study, analyzed the data and wrote the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

MM, IYA, NM and PC received research support and honoraria from Genzyme Sanofi, whose product is discussed in this study.

REFERENCES

1. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med*. 18 juill 1996;335(3):157–166.
2. Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi A, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med*. 25 nov 2004;351(22):2276–2285.
3. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang M-J, Champlin RE, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med*. 25 nov 2004;351(22):2265–2275.
4. Barker JN, Scaradavou A, Stevens CE. Combined effect of total nucleated cell dose and HLA match on transplantation outcome in 1061 cord blood recipients with hematologic malignancies. *Blood*. 4 mars 2010;115(9):1843–1849.
5. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 26 oct 1989;321(17):1174–1178.
6. Rodrigues CA, Sanz G, Brunstein CG, Sanz J, Wagner JE, Renaud M, et al. Analysis of risk factors for outcomes after unrelated cord blood transplantation in adults with lymphoid malignancies: a study by the Eurocord-Netcord and lymphoma working party of the European group for blood and marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 10 janv 2009;27(2):256–263.
7. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, Miller JS, Wagner JE. Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning. *Blood*. 1 sept 2003;102(5):1915–1919.
8. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. mai 1989;86(10):3828–3832.
9. Komanduri KV, St John LS, de Lima M, McMannis J, Rosinski S, McNiece I, et al. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood*. 15 déc 2007;110(13):4543–4551.
10. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia*. juill 2007;21(7):1387–1394.
11. Bacigalupo A, Lamparelli T, Bruzzi P, Guidi S, Alessandrino PE, di Bartolomeo P, et al. Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). *Blood*. 15 nov 2001;98(10):2942–2947.
12. Mohty M, Gaugler B. Advances in umbilical cord transplantation: the role of thymoglobulin/ATG

in cord blood transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol.* juin 2010;23(2):275–282.

13. Gooley TA, Leisenring W, Crowley J, Storer BE. Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representations of old estimators. *Stat Med.* 30 mars 1999;18(6):695–706.
14. Cox DR. Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological).* 1972;187–220.
15. Sanz J, Boluda JCH, Martín C, González M, Ferrá C, Serrano D, et al. Single-unit umbilical cord blood transplantation from unrelated donors in patients with hematological malignancy using busulfan, thiopeta, fludarabine and ATG as myeloablative conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant.* oct 2012;47(10):1287–1293.
16. Ciurea SO, Saliba RM, Hamerschlak N, Karduss Aurueta AJ, Bassett R, Fernandez-Vina M, et al. Fludarabine, melphalan, thiopeta and anti-thymocyte globulin conditioning for unrelated cord blood transplant. *Leuk Lymphoma.* mai 2012;53(5):901–906.
17. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood.* 1 févr 2005;105(3):1343–1347.
18. Mohty M, Labopin M, Balère ML, Socié 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 Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. *Leukemia.* nov 2010;24(11):1867–1874.
19. Blaise D, Tabrizi R, Boher J-M, Le Corroller-Soriano A-G, Bay J-O, Fegueux N, et al. Randomized study of 2 reduced-intensity conditioning strategies for human leukocyte antigen-matched, related allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: prospective clinical and socioeconomic evaluation. *Cancer.* 1 févr 2013;119(3):602–611.
20. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, et al. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol.* sept 2009;10(9):855–864.
21. Soiffer RJ, Lerademacher J, Ho V, Kan F, Artz A, Champlin RE, et al. Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Blood.* 23 juin 2011;117(25):6963–6970.
22. Bacigalupo A, Lamparelli T, Barisione G, Bruzzi P, Guidi S, Alessandrino PE, et al. Thymoglobulin prevents chronic graft-versus-host disease, chronic lung dysfunction, and late transplant-related mortality: long-term follow-up of a randomized trial in patients undergoing unrelated donor transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* mai 2006;12(5):560–565.
23. Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, et al. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med.* 14 juin 2001;344(24):1815–1822.
24. Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM, Rubinstein P. Cell dose and speed

Table 1 -Initial Characteristics of Patients Recipients and Donors

Table 1 – Main characteristics of the Patients and Donors				
Characteristics	All patients (N=91)	ATG-group (n=46)	No ATG-group (n=45)	p
	No of patients (%)	No of patients (%)	No of patients (%)	
Recipient age (years)				0.08
< 12	45 (50)	23 (50)	22 (49)	
> 12	46 (50)	23 (50)	23 (51)	
Recipient gender				0.9
Male	54 (59)	27 (59)	27 (60)	
Female	37 (41)	19 (41)	18 (40)	
Donor gender				0.6
Male	47 (52)	25 (54)	22 (49)	
Female	44 (48)	21 (46)	23 (51)	
Donor/recipient sex mismatch				0.12
Female donor and male recipient	25 (27)	10 (22)	15 (33)	
Male donor and female recipient	18 (20)	8 (17)	10 (22)	
Other combination	48 (53)	28 (61)	20 (44)	
Recipient CMV serostatus				0.87
Positive	25 (27)	13 (28)	12 (27)	
Negative	66 (73)	33 (72)	33 (73)	
Underlying disease				0.58
AL	66 (73)	34 (74)	32 (71)	
MDS & MPS	17 (19)	7 (15)	10 (22)	
Lymphoid disorders	8 (9)	5 (11)	3 (7)	
Disease status (IBMTR status)				0.08
Good	36 (40)	17 (37)	19 (42)	
Intermediate	37 (41)	23 (50)	14 (31)	
Poor	17 (19)	5 (11)	12 (27)	
HLA mismatch				0.13
0	18 (21)	6 (14)	12 (29)	
1	30 (35)	19 (43)	11 (26)	
2	38 (44)	19 (43)	19 (45)	
Nucleated cells infused (x 10 ⁷ /kg)				0.36
>0.46	44 (50)	24 (56)	20 (44)	
<0.46	44 (50)	19 (44)	25 (56)	
Conditioning regimen				0.11
TBI-based	51 (56)	22 (48)	29 (64)	
Busulfan-based	30 (34)	18 (39)	12 (29)	0.33
GVH prophylaxis				-
CsA alone	18 (20)	9 (20)	9 (20)	
CsA+Pred	43 (47)	26 (57)	17 (38)	
CsA+MMF	16 (18)	2 (4)	14 (31)	
CsA+Pred+FK	2 (2)	0	2 (4)	
Other prophylaxis	11 (12)	9 (20)	2 (4)	

AL: acute leukemia; MDS: myelodysplastic syndrome; MPS: myeloproliferative syndrome ; TBI: total body irradiation; CsA: cyclosporine-A; Pred: prednisone; MMF: mycophenolate mofetil; FK: FK-506 otherwise known as tacrolimus; IBMTR: International Bone Marrow Transplant Registry.

Table 2 Transplantation-Related Events				
	All patients (N=91)	ATG group (n=46)	No-ATG group (n=45)	p*
Patients who engrafted (%)	80 (87%)	39 (84%)	40 (89%)	NS
Day ANC >500/ μ l, median	28	29	28	NS
Day platelet > 20 x 10 ⁹ /L	33	36	33	NS
Causes of death				
Infection	12	8**	4	NS
aGVHD	1	0	1	
Multiple organ failure	7	5	2	
Other	4	1	3	

ANC: absolute neutrophil count; aGVHD; acute graft-versus-host disease

* Comparison of the ATG and "no-ATG" groups. ** 2 of these patients also developed aGVHD, and 2 others veno-occlusive disease.

Table 3 - Univariate Analysis of the Prognostic Value of Patients' Initial Characteristics: 3-Year rates												
Characteristics	Overall survival		EFS		NRM		Relapse		aGVHD Grades II-IV		aGVHD Grades III-IV	
	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p
Total	47±6		30±5		23±4		48±5		35±5		19±3	
ATG												
Yes	38±8	0.21	19±6	0.07	30±7	0.48	51±8	0.44	32±7	0.43	16±6	0.43
No	57±8		41±8		15±6		45±8		38±8		22±7	
Disease status												
Good	44±9	0.97	23±8	0.43	22±8	0.28	55±9	0.03	33±8	0.76	14±6	0.55
Intermediate	43±9		41±9		29±8		30±8		34±9		23±7	
Poor	65±12		22±10		12±8		66±13		43±14		21±11	
Age at treatment												
<18	55±7	0.004	33±6	0.03	16±5	0.01	51±7	0.8	36±6	0.73	22±5	0.27
>18	30±9		21±8		38±10		41±10		34±10		12±7	
Nucleated cells infused												
<4.6 10 ⁷	41±8	0.15	28±7	0.52	36±8	0.006	36±8	0.06	36±8	0.92	15±6	0.27
>4.6 10 ⁷	49±9		30±8		11±5		59±8		37±8		24±7	
HLA-Ag mismatch												0.28
0-1	58±7	0.06	37±7	0.1	20±6	0.73	43±8	0.17	30±7	0.14	16±5	
>1	28±9		11±7		29±9		59±9		47±9		26±7	
CMV recipient serostatus												
Negative	51±7	0.002	30±6	0.08	17±5	0.007	53±7	0.34	35±6	0.82	19±5	0.99
Positive	37±10		28±9		37±10		35±11		34±11		19±9	
Total Body Irradiation												
No	50±8	0.91	33±7	0.64	22±7	0.96	45±8	0.91	27±7	0.16	11±5	0.08
Yes	42±8		24±7		24±7		52±8		41±7		25±6	

Table 4 - Multivariate Analysis: Effect of ATG, Cell doses, Age, and CMV Serostatus on Patient Outcome												
Characteristics	Overall survival			EFS			NRM			Relapse		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
ATG												
No	1			1			1			1		
Yes	1.99	1.11-3.59	0.02	1.83	1.08-3.10	0.02	2.54	1.03-6.26	0.04	1.49	0.78-2.86	0.23
Age at treatment												
<18	1			1			1			1		
>18	1.97	0.97-4.00	0.06	1.76	0.94-3.28	0.08	1.76	0.63-4.95	0.28	1.73	0.78-3.85	0.18
Nucleated cells infused												
<4.6 10 ⁷	1			1			1			1		
>4.6 10 ⁷	0.99	0.55-1.8	0.99	0.99	0.79-2.44	0.99	0.38	0.12-1.16	0.09	1.62	0.76-3.45	0.21
CMV recipient serostatus												
Negative	1			1			1			1		
Positive	1.89	1.01-3.54	0.05	1.39	0.79-2.44	0.26	2.41	0.95-6.1	0.06	0.95	0.44-2.05	0.9

Abbreviations: HR: hazard ratio; NRM: non-relapse mortality; EFS: Event-free survival; CMV; Cytomegalovirus

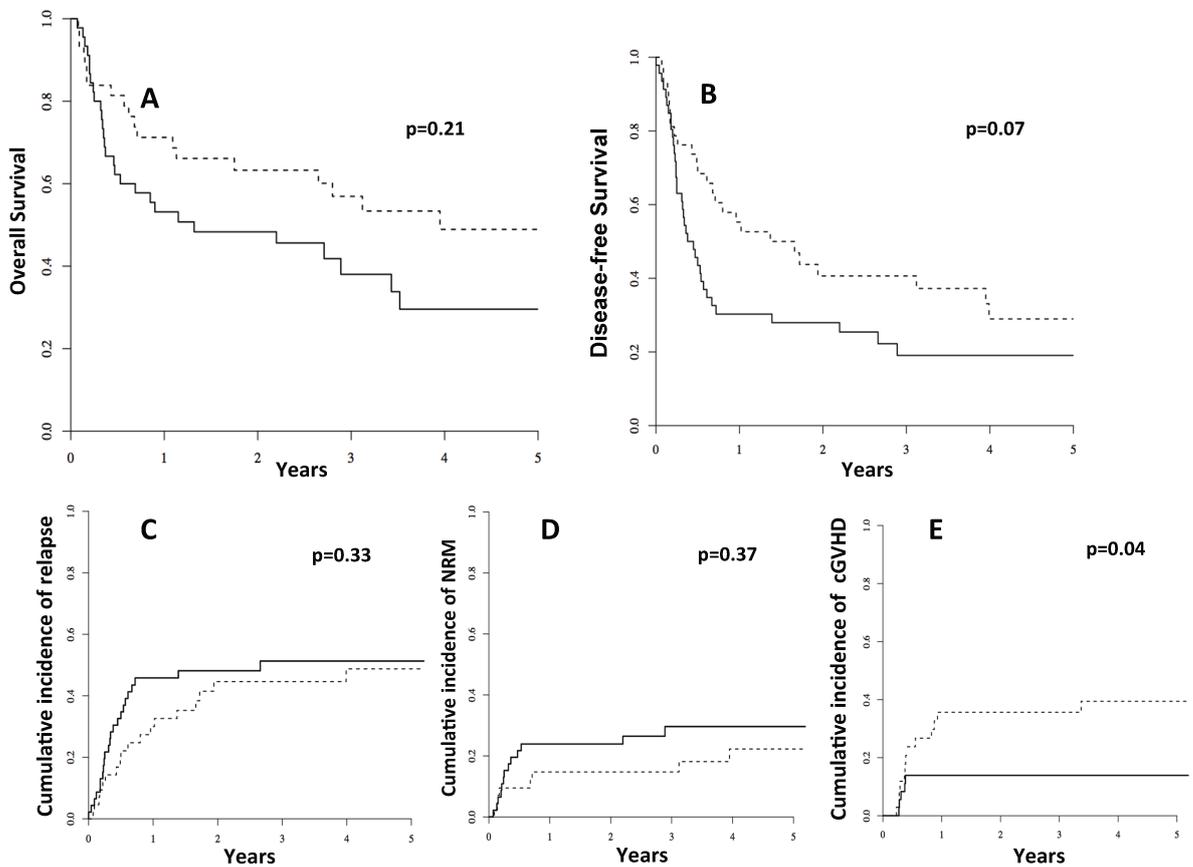


Figure 1: A. Overall survival of cord blood transplantation recipient patients; the ATG group is identified by a solid line and the no-ATG group by a dotted line; B. Disease free-survival; C. Cumulative incidence of relapse; D Cumulative incidence of non-relapse mortality; E Cumulative incidence of chronic GVHD.

Annexe 2

Impact of ATG-containing reduced-intensity conditioning after single or double-unit allogeneic cord blood transplantation: analysis of risk factors and outcomes

L Pascal,^{*1, 15} L Tucunduva,^{*2} AL Ruggeri,^{2,3} D. Blaise,⁴ P Ceballos,⁵ P Chevallier,⁶ J Cornelissen,⁷ N Maillard,⁸ R Tabrizi,⁹ E Petersen,¹⁰ W Linkesch,¹¹ H Sengeloev,¹² C Kenzey,², A Pagliuca,¹³ E Holler,¹⁴ H Einsele,¹⁵ E Gluckman,² V Rocha^{**2,16} and I Yakoub-Agha^{**17,18} on behalf of Eurocord and EBMT

*LP and *LT shared the first authorship and **VR and **I Y-A shared the senior authorship

1 Hôpital Saint Vincent de Paul, GHICL, Hematologie, Lille, France,

2 Eurocord, Paris, France, Monacord ,Monaco.

3 Hématologie Clinique et Thérapie Cellulaire, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

4Hematology, Institut Paoli Calmettes, Marseille, France,

5 Hôpital Lapeyronie, Montpellier, France,

6 Hematology, CHU Nantes, Nantes, France,

7 Department of Hematology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, Netherlands.,

8 CHU hematologie, Poitiers, France,

9 Hematology, CHU, Bordeaux, France

10 Hematology, UMCU, Utrecht, Netherlands

11 Division of Hematology, Medical University of Graz, Graz, Austria,

12 Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark,

13 Department of Haematological Medicine, King's College London and Kings College Hospital, London, UK

14 Department of Haematology/Oncology, University of Regensburg, 93042 Regensburg, Germany

15 Department of Internal Medicine II, Division of Hematology, University Hospital of Würzburg, Würzburg, Germany

16 Division of Hematology, Churchill Hospital, Oxford, UK

17 Hematology, CHRU de Lille, France

18 Université LILLE2, INSERM995, France

Correspondance:

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 : ibrahim.yakoubagha@chru-lille.fr

Key words: umbilical cord blood transplantation, ATG, reduced-intensity conditioning

Key points: When possible ATG should be avoided in adults undergoing UCBT following Cy/Flu/TBI200 regimen.

Running title: ATG in UCBT after RIC in adults

Abstract: 200

Text: 2678

Figures: 2

Tables: 3

ABSTRACT

We analyzed 661 adult patients who underwent single- (s) (n=226) or double-unit (d) (n=435) UCBT following a reduced-intensity conditioning (RIC) consisting of low-dose TBI, cyclophosphamide and fludarabine (Cy/Flu/TBI200). 82 patients received rabbit ATG as part of the conditioning regimen (ATG-group) while 579 did not (non-ATG-group). Median age at UCBT was 54 years and diagnoses were acute leukemias (51%), myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm (MDS/MPN; 19%) and lymphoproliferative diseases (30%). 44% of patients were transplanted with advanced disease. All patients received ≥ 4 antigens HLA-matched UCBT. Median number of collected total nucleated cells was $4.4 \times 10^7/\text{kg}$. In ATG-group, on 64 evaluable patients, ATG was discontinued one (n=27), two (n=20) or more than two days before the graft infusion (n=17). In multivariate analyses the use of ATG was associated with decreased incidence of acute GVHD (HR=0.31, 95% CI=0.17-0.55, $p < 0.0001$), higher incidence of non-relapse mortality (NRM) (HR=1.68, 95% CI=1.16-2.43, $p = 0.0009$) and decreased overall survival (OS) (HR=1.69, 95% CI=1.19-2.415, $p = 0.003$). Collectively, our results suggest that the use of ATG could be detrimental especially if given too close to graft infusion in adults undergoing UCBT following Cy/Flu/TBI200 regimen.

INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-SCT) is a curative therapeutic approach in a wide range of otherwise incurable hematological disorders. Unrelated umbilical cord blood transplantation (UCBT) has emerged as a valid alternative source of stem cells in patients lacking a suitable HLA-matched related or unrelated donor.¹⁻⁶ The feasibility of reduced-intensity conditioning (RIC) in UCBT has been demonstrated in 2003.^{7,8} In comparison to conventional bone marrow and peripheral blood grafts, cord blood (CB) contains significantly less CD34⁺ cells and mature lymphocytes.⁹ The latter could be responsible for an increased risk of late engraftment and graft failure and for a delayed post-transplant immune reconstitution leading to high incidence of early non-relapse mortality (NRM).¹⁰⁻¹⁴ One of the strategies developed to reduce the risk of graft rejection has been to provide for *in vivo* recipient T-cell depletion in blood and lymphoid tissues by using antithymocyte globulin (ATG), a set of polyclonal antibodies directed against a wide range of immune cell epitopes.^{15,16} However, the use of ATG, incorporated within the conditioning regimen prior to UCBT is still controversial, especially for adults receiving a non-myeloablative single-unit allo-CBT.¹⁷⁻¹⁹ The aim of this multicenter retrospective report was to assess the impact of ATG on the outcomes of 661 patients who underwent a single or double-unit UCBT following a RIC in 79 EBMT centers.

PATIENTS AND METHODS

DATA COLLECTION

Eurocord and the European Blood and Marrow Transplant Group (EBMT) provided data on cord blood recipients. Participating centers were asked to verify the data referred to EBMT Registry and to provide additional information on each patient. Indeed, a specific questionnaire containing details on ATG type, source, dose and timing was also sent to all participating centers, as well as queries regarding inaccurate or missing data.

INCLUSION CRITERIA

Data of 661 patients who underwent transplantation between January 2004 and December 2011 in 79 EBMT centers were analyzed.

Inclusion criteria were: (1) age over 18 years at the time of transplantation and (2) first single or a double-unit UCBT after RIC for hematological malignancies. To make our population as homogeneous as possible, we included only adults who received a conditioning associating Fludarabine plus Cyclophosphamide and low dose (less than 6 Gy) TBI (Cy/Flu/TBI200 conditioning), as previously described by Brunstein et al.²⁰ Since ATG could be part of the conditioning regimen, 82 patients received ATG (the 'ATG group') and 579 did not receive ATG (the 'non-ATG group').

Details regarding timing of ATG infusion were available for 64 patients. The median number of days of treatment was 3 (range 1-5) and the drug was stopped at a median time of 2 days before the graft infusion (range 1 to 7); i.e. at D-2 (range D-7 to D-1), considering D0 the day of stem cell infusion. Patients were divided into three categories according to the time of ATG discontinuation before graft infusion: 27 patients stopped ATG at D-1 or D0; 20 stopped it at D-2 and the remaining 17 patients stopped ATG between D-7 and D-3.

Data regarding the dose and type of ATG were available for 58 patients. Median dose was 11.7mg/kg (range 2.5 to 60). Patients receiving ATG Fresenius (n=20), had higher doses at a median of 22.9 mg/kg of recipient body weight (range, 5-60 mg/Kg). Thirty-eight patients received ATG Thymoglobuline (Genzyme) at a median dose of 7.1 mg/kg (range, 4-15 mg/Kg). There was no difference between the two types of ATG in terms of timing of administration.

ENDPOINTS AND DEFINITIONS

Neutrophil recovery was defined as achieving an absolute neutrophil count of at least 500 per cubic millimeter for three consecutive days and neutrophil engraftment was defined as neutrophil recovery excluding patients with autologous recovery. Data on patients who received a second transplantation for graft failure were censored at the time of the second

transplantation. Graft failure was defined as absence of neutrophil recovery 60 days after transplantation. Acute graft-versus-host disease (GVHD) was diagnosed and graded according to published criteria;²¹ Chronic GVHD was diagnosed according to standard criteria²² and evaluated in patients who survived more than 100 days with sustained engraftment.

NRM was defined as any death without relapse. Relapse was defined on the basis of morphologic evidence of hematologic malignancies. Overall survival (OS) was defined as the time elapsed from transplant to death, whatever the cause of death, and event-free survival (EFS) was defined as survival with no evidence of relapse.

STATISTICAL ANALYSIS

Follow-up was considered from the time of UCBT to the last assessment or death. The median follow-up for survivors was 36 months (2 to 99).

Besides the use of ATG, the following variables were considered in a risk factor analysis for outcomes:

- Patients' characteristics: age at UCBT, gender, cytomegalovirus (CMV) serostatus of recipient.

- Disease characteristics: diagnosis and disease status at transplant (complete remission, disease present, refractory or advanced disease).

- Transplantation characteristics: year of UCBT, type of graft (single or double-unit), GVHD prophylaxis, sex mismatch as a male patient undergoing transplantation with CB of female donor, HLA matching, ABO compatibility; total nucleated cell dose and CD34 infused cell dose.

Median values and ranges were used for continuous variables and percentages for categorical variables. With the use of Pearson's chi-square test for categorical and the Mann-Whitney test for continuous variables, we compared the differences between the ATG and the non-ATG groups. Cumulative incidence curves were built in a competing risks setting, with death treated as a competing event, to calculate the probability of neutrophil recovery, acute GVHD, chronic GVHD and relapse.²³ Probabilities of EFS and OS were estimated by the Kaplan-Meier method; the log-rank test was used for univariate comparisons. Variables found to have a p value lower than 0.10 were included in multivariate analyses, with the use of Cox proportional-hazards regression to adjust for EFS and OS and Fine and Gray's proportional-hazards model for sub distribution of a competing risk for neutrophil engraftment, relapse, acute and chronic GVHD.²⁴

Statistical analyses were performed with SPSS (Inc., Chicago, Ill, USA) and R software packages.

RESULTS

CHARACTERISTICS OF THE PATIENTS

Table 1 shows patients' characteristics and transplantation modalities according to the use of ATG. Median age at UCBT was 52 years (range 18 to 72) and patients in the ATG group tended to be older (52 for the non-ATG group vs 54 for the ATG group, $p=0.068$).

Patients in the ATG group presented a higher proportion of myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm (MDS/MPN, 31% vs 17%, $p=0.009$) and a trend to have more advanced disease ($p=0.063$) when compared to the non-ATG group. The proportion of patients with acute leukemia was similar in the two groups (49% versus 51%).

TRANSPLANTATION MODALITIES

All cord blood units were transplanted following a reduced intensity conditioning regimen consisting of cyclophosphamide (50 mg/kg), fludarabine (200 mg/m²), and a single fraction of total body irradiation (200 cGy in 86%, 400 cGy in 12% and 600 cGy in 2% of patients). Patients in the ATG group were transplanted more recently ($p=0.015$) and received more sex-matched CBU ($p=0.013$). Otherwise, all transplantation characteristics were similar. The median number of infused total nucleated cells (TNC) was 3.5×10^7 /kg (range 0.38-9.44) and most patients received grafts with 4 out of 6 HLA compatibilities. HLA compatibility was analyzed by serology or low-resolution typing level for HLA-A and -B and by allelic or high-resolution typing for HLA-DRB1.

PATIENTS OUTCOMES

NEUTROPHIL ENGRAFTMENT

Cumulative incidence (CI) of 60-day neutrophil engraftment was $83 \pm 1\%$ with no difference according to the use of ATG ($84 \pm 1\%$ for the non-ATG vs $82 \pm 4\%$ for the ATG group, $p=0.17$). The median time to neutrophil engraftment was 20 days (range 1 to 80). Graft failure occurred in 103 patients (15.6%), 88 in the non-ATG and 15 in the ATG group. Of them, 30 were alive at a median of 33 months after transplantation. Patients with lymphoproliferative diseases presented a higher rate of neutrophil engraftment when compared to patients with acute leukemia or MDS/MPN (60-day CI of neutrophil engraftment $90 \pm 2\%$, $80 \pm 2\%$, $84 \pm 3\%$, respectively). The percentage of patients receiving previous autologous stem cell transplantation (ASCT) was significantly higher in those with lymphoproliferative disorders (69.3% vs 13.4% for patients with acute leukemias or MDS/MPN; $p<0.0001$). In multivariate analysis, previous ASCT and not diagnosis, was associated with greater neutrophil engraftment (HR 1.40 95%CI 1.17-1.48, $p=0.0002$). We found no impact of the use of ATG on the relative risk of neutrophil engraftment.

GRAFT VERSUS HOST DISEASE

The cumulative incidence of acute grade II to IV GVHD was 15±4% and 41±2% in the ATG and the non-ATG groups, respectively ($p=0.00033$) (Figure 1C). Likewise, acute grade III-IV GVHD was 1.3% and 16% in the ATG and the non-ATG groups, respectively ($p=0.0005$). In the multivariate analysis, the risk of acute grade II to IV GVHD was significantly lower in the ATG group (HR 0.31, 95%CI 0.17-0.55, $p<0.0001$, Table 2).

Among the patients who survived more than 100 days, cumulative incidence of chronic GVHD was 20±4% and 29±2% in the ATG and the non-ATG groups, respectively ($p=0.072$). Multivariate analysis confirmed no impact of ATG on CI of chronic GVHD.

OVERALL SURVIVAL

The unadjusted three-year probability of overall survival (OS) was different between the two groups (30±5% in the ATG group vs 48±2% in the non-ATG group, $p<0.0001$) (Figure 1). In univariate analysis, other risk factors associated with a significant decrease in OS were: age > 51 years at UCBT, CMV positive serostatus, diagnosis of MDS/MPN, advanced disease status at UCBT and the presence of ≥2 out of 6 HLA mismatches (Table 1).

The multivariate analysis confirmed the detrimental impact of ATG on OS (HR 1.69, 95%CI 1.19-2.41, $p=0.003$ for the ATG group). For the 64 patients with available data, the interval from the last dose of ATG and graft infusion seems to have impact on OS. Thus, OS was 18±7%, 31±11% and 59±12% in patients who stopped ATG, one day (at D0 or D-1) two days (at D-2) and more than two days (before D-2) before graft infusion, respectively ($p=0.07$)(Figure 2). When analyzing these patients in 2 groups (last dose of ATG at D-2, D-1 or D0) *versus* last dose of ATG before D-2 OS was 26±7% and 59±12%, respectively ($p=0.039$) (Figure 2).

NON-RELAPSE MORTALITY AND RELAPSE

NRM was 46% and 26±2%, in the ATG and the non-ATG groups, respectively ($p=0.00038$) (Figure 1D). This difference was confirmed by multivariate analysis (HR 1.68, 95%CI 1.16-2.43, $p=0.0009$ for the ATG group). The interval from the last dose of ATG and graft infusion also seems to impact on NRM. This latter was 59±9%, 51±12% and 23±10% in patients who stopped ATG, one day (at D-1), two days (at D-2) and more than two days (before D-2) before graft infusion, respectively ($p=0.12$). Again, when grouping the patients into those who received ATG closer to CB cells infusion (at D-2, D-1 or D0) *versus* patients receiving last those of ATG before D-2 NRM was 56±7 *versus* 23±10, respectively ($p=0.05$).

The CI of relapse was not significantly different between the two groups (29±5% in the ATG group vs. 34±2% in the non-ATG group, $p=0.60$). In the multivariate analysis, the risk of relapse was similar in the two groups.

CAUSES OF DEATH

As shown in Table 3, 20 of the 82 patients of the ATG group (24%) died of relapse or progression while 158 of the 579 patients of the non-ATG group (27%) died of relapse or progression ($p=0.58$).

Of note, 23 (28%) and 76 (13%) patients died of infections of ATG-group and non-ATG-group, respectively ($p=0.0013$). In addition, 5 (6%) and 3 (0.5%) patients died of post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) in ATG group and non-ATG group, respectively ($p=0.001$).

DISCUSSION

In adults undergoing UCBT following a RIC for hematological malignancies, this study shows that adding rabbit ATG to the conditioning leads to less satisfactory outcomes.

To our knowledge, this is the first report regarding the role of ATG incorporated within RIC regimens in the setting of UCBT. Several studies have previously reported on the ATG in pre-transplantation setting.²⁵ However, none of them has specifically addressed the impact of ATG on patients' outcome.

It has been previously reported that patients without recent chemotherapy before transplant, often including MDS, presented a higher risk of graft failure⁴ and for this reason there would be a justification to use ATG for those patients. Indeed, we found that there was a higher frequency of patients with MDS/MPN receiving ATG in the conditioning regimen when compared to other diseases. Moreover, we found that patients with lymphoproliferative diseases presented a higher rate of neutrophil engraftment when compared to patients with acute leukemias or MDS/MPN. As expected, a significantly higher percentage of patients with lymphoproliferative diseases were treated with previous autologous stem cell transplantation (ASCT), and a detailed analysis showed that previous ASCT and not diagnosis, was associated with greater neutrophil recovery. Nevertheless, when analyzing separately the subgroup of patients not having previous ASCT as well as those with MDS/MPN, we still do not find an impact of ATG in engraftment (data not shown). Therefore, based in our results, the use of ATG had no impact on neutrophil engraftment or rejection and we do not recommend using ATG in patients with MDS.

According to other reports,²⁶ we found that the absence of ATG had a detrimental impact on acute GVHD development. One may question why such a beneficial effect of ATG in

reducing acute GVHD does not have an effect on survival? In fact, measuring the outcome of allogeneic stem cell transplantation therapy is difficult because the net outcome is affected by several complex variables that all might have a role in determining the final outcome. Indeed, the higher NRM observed in ATG-group might outweigh the lower incidence of GVHD in the same group and could explain the detrimental impact of ATG on overall survival. In addition, patients of ATG group experienced more often fatal infections than did those of no-ATG group. As reported by Brunstein et al²³ we observed that patients of ATG-group died more often of infections and PTLN than did those of non-ATG-group. Indeed, delayed immune reconstitution following UCBT has been reported to be associated with high incidence of infection.^{3,19-21}

The impact of dose of ATG on patients' outcome was not evaluable since the type of ATG used varied among centers (Fresenius or Genzyme), and their doses are not equivalent. As reported by Lindemans et al,²⁶ in this study the time elapsed from the last day of ATG administration and graft infusion seems to have impact on survival and NRM. Despite the relatively small size of the cohort that could be analyzed for the effect of timing of ATG administration, we performed an analysis using different groups of ATG timing with similar results: the 17 patients that received ATG before D-2 had increased OS and LFS and decreased NRM when compared with the patients that received ATG closer to CB cells infusion. Although we acknowledge that is difficult to draw definitive conclusions of timing of ATG due to low number of patients and missing information, we do believe in the adverse effect of ATG and its timing. Recently, it has been described in children that the timing of ATG administration may influence UCBT outcomes and this study corroborates our findings²⁰. Moreover, the importance of ATG pharmacokinetics to determine the better therapeutic window to provide improved outcomes on UCBT is under study by other groups, highlighting the importance of timing of administration.¹⁸ Still, one could argue that other factors may be playing a role in the decision process on ATG or no ATG, like the centers' policies. To better evaluate that, we looked in our data and observed that only 7 of the 79 centers participating in this study did not follow a "pattern" of including or not ATG in the conditioning. Thus, 631 out of the 661 UCBT analyzed were performed in centers that used (or not) ATG in a homogeneous fashion for the patients included in our study.

We are aware of the retrospective nature of our study and we recognize its limitations. However, we do believe that our findings are important and potentially practice changing for transplanters. Our results suggest that the use of ATG in patients receiving UCBT following Cy/Flu/TBI200 regimen, especially if given close to graft infusion, should be avoided.

CONTRIBUTION:

LP designed research, performed research, analyzed data, and wrote the paper; LT designed research, performed research, analyzed data and wrote the paper; ALR analyzed data; BD performed research; PC performed research; PC performed research; JC performed research; NM performed research; RT performed research; EP performed research; WL performed research; HS performed research; CK performed research; AP performed research; EH performed research; HE performed research; EG designed research, analyzed data, and wrote the paper; VR designed research, analyzed data and wrote the paper; IYA designed research, analyzed data, and wrote the paper.

CONFLICT OF INTEREST-DISCLOSURE

IYA received research support and honoraria from Genzyme/Sanofi, whose product is discussed in this study.

APPENDIX

In addition to the authors, the following persons and institutions participated in this study. We are indebted to the data managers from all the Eurocord-European Blood and Marrow Transplant Group centers.

Eurocord centers: linikum Augsburg , Augsburg, Germany; Hôpital Necker, Paris, France; Hôpital Victor Dupouy, Argenteuil, France; Leiden University Hospital, Leiden, Netherlands; Klinik fuer Innere Medizin, Ulm, Germany; Imperial College, London, United Kingdom; Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark; Saint Louis University Hospital Gasthuisberg, Leuven, Belgium; Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden; Hospital Clinic, Barcelona, Spain; Children`s University Hospital, Brussels,Belgium; Royal Marsden Hospital, London, United Kingdom; Western General Hospital, Edinburgh, United Kingdom; Institut Paoli Calmette, Marseille, France; Hopital Jean Minjot, Besançon, France; Nijmegen Medical Centre,Nijmegen, Netherlands; University Medical Centre, Utrecht, Netherlands; Beatson, West of Scotland Cancer Centre, Glasgow, United Kingdom; Erasmus MC-Daniel den Hoed Cancer Centre, Rotterdam, Netherlands; Academisch Ziekenhuis bij de Universiteit, Amsterdam, Netherlands; Hôpital Henri Mondor, Creteil, France; CHU de Nantes, Nantes, France; Yorkshire Blood & Marrow Transplant Programme, Leeds, United Kingdom; Churchill Hospital, Oxford, United Kingdom; Hôpital La Miletrie, Poitiers, France; University Hospital, Upsala, Sweden; CHU de Bordeaux, Bordeaux, France; Hôpital A Michallon, Grenoble, France; Hopital Bretonneau, Tours, France; CHU d'Estaing, Clermont-Ferrand, France; Freeman Hospital, Newcastle, United Kingdom; Hôpital Claude Huriez, Lille, France; Birmingham Heartlands Hospital, Birmingham, United Kingdom; Hannover Medical School, Hannover, Germany; Ospedale di Careggi, Firenze, Italy; Medical University Graz, Graz, Austria; Rambam Medical Center, Haifa, Israel; Specialized Children`s Oncohematology Hospital, Sofia, Bulgaria; Istituto Clinico Humanitas, Rozzano Milano, Italy; Bristol Royal Hospital for Children, Bristol, United Kingdom; Queen Elizabeth Hospital, Birmingham, United Kingdom; Beilinson Hospital, Petach-Tikva, Israel; Hôpital de l'Archet, Nice, France; University Medical Center Groningen, Groningen, Netherland; Hospital Regional de Málaga, Málaga, Spain; Charité - Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany; Elisabethinen-Hospital, Linz, Austria; Az. Ospedaliera S. Croce e Carle, Cuneo, Italy; University of Milano, Milano, Italy; Ankara University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey; Evangelismos Hospital, Athens, Greece; Hôpital Purpan, Toulouse, France; Jessa Ziekenhuis, Hasselt, Belgium; University Hospital of Asturias, Oviedo, Spain; CHRU d'Angers, Angers, France; Azienda Ospedaliera Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy; CHU de Rennes,

Rennes, France; Centre hospitalier Lyon Sud, Lyon, France; Hôpital Civil, Strasbourg, France; Institut Curie, Paris, France; Universitätsklinikum Würzburg, Würzburg, Germany; Nottingham City Hospital, Nottingham, United Kingdom; Örebro University Hospital, Örebro, Sweden; Chaim Sheba Medical Center, Tel-Hashomer, Israel; Tor Vergata University of Rome, Rome, Italy; King's Denmark Hill Campus, London, United Kingdom; Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain; Royal Hallamshire Hospital, Sheffield, United Kingdom; University Regensburg, Regensburg, Germany; Ospedale Ferrarotto, Catania, Italy; Canterbury Health Laboratories, Christchurch, New Zealand; Hôpital Saint-Louis, Paris, France; CHU de Montpellier, Montpellier, France; Centre Henri Becquerel, Rouen, France; CHU d'Amiens, Amiens, France; Centre Antoine Lacassagne, Nice, France; CHRU de Limoges, Limoges, France; Hôpital Saint-Antoine, Paris, France; CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France; Hôpital Percy, Clamart, France; Hôpitaux du Brabois, Nancy, France.

BIBLIOGRAPHY

1. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N. Engl. J. Med.* 1996;335(3):157–166.
2. Rocha V, Labopin M, Sanz G, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004;351(22):2276–2285.
3. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004;351(22):2265–2275.
4. Barker JN, Scaradavou A, Stevens CE. Combined effect of total nucleated cell dose and HLA match on transplantation outcome in 1061 cord blood recipients with hematologic malignancies. *Blood.* 2010;115(9):1843–1849.
5. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med.* 1989;321(17):1174–1178.
6. Rodrigues CA, Sanz G, Brunstein CG, et al. Analysis of risk factors for outcomes after unrelated cord blood transplantation in adults with lymphoid malignancies: a study by the Eurocord-Netcord and lymphoma working party of the European group for blood and marrow transplantation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2009;27(2):256–263.
7. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, et al. Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning. *Blood.* 2003;102(5):1915–1919.
8. Ballen KK, Spitzer TR, Yeap BY, et al. Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 2007;13(1):82–89.
9. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989;86(10):3828–3832.
10. Komanduri KV, St John LS, de Lima M, et al. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood.* 2007;110(13):4543–4551.
11. Danby R, Rocha V. Improving engraftment and immune reconstitution in umbilical cord blood transplantation. *Front. Immunol.* 2014;5:68.
12. Moretta A, Maccario R, Fagioli F, et al. Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp. Hematol.* 2001;29(3):371–379.
13. Niehues T, Rocha V, Filipovich AH, et al. Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children -- a Eurocord analysis. *Br. J. Haematol.* 2001;114(1):42–48.
14. Locatelli F, Maccario R, Comoli P, et al. Hematopoietic and immune recovery after transplantation of cord blood progenitor cells in children. *Bone Marrow Transplant.* 1996;18(6):1095–1101.
15. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond.

Leukemia. 2007;21(7):1387–1394.

16. Bacigalupo A, Lamparelli T, Bruzzi P, et al. Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). *Blood*. 2001;98(10):2942–2947.
17. Mohty M, Gaugler B. Advances in umbilical cord transplantation: the role of thymoglobulin/ATG in cord blood transplantation. *Best Pract. Res. Clin. Haematol*. 2010;23(2):275–282.
18. Admiraal R, van Kesteren C, Jol-van der Zijde CM, et al. Population pharmacokinetic modeling of thymoglobulin(®) in children receiving allogeneic-hematopoietic cell transplantation: towards improved survival through individualized dosing. *Clin. Pharmacokinet*. 2015;54(4):435–446.
19. Storek J, Mohty M, Boelens JJ. Rabbit Anti-T Cell Globulin in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant*. 2014;
20. Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ, et al. Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood*. 2007;110(8):3064–3070.
21. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974;18(4):295–304.
22. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am. J. Med*. 1980;69(2):204–217.
23. Gooley TA, Leisenring W, Crowley J, Storer BE. Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representations of old estimators. *Stat. Med*. 1999;18(6):695–706.
24. Fine JP, Gray RJ. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J. Am. Stat. Assoc*. 1999;94(446):496–509.
25. Sanz J, Boluda JCH, Martín C, et al. Single-unit umbilical cord blood transplantation from unrelated donors in patients with hematological malignancy using busulfan, thiotepa, fludarabine and ATG as myeloablative conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(10):1287–1293.
26. Lindemans CA, Chiesa R, Amrolia PJ, et al. Impact of thymoglobulin prior to pediatric unrelated umbilical cord blood transplantation on immune reconstitution and clinical outcome. *Blood*. 2014;123(1):126–132.
27. Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, et al. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood*. 2000;96(8):2717–2722.
28. Gluckman E, Rocha V, Arcese W, et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp. Hematol*. 2004;32(4):397–407.
29. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N. Engl. J. Med*. 1998;339(22):1565–1577.

Table 1. Patients, transplant and graft characteristics according to the use of ATG in the CFT regimen for UCBT in adults with hematologic malignancies

Characteristics	Non-ATG group (n=579)	ATG group (n=82)	Total (N=661)	P Value [‡]
Patient-related				
Age at UCBT				
Median	52	54	52	0.068
Range	18-69	19-72	18-72	
Male sex- n (%)	289 (50)	49 (60)	338 (51)	0.10
R-CMV serostatus at transplant - n (%)	338 (60)	54 (67)	392 (61)	0.18
Diagnosis - n (%)				
Acute leukemias	294 (51)	40 (49)	334 (51)	0.009
MDS/MPD or CML	101 (17)	25 (31)	126 (19)	
Lymphoproliferative disorders	184 (32)	17 (21)	201 (30)	
Disease status at UCBT - n (%)				
Advanced	245 (43)	44 (54)	289 (44)	0.063
CR1/2	328 (57)	38 (46)	366 (56)	
Previous ASCT - n (%)	180 (32)	19 (23)	199 (30)	0.12
Graft-related				
Single UCBT - n (%)	197 (34)	29 (35)	226 (34)	0.81
HLA compatibility - n (%)§				
6/6 or 5/6	152 (28)	21 (30)	173 (29)	0.76
<= 4/6	386 (72)	49 (70)	435 (72)	
ABO incompatibility -n (%)				
Compatibles/minor	152 (29)	10 (20)	162 (28)	0.21
Major	374 (71)	39 (80)	413 (72)	
Sex mismatch –n (%)	187 (33)	36 (47)	223 (35)	0.013
TNC collected- median (range)	4,42 (0.41-12.21)	4,14 (1.99-13.67)	(0.41-13.67)	0.51
TNC infused - median (range)	3,5 (0.38-9.44)	3,54 (1.1-6.6)	(0.38-9.44)	0.95

‡ The chi-square test was used for categorical variables, and the Mann-Whitney nonparametric test for continuous variables.

§ HLA compatibility was analyzed by serology or low-resolution typing level for HLA-A and -B and by allelic (DNA) or high-resolution typing for HLA-DRB1.

ATG means antithymocyte globuline; CTF, cyclophosphamide+fludarabine+TBI; UCBT, unrelated umbilical cord blood transplantation.

Table 2. Multivariate Analyses for Outcomes after UCBT for adults with hematologic malignancies according to the use of ATG in the Cy/Flu/TBI200 regimen.

Characteristics	3-year Overall Survival			3-year NRM			Acute III-IV GVHD		
	HR	95% CI	<i>P</i> *	HR	95% CI	<i>P</i> *	HR	95% CI	<i>P</i> *
ATG in conditioning									
No	1			1			1		
Yes	1.69	[1.19 – 2.41]	0.003	1.68	[1.16-2.43]	0.0009	0.31	[0.17-0.55]	0.000

* CI denotes confidence interval.

Table 3. Causes of death of the two groups			
	Use of ATG		p value*
	No	Yes	
Relapse or progression (n,%)	158 (27)	20 (24)	0.58
Cause of Non-relapse mortality (n,%)	148 (25)	37 (45)	0.0002
Infections	76 (13.1)	23 (28)	0.0013
bacterial	26 (4.5)	5 (6.1)	
viral	18 (3.1)	6 (7.3)	
parasitical	4 (0.7)	3 (3.7)	
fungal	12 (2.1)	2 (2.4)	
unknow	16 (2.8)	7 (8.5)	0.016
PTLD	3 (0.5)	5 (6.1)	0.001
Pulmonary toxicity	2 (0.3)	2 (2.4)	
CNS toxicity	9 (6.1)	1	
GVHD	25 (16.9)	2	0.56
Hemorrhage	4	-	
Multiorgan failure	5	-	
Renal toxicity	3	-	

PTLD denotes post-transplant lymphoproliferative disorder, CNS: central nervous system and GHVD: graft-versus host disease; * The P value for overall causes of death is < 0.001 and was determined by Fisher 'exact test

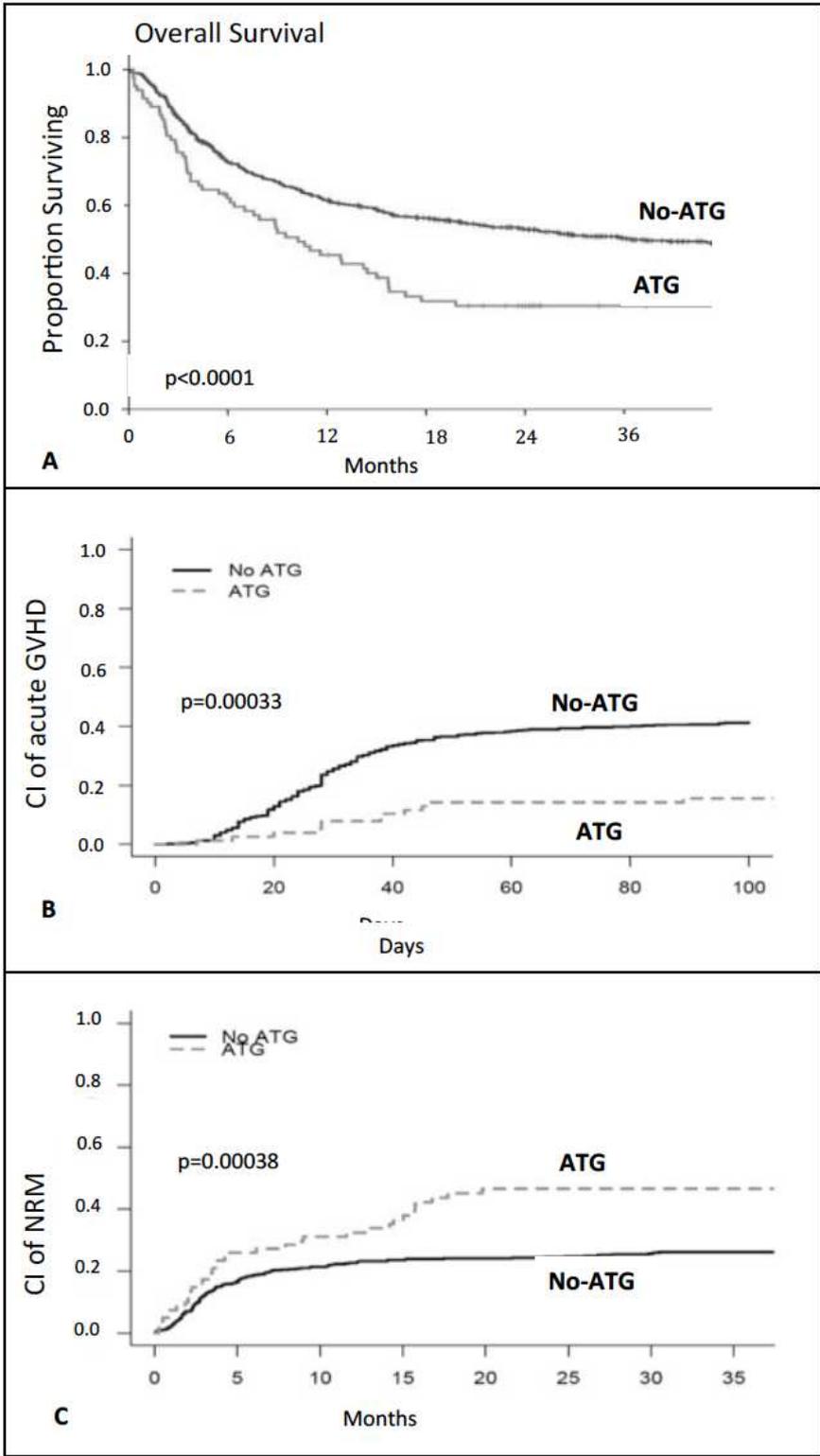


Figure 1. Outcome after transplantation of cord blood according to the presence or absence of ATG in conditioning. The unadjusted cumulative incidence of overall survival (Panel A), acute-graft versus-host disease (Panel B), and non relapse mortality (Panel C) is shown after cord-blood transplantation after reduced-intensity conditioning.

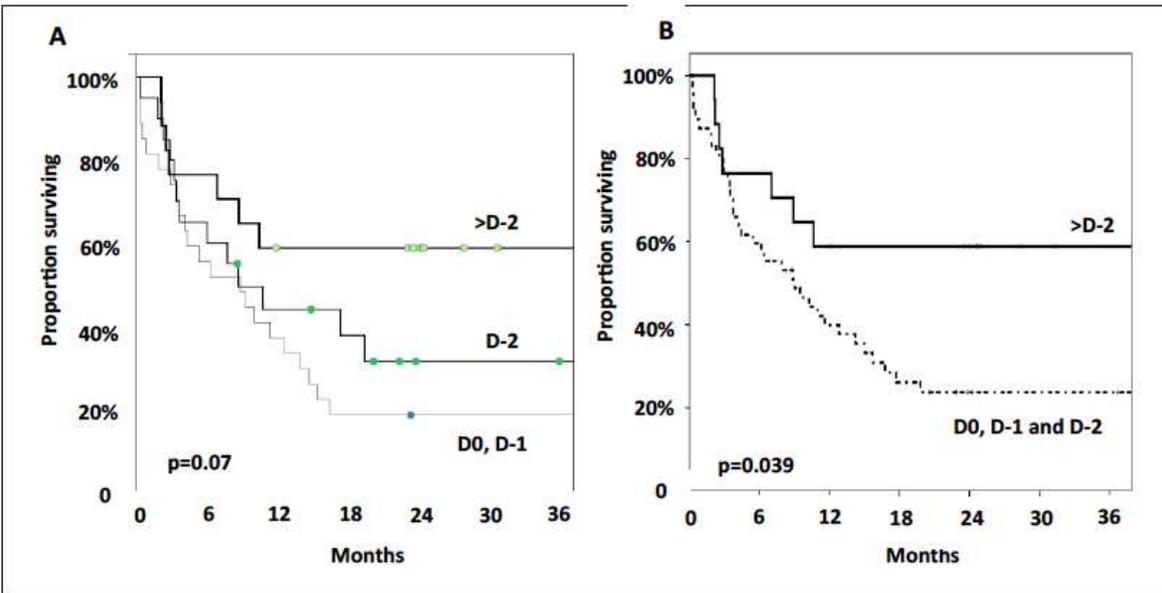


Figure 2: Impact of the timing of the last ATG infusion on survival, (A) the day of transplant and the day before (D0, D-1) versus two days before the transplant (D-2) versus more than two days before the transplant (>D-2); (B) within two days before the transplant (D0, D-1 and D-2) versus more than two days before the transplant.

Annexe 3

A Low Effective Dose of Interleukin-7 is Sufficient to Maintain Cord Blood T Cells Alive without Potentiating Allo-Immune Responses

Laurent Pascal ^{1,2}, Bénédicte Hivert ³, Jacques Trauet ², Eva Deberranger ³, Jean-Paul Dessaint ², Ibrahim Yakoub-Agha ^{2,3}, Myriam Labalette ²

¹ *Service d'Onco-hématologie, Université Catholique de Lille, Lille, France*

² *EA2686, Université Lille Nord de France, UDSL Faculté de Médecine, Laboratoire d'Immunologie HLA, CHRU de Lille, Lille, France*

³ *UAM Allogreffe de CSH, CHRU de Lille, Lille, France*

Correspondence:

Prof. Myriam Labalette, MD, PhD
EA2686, Laboratoire d'Immunologie HLA,
Centre de Biologie - Pathologie du CHRU de Lille
Boulevard du Professeur Jules LECLERCQ
59037 LILLE CEDEX
France
Tel : ++333(0)20.44.55.74
Fax : ++333(0)20.44.69.54
E-mail : myriam.labalette@chru-lille.fr

ABSTRACT

Slow reconstitution of T cell immunity remains a critical issue after umbilical cord blood (CB) transplantation. While this may be a consequence of the low cell dose, it may also reflect the propensity of naïve T cells, which predominate in CB, to undergo apoptotic cell death. Exogenous interleukin 7 (IL-7) can prevent apoptosis of naïve T cells, but at high concentrations, IL-7 may also expand alloreactive T cells, thereby aggravating the risk of graft-versus-host disease. We evaluated the survival of CB T cells from 34 healthy full-term pregnancies, and found wide inter-donor variations: from 17.4 to 79.7% CB T cells were still alive after being rested for 4 days in culture medium without cytokine supplementation. The viability of CB T cells was negatively correlated to infant birth weight (Spearman's $\rho = 0,376$; $p = 0.031$) and positively correlated to venous CB pH ($\rho = 0.397$; $p = 0.027$); both associations were confirmed by multivariate analysis ($p = 0.023$ and $p = 0.005$, respectively). A low supplemental concentration (100 pg/mL) of recombinant human IL-7 was sufficient to maintain the viability of cryopreserved/thawed CB T cells, with most (>80%) cells remaining in a quiescent state, and without significant changes in their CD4/CD8 ratio and the proportion of CD4⁺ CD31⁺ PTK7⁺ recent thymic emigrants. IL-7 at 100 pg/mL did not led to any significant enhancement of the alloreactive response of CB T cells, as evaluated by proliferation rates (thymidine incorporation and CFSE dilution) and interferon-gamma production (ELISPOT). This effective concentration of IL-7 is far lower than that obtained in vivo after pharmacological administration of the cytokine. This study suggests that administration of lower doses of recombinant human IL-7 than used in previous clinical trials may be sufficient to sustain the viability of infused CB T cells and thus help to accelerate naïve T cell reconstitution without potentiating their alloreactivity.

Key Words: Cord Blood T cells, Interleukin-7, alloreactivity

INTRODUCTION

Slow reconstitution of T cell adaptive immunity and graft-versus-host disease (GvHD) remain critical issues after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). Compared with conventional allografts from matched unrelated donors, umbilical cord blood (CB) transplantation may allow a greater degree of HLA disparities, but often leads to a more gradual immune reconstitution.^{1,2} T cells brought by CB grafts are almost exclusively naïve, include a high proportion of functionally immature recent thymic emigrants (RTEs), and are particularly prone to apoptosis.^{3,4} Together with a relatively low graft nucleated cell dose, infusion of apoptosis-prone T cells would likely lead to their shortened survival in the host, which suggests that the long-lasting immunodeficiency following CB transplantation may be due, in part, to the rapid disappearance of most of the infused T cells.

Interleukin-7 (IL-7) is a major homeostatic cytokine essential to naïve T cell survival, as well as homeostatic expansion of T cells,⁵ which is the primary process involved in the first months of immune reconstitution and remains the main contributor to reconstitution in adult recipients, particularly the older ones. Peak circulating levels of IL-7 in the nanogram per milliliter range are obtained after administration of recombinant human IL-7 to improve in T-cell recovery in lymphopenic patients.^{6,7} Such a high concentration is reportedly effective at preventing resting CB T cells from death in culture^{8,9} and may induce a variable capacity to produce interferon- γ and other cytokines upon in vitro stimulation.¹⁰ High IL-7 concentrations may expand alloreactive and autoreactive T cells,¹¹ however, which may induce and/or potentiate GvHD, as indicated both by preclinical models,¹² and by the association found in some clinical studies between high systemic IL-7 levels and acute GvHD rates.^{13,14} With this in mind, we sought to investigate whether lower IL-7 concentrations could suffice to maintain CB T cell viability without exaggerating their activation and alloreactivity. We observed a broad individual variation in survival of CB T cells from term placentas, and demonstrated that culture of cryopreserved/thawed CB T cells in the presence of 0.1 ng/mL of recombinant human IL-7 could be sufficient to sustain T cell viability without boosting the allo-immune response.

MATERIALS AND METHODS

CB and adult peripheral blood cell isolation

The CB and adult peripheral blood samples were collected under the ethical approval of the Lille University Hospital Human Research committee (DC 2011-1288). Umbilical CB (50 to 100 mL) was obtained from 34 healthy full term neonates (38 to 42 weeks of gestation) immediately after uncomplicated vaginal delivery of a low-risk pregnancy and single gestation, using methods which met the standards for the collection for CB banking and after signed informed consent from the mothers. Birth characteristics were collected (Table 1). CB plasma samples were analyzed using a high-sensitivity ELISA (IL-7 highly-sensitive Quantikine ELISA kits, R&D systems, Minneapolis, MN, USA). Mononuclear cells were isolated by standard Ficoll-paque (GE, Uppsala, Sweden) density-gradient centrifugation within 3 hours after CB collection, washed in phosphate buffered saline, and then either used directly or suspended in freezing medium (Recovery Cell Culture Freezing Medium, Gibco, Invitrogen, Oslo, Norway) containing 10% DMSO and cryopreserved in liquid nitrogen. Cryopreserved cells were kept frozen for 4 months on average (15 days to 1 year), and then thawed quickly in a 37°C water bath and washed immediately before use in RPMI medium containing 1 mM of ethylenediamine tetraacetic acid. T cells were isolated from fresh or cryopreserved/thawed CB mononuclear cells by negative immunomagnetic selection (EasySep Human T cell Enrichment kit, StemCell Technologies, Vancouver, Canada), yielding >95% CD3⁺ cells by flow cytometry. Mononuclear cells and T cells were similarly purified from peripheral blood from consenting healthy adults and were used as controls and to isolate allogeneic stimulators by negative immunomagnetic selection (EasySep Monocyte Enrichment kit, StemCell Technologies).

Immunophenotypic analysis of CB T cells

CB T cell populations were analyzed before and after different times of culture. All directly conjugated antibodies and isotype controls were from Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), with the exception of the monoclonal antibody to CD127 (IL-7 receptor alpha chain) from eBioscience (Paris, France), and the monoclonal antibody to protein tyrosine kinase-7 (PTK7) from Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Germany). Live-gated lymphocytes were simultaneously acquired with internal bead standards (Flow-Count fluorospheres; Beckman Coulter) by multiparameter flow cytometry (Navios, Beckman

Coulter) to obtain absolute cell counts. Expression of CD127 and CD31 was evaluated by determining the proportion of cells with positive staining and their mean fluorescence intensity. Cell viability was assessed by flow cytometric scatter analysis and co-labeling with 50 nM 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC₆(3); Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as instructed by the manufacturers. To determine whether cultured cells had undergone cellular proliferation, CB T cells (1×10^6 /mL) were first pulsed with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, 5 μ M; Invitrogen), then quenched with 50% fetal calf serum and washed two times in phosphate buffered saline before initiation of cultures. The population of cells that have undergone successive cellular divisions was characterized by serial halving of the fluorescence intensity.

Unstimulated CB T cell cultures

Unstimulated CB T cell cultures were established at 1×10^5 /well in round bottom 96-well plates in complete RPMI medium containing 2 mM L-glutamate, 2 mM pyruvate, 10% heat-inactivated human AB serum (J. Boy Institute, Reims, France) and antibiotics. Depending on the experiments, cultures of CB T cells were either matched with cultures of adult T cells or run in parallel in the presence or absence of recombinant human IL-7 (R&D systems) at an initial concentration of 25 to 1000 pg/mL, with additional IL-7 added daily thereafter at the same concentration. After different times of culture at 37° C and 5% CO₂, the number of viable cells and cellular proliferation were determined as described above.

One-way mixed lymphocyte reactions (MLRs)

MLRs were established in triplicate using unlabeled or CFSE-labeled CB T cells (1×10^5 cells/well) as responders. Allogeneic monocytes from adults with 4-6/6 HLA disparities with the responders, including at least one HLA-DR disparity, were chosen as stimulators (1×10^4 cells/well). HLA typing for A, B, and DR loci was done in our Tissue Typing Laboratory. Proliferation was assessed after 5 days by CFSE dye-dilution or by pulsing with methyl ³H-thymidine (18.5 kBq/well; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) for the final 18 hrs of the culture and microbeta scintillation counting (TopCount Microplate Scintillation Counter, PerkinElmer). Interferon- γ enzyme-linked immunosorbent spot assays (IFN- γ ELISPOT) were performed with 2×10^5 viable cells harvested after 7 days from the triplicate MLR cultures

and recultured for an additional 20 hr in immunospot plates coated with a monoclonal antibody to IFN- γ (TB-SPOT TB, Oxford Immunotech, Oxford, UK). IFN- γ spots were enumerated by using TB Scan software (Immunoscan, CTL-Europe, Bonn, Germany).

Statistical analysis

Where appropriate, comparisons were made using the Mann-Whitney U-test or the Kruskal-Wallis test with Dunn post-test evaluation, and the Wilcoxon signed rank test for pairwise comparisons. Correlations were based on Spearman's ρ . Multivariate analysis (General linear model analysis) was used for association between multiple variables.

RESULTS

Wide interdonor variations in CB T cell viability in unstimulated cultures

More than 98% of freshly collected or cryopreserved/thawed CB T cells were viable (DiOC₆(3)-positive and IP-negative) prior to culture. As expected, freshly collected CB T cells left unstimulated lost their viability very quickly after incubation in culture medium supplemented with 10% human AB serum, but devoid of exogenous cytokines, in contrast with the marginal decrease of viable adult blood T cell numbers over one week of culture in the same conditions. There was, however, substantial variability among CB specimens in the proportion of cells still alive after 4 days of culture (17.4–79.7%) (Figure 1A). A similar or slightly accentuated loss of viability in culture was observed when cryopreserved/thawed CB T cells were compared to freshly isolated CB T cells. Variations in T cell viability were as wide after freeze, thaw, and 4 days of culture as with fresh cells from the same CD donor ($\rho = 0.785$, $p < 0.001$).

Among the set of CB donor characteristics listed in Table 1, only two significant correlations with the viability of T cells measured at day 4 were evidenced: a negative correlation to infant birth weight ($\rho = 0.376$; $p = 0.031$) and a positive correlation to venous CB pH ($\rho = 0.397$; $p = 0.027$). Both associations were confirmed by multivariate analysis ($p = 0.023$ and $p = 0.005$, respectively). IL-7 is a major factor for T cell survival. Its circulating levels are elevated in lymphopenic patients, and, conversely, impaired viability of CB T cells might reflect low in vivo exposure to the cytokine. IL-7 levels were therefore measured in CB to investigate whether the variability in CB T cell survival was associated to a corresponding variability in CB IL-7 levels. Although the range of IL-7 levels in CB plasma was broad (0–

6.67 pg/mL; Table 1), there was no statistically significant correlation with resting CB T cell viability, and the range of IL-7 levels is as broad as in adults.^{13,14}

Daily supplementation with a low concentration of IL-7 can sustain survival of cryopreserved/thawed CB T cells

In these preliminary experiments, CB T cells were maintained in classic culture medium containing 10% normal human serum, thus with 1/10th as many IL-7 as in peripheral blood. Unstimulated T cell cultures were therefore established under the same conditions except for the addition of recombinant human IL-7. Since cryopreserved umbilical CB cells are commonly used for transplantation, all following experiments we run with cryopreserved/thawed CB T cells. As expected, when recombinant IL-7 was added only once at the time of seeding, more viable CB T cells were recovered over the first days than without cytokine addition, but the protective effect was short-lived, and by 4 to 5 days viable T cell recovery was almost as low as in cultures initiated without IL-7. This transient effect is presumably attributable to consumption and/or degradation of IL-7, because its concentration measured over sequential time points in the cell culture supernatants was found to decrease to undetectable levels over 5 days (data not shown).

The effect of daily IL-7 replenishment was therefore investigated. Cryopreserved/thawed CB T cells were split and cultured in parallel with or without daily addition of IL-7. A proportionate increase in the viability of the resulting population was obtained, reaching a plateau with most cells still alive after 7 days of culture fed daily IL-7 at 100 pg/mL (Figure 2A). The number of viable CB T cells after 7 days of daily IL-7 supplementation was correlated with concomitant high level of IL-7 receptor alpha chain expression, as determined by mean fluorescence intensities in flow cytometric analyses at this time point ($\rho = 0.93$; $p = 0.0002$) (data not shown). The proportion of the original CB T cells that went on to divide was of limited amplitude, since less than 20% of the resulting population was cycling, but had undergone only one cycle of division over the 7 days of culture with 100 pg/mL of IL-7 added daily (Figure 2B). With greater IL-7 concentrations (250 pg/mL daily), more CB T cells were actively cycling and many had undergone several cycles of division, albeit without furthering overall cell viability (figure 2B). The proportions of viable cells recovered remained equally distributed over the CD4⁺ and the CD8⁺ subsets, so that the CD4/CD8 ratio was fairly constant over 7 days across the range of IL-7 concentrations tested

(data not shown). RTEs were identified among CD4⁺ T cells by way of their surface co-expression of CD31 and PTK7.^{3,15,16} There was no significant difference in the relative proportion of CD31⁺ PTK7⁺ CD4⁺ T cells cultured for 7 days with or without daily IL-7 addition (data not shown).

Limited alloreactivity of cord blood T cells in culture with daily IL-7 supplementation.

To assess whether low concentrations of IL-7 could influence T cell allo-immune responses, cryopreserved/thawed CB T cells were co-cultured with HLA-mismatched stimulator cells from adult donors. Globally, thymidine incorporation was changed marginally if IL-7 was fed daily at 50 or 100 pg/mL as compared to paired one-way MLRs run without IL-7 supplementation (Figure 3A). Consistent with this limited, if any, effect on the proliferative alloresponse, no more interferon- γ producing cells were induced with daily IL-7 supplementation than without it (Figure 3B). A modest but statistically significant increase in the absolute number of viable lymphocytes recovered at the end of MLRs fed IL-7 daily over that without the cytokine was evidenced, however (median change: +58%; $p = 0.0001$) (Figure 3C). To get further insight, alloantigen-induced responses were measured in flow cytometry-based MLR assays. Gating separately upon small lymphocytes and lymphoblasts combined with CFSE dilution profiles indicated that daily IL-7 supplementation improved significantly the recovery of viable non-cycling cells ($p = 0.007$), while the numbers of cells that had undergone one or several cellular divisions or cell enlargement were not significantly increased (Figure 4).

DISCUSSION

Unlike mature T cells from conventional allografts, CB T cells are characterized by a rapid rate of cell death in culture, which may translate into an impaired rate and quality of immune reconstitution following transplantation. In this study, we show that the viability of resting T cell is highly variable among CB specimens and that CB T cell viability can be maintained by a low supplemental concentration of recombinant human IL-7 without boosting the allo-immune response.

All the 34 umbilical CB samples included in this study were collected immediately after delivery of full-term infants, using a process which met the standards for banking, and only logistical constraints had pushed these specimens out of banking. To avoid any bias, mononuclear cells were isolated by negative immunomagnetic selection within three hours after collection. Whether freshly collected or cryopreserved/thawed, >98% of CB T cells were viable prior to culture, but most of them died readily when rested in culture without cytokine supplementation. These data extend previous findings^{4,17} to show that the proportion of resting CB T cells undergoing apoptosis is highly variable among donors, since half or more CB T cells from some specimens were still alive on day 4, whereas almost all T cells from other donors had died. From a practical point of view, determination of the initial viability of CB T cells before cryopreservation cannot therefore predict their resistance to apoptosis. Paradoxically, CB plasma levels of IL-7 were not significantly correlated with resting T cell survival, although some specimens had levels under the detection threshold. However, plasma levels may not accurately reflect IL-7 availability in fetal tissues wherein the cytokine is produced by stromal cells and utilized by peripheral T cells.⁵ Among all donor characteristics and subset composition of CB T cells, only birth weight and CB venous pH were significantly associated in univariate and multivariate analyses to resting CB T cell viability on day 4. Birth weight is known to be correlated with perinatal and long term outcomes.¹⁸ Mononuclear cell count in CB is known to be negatively correlated with CB pH,¹⁹ which suggests that fetal hypoxic conditions may compromise cell survival or at least exaggerate the propensity of CB T lymphocytes to undergo apoptosis. Although a rest period in culture cannot mimic the in vivo post-infusion conditions exactly, our results raise therefore some questions about banking umbilical CB from infants with low birth weight and/or low umbilical venous pH.

Building on the well accepted capacity of exogenous IL-7 to prevent apoptosis of naïve T cells and RTEs,^{8,9} but also to lower the threshold for T cell activation with the possible risk of exaggerating alloreactivity,¹¹ we evaluated the survival of CB T cells in the presence of a range of concentrations of recombinant human IL-7. Since we found that survival was significantly correlated between freshly collected and cryopreserved/thawed T cells from the same donors, cryopreserved/thawed cells were tested, given that umbilical CB units are cryopreserved for use. The best prosurvival effect was obtained with daily supplementation with a low concentration of IL-7 (100 pg/mL), allowing to recover almost as many viable T cells as set up in culture. This fairly constant cell count over the seven days in unstimulated cultures can be attributed to maintenance of viability and not death retardation by IL-7, since cell viability was monitored by staining with DiOC₆(3), the uptake of which is lost at the early stage of apoptosis. Only a few cells (<20%) were cycling after seven days in culture, a culture period long enough to evaluate cell-cycle entry.⁴ Conversely, more cells proliferated when higher concentrations of IL-7 were tested, albeit with no gain of viability. With 100 pg/mL IL-7 daily, expression of the IL-7 receptor alpha chain was preserved after 7 days of culture, indicating that this low concentration of IL-7 had not induced a substantial down-regulation of alpha chain expression, and that CB T cells were keeping their capacity to bind the cytokine. The CD4/CD8 ratio and the relative proportion of CD31⁺ PTK7⁺ were preserved just as well, consistent with the fact that both RTEs and naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells express high levels of IL-7 receptor alpha chain. These results suggest that a low effective dose of IL-7 has exerted a fairly homogeneous prosurvival effect on both immature (RTEs) and mature CB T cell populations, and confirm that most cells remained quiescent, given that surface PTK7 expression would have been lost upon cytokine-induced cycling.³

Despite running one-way MLRs with highly immunogenic stimulators (at least 4/6 mismatches with at least one HLA-DR disparity), daily supplementation with 100 pg/mL of IL-7 did not led to any significant enhancement of the alloreactive immune response, as evaluated both by the proliferation rate (³H-thymidine incorporation and CFSE dilution) and the production of interferon- γ (ELISPOT). However, slightly more lymphocytes were viable at the end of one-way MLRs fed IL-7 than without the cytokine. Comparison of absolute cell counts and CFSE dilution profiles by gating separately allowed attributing this increase to the survival of a greater number of small undivided lymphocytes, in line with the prosurvival

effect of IL-7 discussed above, while the number of enlarged or already divided cells was not significantly different between MLRs run with and without IL-7.

Altogether, these data indicate that daily supplementation with a low dose of IL-7 can promote CB T cell survival much more than cell-cycle entry and expansion. Neonatal T cells are known to be highly sensitive to IL-7.^{3,12} Maintenance of T cell quiescence by a low dose of IL-7 is consistent with reports showing that the signaling threshold for the prosurvival effect of IL-7 is lower than for continuous down-regulation of IL-7 receptor alpha chain expression, cell-cycle entry, and proliferative expansion.¹⁷ Others have reported that IL-7 feeding to sustain CB T cell survival was required only at the time of seeding,¹⁷ however their experiments were run in fetal calf serum, a better supportive supplementation for human T cell cultures than pooled human AB sera,²⁰ but which is of course not physiologically found in humans. Daily supplementation may be required because the cytokine is consumed and/or degraded rapidly in the culture, so that daily feeding will lead to peak and trough levels, in accordance with the fact that intermittent IL-7 signaling, as it is experienced in vivo, maintains the quiescence and survival of naïve T cells.²¹ This effective concentration is one or two logs lower than the peak levels obtained after pharmacological administration of the cytokine in clinical trials,^{6,7} and somewhat higher than peak levels of endogenous IL-7 in the peripheral circulation after myeloablative conditioning,^{5,10,12,21,22} but as mentioned above, circulating levels do not accurately estimate IL-7 availability in tissular sites. In fact, the effective concentration of IL-7 found to keep CB T alive in our study is equivalent to the upper estimate of in vivo homeostatic IL-7 tissular concentrations in lymphoreplete mice,²⁴ thus in physiological conditions where the vast majority of naïve T cells remains quiescent.

Recombinant human IL-7 has recently been tested in the allo-HSCT setting, showing an encouraging improvement in T cell recovery without increased incidence of high grade acute GvHD at the high plasma IL-7 concentration obtained (nanogram/mL range).⁷ Since T cell-depleted allografts were given in this trial, the risk of boosting alloreactivity by a course of IL-7 after unmanipulated allografts cannot be ruled out. From a clinical immunotherapy perspective, preserving the survival of infused T cell is particularly desirable after umbilical CB transplantation. Even though in vitro cultures cannot provide perfect replicas of in vivo processes, our data suggest that administration of lower doses of recombinant human IL-7 than used in previous trials may be sufficient to sustain the viability of infused CB T cells

without potentiating their alloreactivity, and thus help to accelerate naïve T cell reconstitution while minimizing the potential adverse effects of allo-immune responses.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial disclosure: Supported by the International Research Group on Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation (IRGHET) and the EA2686 (Equipe d'accueil 2686).

Conflict of interest statement: There are no conflicts of interest to report.

Authorship statement: L.P. performed research, analyzed the data and wrote the manuscript, B.H., J.T. and E.D. performed research, I.Y.A. interpreted the data; J.P.D. interpreted the data and wrote the manuscript, M.L. designed research, interpreted the data, and wrote the manuscript.

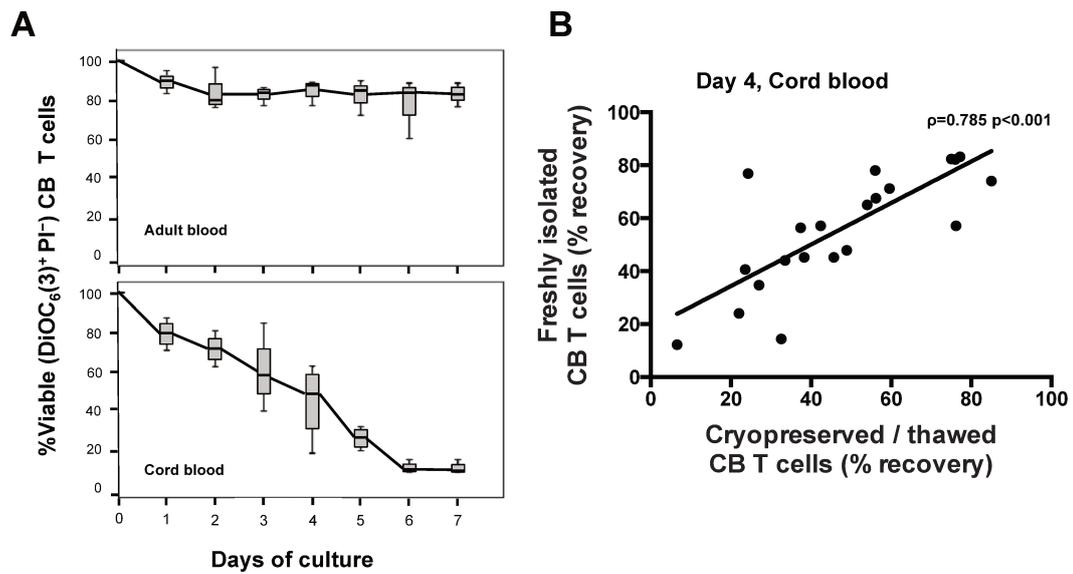


Figure n° 1

Figure 1. Loss of cord blood (CB) T cell viability in unstimulated cultures. Recovery of viable cells (DiOC₆(3)-positive and propidium iodide (PI)-negative) is plotted as a percentage of the number of cells seeded. **(A)** Difference in cell viability between T cells freshly isolated from adult blood (upper panel) and from CB (lower panel). All cultures (6 adult donors, 15 CB) were run in parallel for periods ranging between 1 and 7 days, as indicated. Data are presented as medians (central bar), 25th and 75th percentiles (box), and whiskers (within 1.5 times the interquartile range). **(B)** Cell viability after 4 days of culture of freshly collected CB T cells compared to viability of cryopreserved/thawed T cells from the same CB donor (21 term healthy donors).

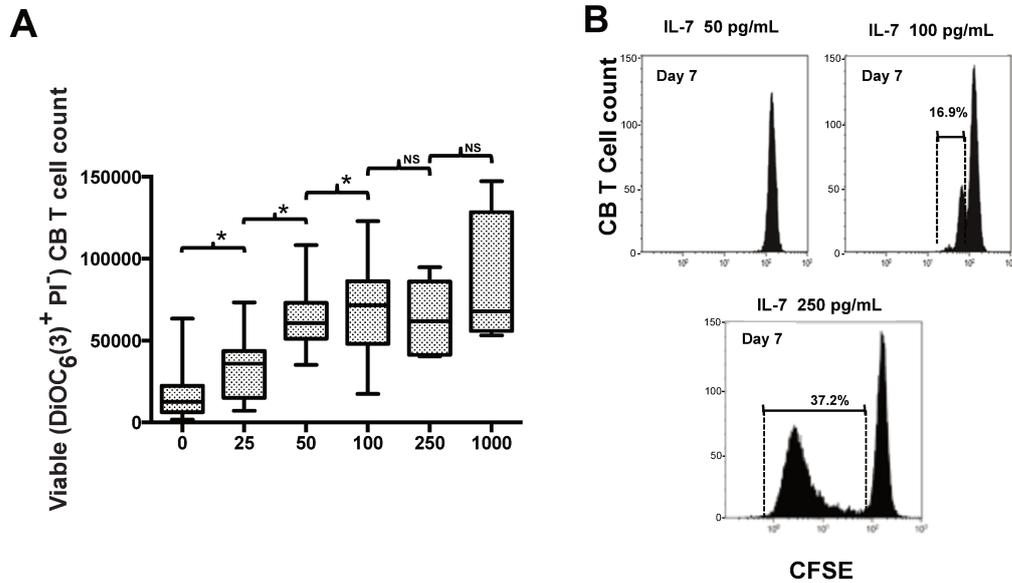


Figure n° 2

Figure 2. Exogenously supplied recombinant human interleukin-7 (IL-7) sustains cryopreserved/thawed cord blood (CB) T cell survival. **(A)** Absolute counts of viable cells (DiOC₆(3)-positive and PI-negative) from 17 CB donors, seeded at 1×10^5 T cells/well and cultured for 7 days with or without daily supplementation of IL-7 at the indicated concentration. Data are presented as box and whisker plots as described in Figure 1. Significant differences are indicated by asterisks; $*p < 0.05$. **(B)** Flow cytometric analysis of CB T cell proliferation after 7 days of culture of CFSE-labeled T cells supplemented daily with IL-7 at 25, 50 pg/mL, 100 pg/mL, 250 pg/mL and 1000 pg/mL as indicated. Representative result of one of 17 experiments.

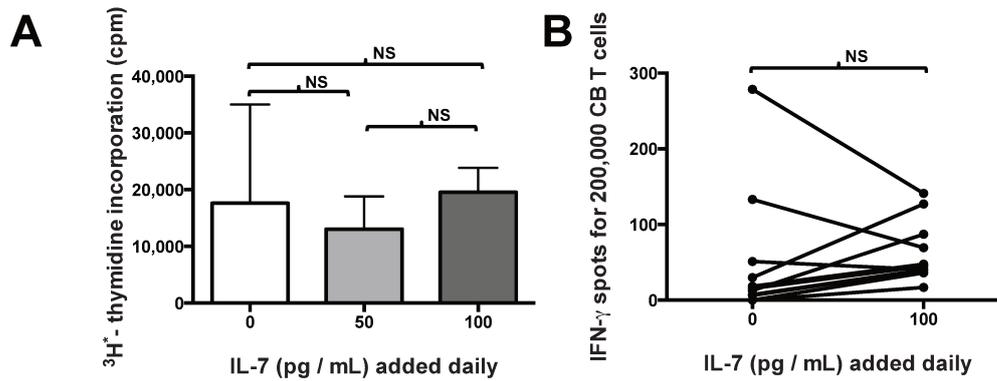


Figure n°3

Figure 3. Limited potentiation of cord blood (CB) T cell alloreactivity by daily supplementation of recombinant human interleukin-7 (IL-7). One-way mixed lymphocyte reactions (MLRs) were set up in triplicate with cryopreserved/thawed CB T cells (1×10^5 cells/well) and allogeneic stimulators from adult donors (4 to 6 out of 6 HLA mismatches, including at least one HLA-DR disparity). Due to the limited number of CB T cells, MLR cultures using the same combination of stimulator and responder cells could be run in parallel with and without only one concentration of IL-7 (7 MLRs with IL-7 at 50 pg/mL and 9 MLRs at 100 pg/mL). **(A)** ³H-thymidine incorporation at the end of 5 day MLRs. Data are presented as box and whisker plots as in Figure 1. **(B)** Interferon- γ ELISPOT performed with 2×10^5 viable CB T cells harvested at the end of one-way MLR cultures. The results are expressed as number of spots from MLRs initiated with CB T cells from 11 donors, run for 5 days without or with IL-7 supplied daily at 100 pg/mL. NS, not significant.

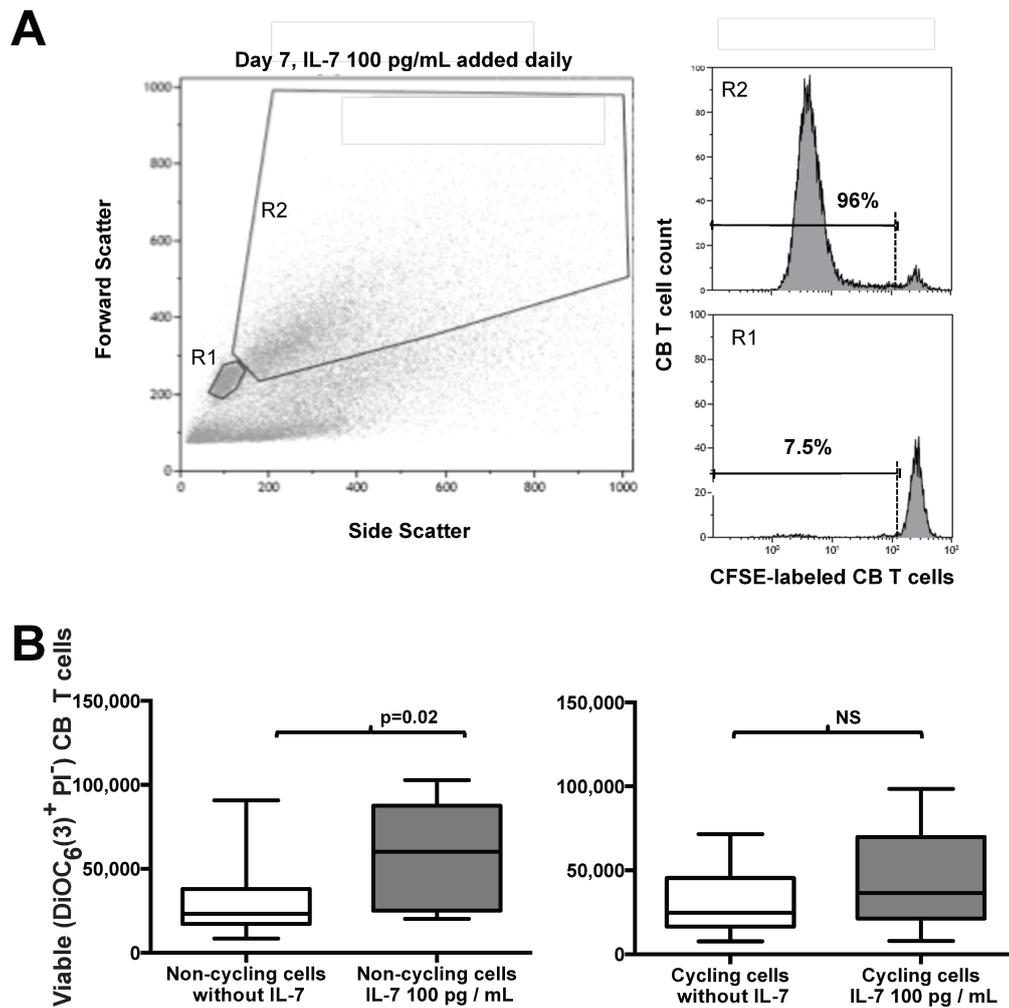


Figure n°4

Figure 4. Daily addition of recombinant human interleukin-7 (IL-7) (100 pg/mL) sustains the survival of non-cycling cord blood (CB) T cells without potentiating the alloresponse in one-way mixed lymphocyte reactions (MLRs). Cryopreserved/thawed CFSE-labeled CB T cells (1×10^5 cells/well) were co-cultured with allogeneic stimulators from adult donors (4 to 6 out of 6 HLA mismatches with at least one HLA-DR disparity), with or without IL-7 fed daily at 100 pg/mL. **(A)** Gating strategy used to define the responder and the nonresponder CB T cells. Left panel: forward and side scatter characteristics of cells harvested after 7 days of MLR culture with IL-7. The R1 gate was set to include small lymphocytes while excluding dead cells and debris and the R2 gate to include cells with a larger forward/side scatter profile (lymphoblasts). Right panel: fluorescence intensity of CFSE, using gating

separately on the small cell window (R1) and the large cell window (R2). **(B)** Absolute numbers of non-cycling (small lymphocytes with undiluted CFSE dye) and of cycling cells (all cells with diluted CFSE dye and large lymphocytes with still undiluted CFSE dye) recovered after 7 days of MLRs initiated with T cells from 13 different CB donors. Data presented as box and whisker plot as described in Figure 1; NS, not significant.

Table 1: Analysis of the association between clinical characteristics of cord blood (CB) donors and the viability of their CB T cells after four days in complete culture medium without exogenous cytokine supplementation.

	Median (range)	Correlation with CB T cell viability ^a			
		Spearman's ρ	p value	β^b	p value
Gestational age at partition (wks.)	40 (37.8-42)	0.022	NS		NS
Infant birth weight (kg)	3.49 (1.98-4.43)	-0.376	0.031	-0.471	0.023
Infant gender (M/F) ^c	12 / 22		NS		NS
Apgar score	10 (2-10)	0.054	NS		NS
Venous CB pH	7.37 (7.14-7.48)	0.397	0.027	0.609	0.005
CB plasma IL-7 level (pg/mL) ^d	0 (0-6.67)	0.335	NS		NS
RTE: CD4 ⁺ CD31 ⁺ PTK7 ⁺ cells (%)	76.6 (61-85)	-0.59	NS		NS

CB= Cord Blood; NS= Not Significant; RTE= Recent thymic emigrant

^a cryopreserved CB T cells were thawed and maintained in complete culture medium without addition of exogenous cytokines, and viable cells (DiOC₆ (3)-positive and PI-negative) were enumerated after four days.

^b Multivariate analysis by using the general linear model. Only values achieving a significance of $p < 0.05$ are shown.

^c Mann-Whitney U test was used to test for differences by gender.

^d Normal values in healthy adults: median 2 pg/mL (range 0.6 to 7.7 pg/mL).¹⁵

REFERENCES

1. Szabolcs P, Cairo MS. Unrelated umbilical cord blood transplantation and immune reconstitution. *Semin Hematol* 2010;47(1):22–36.
2. Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood* 2013;122(4):491–8.
3. Haines CJ, Giffon TD, Lu L-S, et al. Human CD4+ T cell recent thymic emigrants are identified by protein tyrosine kinase 7 and have reduced immune function. *J Exp Med* 2009;206(2):275–85.
4. Hassan J, Reen DJ. Human Recent Thymic Emigrants—Identification, Expansion, And Survival Characteristics. *J Immunol* 2001;167(4):1970–6.
5. Mackall CL, Fry TJ, Gress RE. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol* 2011;11(5):330–42.
6. Sportès C, Babb RR, Krumlauf MC, et al. Phase I Study of Recombinant Human Interleukin-7 Administration in Subjects with Refractory Malignancy. *Clin Cancer Res* 2010;16(2):727–35.
7. Perales M-A, Goldberg JD, Yuan J, et al. Recombinant human interleukin-7 (CYT107) promotes T-cell recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2012;120(24):4882–91.
8. Hassan J, Reen DJ. IL-7 promotes the survival and maturation but not differentiation of human post-thymic CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1998;28(10):3057–65.
9. Azevedo RI, Soares MVD, Barata JT, et al. IL-7 Sustains CD31 Expression in Human Naive CD4+ T Cells and Preferentially Expands the CD31+ Subset in a PI3K-Dependent Manner. *Blood* 2009;113(13):2999–3007.
10. Davis CC, Marti LC, Sempowski GD, Jeyaraj DA, Szabolcs P. Interleukin-7 Permits Th1/Tc1 Maturation and Promotes Ex vivo Expansion of Cord Blood T Cells: A Critical Step toward Adoptive Immunotherapy after Cord Blood Transplantation. *Cancer Res* 2010;70(13):5249–58.
11. Heninger A-K, Theil A, Wilhelm C, et al. IL-7 abrogates suppressive activity of human CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells and allows expansion of alloreactive and autoreactive T cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2012;189(12):5649–58.
12. Sinha ML, Fry TJ, Fowler DH, Miller G, Mackall CL. Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. *Blood* 2002;100(7):2642–9.
13. Dean RM, Fry T, Mackall C, et al. Association of Serum Interleukin-7 Levels With the Development of Acute Graft-Versus-Host Disease. *J Clin Oncol* 2008;26(35):5735–41.
14. Thiant S, Yakoub-Agha I, Magro L, et al. Plasma levels of IL-7 and IL-15 in the first month after myeloablative BMT are predictive biomarkers of both acute GVHD and relapse. *Bone Marrow Transplant* 2010;45(10):1546–52.
15. Lewis DB, Haines C, Ross D. Protein tyrosine kinase 7: a novel surface marker for human recent thymic emigrants with potential clinical utility. *J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc* 2011;31 Suppl 1:S72–81.
16. Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, et al. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med* 2002;195(6):789–94.
17. Swainson L, Kinet S, Mongellaz C, Sourisseau M, Henriques T, Taylor N. IL-7-induced proliferation of recent thymic emigrants requires activation of the PI3K pathway. *Blood* 2007;109(3):1034–42.
18. Malin GL, Morris RK, Khan KS. Strength of association between umbilical cord pH and perinatal and long term outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2010;340:c1471.
19. Ebina S, Omori A, Tarakida A, et al. Effect of the umbilical cord blood acid-base status and gas values on the yield of mononuclear cells and CD34+ cells. *J Obstet Gynaecol Res* 2012;38(7):997–1003.
20. Jackson HM, Dimopoulos N, Chen Q, et al. A robust human T-cell culture method suitable for monitoring CD8+ and CD4+ T-cell responses from cancer clinical trial samples. *J Immunol Methods* 2004;291(1-2):51–62.

21. Kimura MY, Pobeziński LA, Guinter TI, et al. IL-7 signaling must be intermittent, not continuous, during CD8⁺ T cell homeostasis to promote cell survival instead of cell death. *Nat Immunol* 2013;14(2):143–51.
22. Bolotin E, Annett G, Parkman R, Weinberg K. Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. *Bone Marrow Transplant* 1999;23(8):783–8.
23. Abu-Ghosh A, Goldman S, Slone V, et al. Immunological reconstitution and correlation of circulating serum inflammatory mediators/cytokines with the incidence of acute graft-versus-host disease during the first 100 days following unrelated umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999;24(5):535–44.
24. Palmer MJ, Mahajan VS, Chen J, Irvine DJ, Lauffenburger DA. Signaling thresholds govern heterogeneity in IL-7-receptor-mediated responses of naïve CD8⁺ T cells. *Immunol Cell Biol* 2011;89(5):581–94.