HAL
open science

Reconstitution immunitaire après greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques haploidentiques

Nicolas Stocker

To cite this version:

Nicolas Stocker. Reconstitution immunitaire après greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques haploidentiques. Hématologie. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS115 . tel-03432466

HAL Id: tel-03432466

https://theses.hal.science/tel-03432466v1

Submitted on 17 Nov 2021

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.

Sorbonne Université
École doctorale 394 : Physiologie et Physiopathologie
Centre de Recherche Saint-Antoine / Équipe Mohty

Thèse de doctorat de biologie

Reconstitution immunitaire après greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques haploidentiques

Soutenue publiquement le 24 Juin 2021

Par Nicolas Stocker

Devant un jury composé de :

Pierre Aucouturier, PU-PH, Président du Jury
Didier Blaise, PU-PH, Rapporteur
Philippe Saas, PU, Rapporteur
Katia Gagne, Maitre de recherche EFS, Examinatrice
Florent Malard, MCU-PH, Co-directeur de thèse
Béatrice Gaugler, CR INSERM, Co-directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Aux membres du Jury, Monsieur le Professeur Pierre Aucouturier, Monsieur le Professeur Didier Blaise, Monsieur le Professeur Philippe Saas et Madame le Docteur Katia Gagne, pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Pour me faire l'honneur de siéger dans ce jury et de juger cette thèse.

A Madame le Docteur Béatrice Gaugler et Monsieur le Docteur Florent Malard, pour avoir accepté de diriger cette thèse. Pour votre disponibilité, votre confiance, votre pédagogie et vos précieux conseils lors de mon initiation à la recherche clinique et scientifique.

A Monsieur le Professeur Mohamad Mohty, pour votre confiance, votre clairvoyance et votre dynamisme extraordinaire. Merci d'avoir su guider mes projets avec tant de bienveillance.

A l'ensemble de l'équipe 7 de l'UMR938, au sein du Centre de Recherche Saint-Antoine, qui m'a si bien accueilli dès 2016 pour la réalisation d'un master 2 puis de cette thèse. Un si grand merci à cette équipe d'avoir eu le dévouement de m'initier aux différentes techniques de laboratoire. Un grand merci à Frédéric pour sa patience et sa gentillesse, à Baptiste pour sa rigueur et sa passion, à Béatrice pour sa bienveillance et ses précieux conseils. Merci à Laure, Yishan, Maxime et Lama, fidèles compagnons de paillasse pour leur camaraderie et leur énergie contagieuse.

A l'ensemble des médecins, pharmaciens et biologistes rencontrés pour leur dévouement et le professionnalisme témoignés lors de l'encadrement de mes différents stages d'internat : du Centre Hospitalier Universitaire de Reims et plus particulièrement du Service d'Hématologie

Clinique dans un premier temps ; puis du service d'Hématologie Clinique et de Thérapie Cellulaire du Centre Hospitalier Universitaire Saint-Antoine plus récemment.

A l'ensemble des équipes paramédicales, les attachés de recherche clinique et les secrétaires que j'ai rencontré au cours de mes études, avec lesquels mes rapports furent toujours enrichissants et souvent amicaux ; merci pour vos compétences et votre bonne humeur communicative.

A l'ensemble des membres de la famille et mes amis, qui m'ont supporté dans ce long projet et m'ont permis de me construire jour après jour. Mes parents, principaux architectes et fervents soutiens sans qui rien n'aurait pu être possible, merci de m'avoir aidé à grandir ainsi, de m'avoir permis l'accès aux études et de m'avoir soutenu dans les difficultés.

Benjamin, Pauline et Clara ; merci pour votre camaraderie, votre amour et les nombreux moments passés ensemble et à venir.

Alexandra, merci d'être présente chaque jour à mes côtés, aux côtés de Noa et Augustin, merci pour ce havre de paix, cet équilibre familial et tous nos projets.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Allo-CSH : Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSP : Cellules Souches Périphériques

DLI : Injection de lymphocytes du donneur

EBV : Epstein-Barr Virus

EBV-PTLD : Lymphoprolifération post-transplantation associée à l'EBV

Effet GvL : Effet « Graft versus Leukemia » ou effet du greffon contre la leucémie

Effet GvT : Effet « Graft versus Tumor » ou effet du greffon contre la tumeur

GvHD : Graft-versus-Host disease, ou Réaction du greffon contre l'hôte

G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor

Haplo-CSH : Greffe haploidentique de cellules souches hématopoïétiques

HLA : Human Leucocyte Antigen

Ig : Immunoglobuline

LAL : Leucémies Aigues Lymphoïdes

LAM : Leucémies Aigues Myéloïdes

LB : Lymphome de Burkitt

MO : Moelle osseuse

NCR : Récepteurs de cytotoxicité naturelle (Natural Cytotoxicity Receptors)

NKR : Récepteurs Natural Killer (Natural Killer Receptors)

NIH : Institut National de la Santé (National Institute of Health)

NRM : Mortalité non liée à la rechute (Non Relapse Mortality)

PAMPs : Motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogen Associated Molecular Patterns)

PRR : Récepteurs de reconnaissance des motifs (Pattern Recognition Receptors)

PTCy : administration intraveineuse de cyclophosphamide post-greffe

PTLD : Lymphoprolifération post-transplantation

RC : Réponse Complète

RP : Réponse Partielle

SMD : Syndrome myélodysplasique

SMP : Syndrome myéloprolifératifs

TCR : Récepteur des lymphocytes

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Nombre d'allogreffes de CSH de 1958 à 1968. 13

Figure 2. Histoire de l'allogreffe de CSH de 1957 à 2006. 15

Figure 3. Illustration des effets GvL et GvHD. 17

Figure 4. Étapes de l'allogreffe de CSH. 18

Figure 5. Indications des allogreffes de CSH en France en 2018. 19

Figure 6. Évolution des indications d'allogreffe de CSH en France. 20

Figure 7. Répartition des allogreffes de CSH par type de donneur en 2018. 22

Figure 8. Évolution du nombre d'allogreffes de CSH par type de donneur. 23

Figure 9. Évolution de la répartition des sources de greffon de CSH. 24

Figure 10. Modèle physiopathologique de la GvHD aigue. 28

Figure 11. Altération de l'homéostasie B dans la GvHD chronique. 32

Figure 12. Reconstitution immunologique après allogreffe de CSH. 34

Figure 13. Phases de risque infectieux chez les patients allogreffés. 44

Figure 14. Des lymphocytes T à l'interface entre immunité innée et adaptative. 46

Figure 15. Structure tridimensionnelle du TCR γδ. 48

Figure 16. Reconnaissance d'une cellule cible par les lymphocytes T γδ. 54

Figure 17. Les profils cytokiniques des lymphocytes T γδ. 57

Figure 18. Stratégies d'immunothérapie utilisant les T Vγ9Vδ2. 59

Figure 19. Particules virales découvertes dans le lymphome de Burkitt. 63

Figure 20. Organisation de la famille des Herpès-virus humains. 64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification de la GvHD aiguë et chronique. 26

Tableau 2. Classification de la GvHD chronique. 30

Tableau 3. Gènes des TCR αβ et γδ murins et humains. 48

Tableau 4. Nomenclature des lymphocytes T γδ murins et humains. 49

Tableau 5. Distribution tissulaire des populations T γδ. 51

Tableau 6. Les ligands des lymphocytes T γδ. 52

Tableau 7. Pathologies associées à l'EBV. 66

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS **1**

LISTE DES ABREVIATIONS **3**

LISTE DES ILLUSTRATIONS **4**

LISTE DES TABLEAUX **6**

INTRODUCTION **9**

L'ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES 12

1. Définition 12
2. Historique 12
3. Effet antitumoral de l'allogreffe de CSH 16
4. Procédure de l'allogreffe de CSH 17
5. Complications de l'allogreffe de CSH 25

LES LYMPHOCYTES T GAMMA-DELTA 45

1. Généralités 45
2. Répertoire des lymphocytes T γδ 47
3. Distribution tissulaire des lymphocytes T γδ 50
4. Modalités d'activation des lymphocytes T γδ 51
5. Fonctions effectrices des lymphocytes T γδ 55
6. Les lymphocytes T Vγ9Vδ2 57

LE VIRUS EPSTEIN-BARR 63

1. Généralités 63
2. Cibles cellulaires et pathologies 66
3. Infection EBV et PTLD associé à l'EBV 68

RESULTATS **71**

ARTICLE 1 : IMPACT DU CYCLOPHOSPHAMIDE SUR LA RECONSTITUTION LYMPHOCYTAIRE T GAMMA-DELTA APRES GREFFE ALLOGENIQUE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES 73

1. Résultats principaux 73
2. Article 75

ARTICLE 2 : IMPACT DU TRAITEMENT PREEMPTIF PAR RITUXIMAB SUR LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE DANS LE CONTEXTE DE REACTIVATION EBV APRES ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES 87

1. Résultats principaux 87
2. Article 89

DISCUSSION **99**

REFERENCES **106**

ANNEXES **133**

ARTICLE 3 : DARATUMUMAB PREVENTS PROGRAMMED DEATH LIGAND-1 EXPRESSION ON ANTIGEN-PRESENTING CELLS IN DE NOVO MULTIPLE MYELOMA 133

INTRODUCTION

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (Allo-CSH) demeure à ce jour le seul traitement potentiellement curateur pour de nombreux patients atteints d'hémopathies malignes, d'hémoglobinopathies graves ou de déficits immunitaires sévères. Grâce aux progrès réalisés lors des dernières décennies, l'utilisation de cette thérapie cellulaire a été croissante, passant de quelques cas dans les années 80 à plus de 1900 allogreffes de CSH réalisées en France en 2018 (Données de l'Agence de la Biomédecine). Néanmoins, seuls 30% des patients disposent d'un donneur familial HLA-identique. Par conséquent, l'utilisation de greffons dits alternatifs (donneurs non-apparentés HLA-compatibles, sangs de cordon ombilical ou donneurs haploidentiques) s'est considérablement développée.

L'allogreffe de cellules souches haploidentiques (Haplo-CSH), c'est-à-dire à partir d'un donneur familial partageant un seul haplotype, est associée à une alloréactivité bidirectionnelle majeure, conduisant à des résultats initiaux décevants en raison d'une toxicité importante et d'une mortalité liée à la procédure [1]. Heureusement, le développement d'une nouvelle stratégie de prévention de la maladie aigüe du greffon contre l'hôte (GvHD) basée sur l'administration intraveineuse de cyclophosphamide (PTCy) après Haplo-CSH a considérablement amélioré les taux de GvHD, la mortalité non-liée à la rechute et la prise de greffe dans ce contexte [2-7]. Ainsi, des études rétrospectives ont récemment rapporté des taux de survie globale et sans rechute après Haplo-CSH comparables à ceux observés après greffe à partir d'un donneur HLA-identique (apparenté ou non apparenté) [2-7].

Les mécanismes d'action du PTCy commencent à être bien élucidés. L'administration du PTCy induit une altération fonctionnelle des lymphocytes T alloréactifs, sans effets toxiques sur les cellules souches hématopoïétiques [8]. De plus, les lymphocytes T régulateurs du greffon peuvent résister à la cytotoxicité du PTCy et contribuer à la prévention de la GvHD [1]. En effet, après

stimulation allogénique, les lymphocytes T régulateurs du donneur expriment un taux important d'aldéhyde déshydrogénase, enzyme responsable de la détoxification du cyclophosphamide *in vivo*, permettant à ceux-ci de résister à la cytotoxicité du PTCy.

Néanmoins, des incidences élevées de complications infectieuses et en particulier de réactivations virales ont été rapportées après Haplo-CSH avec administration de PTCy [9-11]. Plus précisément, une augmentation de la charge virale de l'Epstein Barr-Virus (EBV) a été observée chez 19 à 53% des patients [9,10,12] et jusqu'à 72% des patients avec un suivi plus long (2 ans) [9]. Alors que l'EBV est un herpès-virus détectable et asymptomatique chez plus de 95 % de la population adulte immunocompétente, les lymphoproliférations post-transplantation associées à ce virus peuvent mettre en jeu le pronostic vital des patients après Allo-CSH [13,14].

De nombreuses études ont démontré que l'immunité innée, et en particulier les lymphocytes T gamma delta (γ/δ), jouait un rôle dans la surveillance immunitaire de l'EBV. De Paoli *et al.* ont ainsi décrit une expansion lymphocytaire T γ/δ lors de la phase aiguë de la mononucléose infectieuse induite par l'EBV ; suggérant leur rôle possible dans le contrôle de l'infection [15]. D'autre part, une sous-population de lymphocytes T γ/δ, de phénotype $V\gamma9^{+}V\delta2^{+}$, a montré une activité cytotoxique directe, *in vitro* et *in vivo* (après culture et stimulation par aminobisphosphonates), sur des lignées cellulaires lymphoblastoïdes infectées par l'EBV [16]. Les lymphocytes T γ/δ ont la particularité de présenter à la fois des caractéristiques de l'immunité innée et adaptative [17], et diffèrent des lymphocytes T conventionnels α/β non pas seulement par la composition du TCR, mais également par leur développement, leur distribution tissulaire et leurs fonctions physiologiques [18-20]. Le contingent de lymphocytes T $V\delta2^{+}$ est notamment la population lymphocytaire T γ/δ prédominante dans le sang périphérique de l'adulte [21].

Après Allo-CSH, une expansion de lymphocytes T γ/δ $V\delta1^{+}$ a notamment été décrite chez un patient présentant une augmentation de la charge virale EBV après greffe de sang de cordon

ombilical [22]. Plus récemment, des corrélations inverses ont été rapportées après Haplo-CSH entre les taux de lymphocytes T $CD4^-/CD8^-$ ou de lymphocytes T γ/δ $V\delta2^+$ et l'augmentation de la charge virale EBV après utilisation de fortes doses de sérum antilymphocytaire [23,24]. Pour autant, la reconstitution immunitaire des patients recevant une Haplo-CSH avec administration de PTCy reste insuffisamment documentée à ce jour.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse était d'évaluer la reconstitution immunitaire de patients recevant une Allo-CSH avec utilisation de greffons de cellules souches périphériques, et plus particulièrement d'étudier l'impact de l'administration de PTCy sur les populations lymphocytaires T γ/δ en lien avec le devenir clinique post-greffe.

Après avoir donné une perspective générale de l'Allo-CSH, nous allons discuter des populations lymphocytaires T γ/δ, et du virus EBV ainsi que des pathologies qui lui sont associées (en particulier les lymphoproliférations post-transplantation). Nous exposerons alors les travaux réalisés lors cette thèse de doctorat.

L'ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES

1. Définition

L'Allo-CSH est une procédure thérapeutique complexe reconnue comme efficace et curative en traitement de nombreuses hémopathies malignes et non malignes. Au cours de l'année 2018, l'European Society for Bone and Marrow Transplantation (EBMT) a ainsi rapporté plus de 19 000 allogreffes réalisées sur un total de 701 centres internationaux [25]. Le concept initial de remplacement médullaire a évolué au gré du temps mais reste le socle thérapeutique de certains déficits immunitaires sévères, de formes graves d'hémoglobinopathies ou de maladies congénitales sévères.

Plus précisément, les interactions immunologiques entre les cellules immunitaires du greffon et les tissus du receveur, lors des reconstitutions hématopoïétique et immunitaire, au décours de l'Allo-CSH peuvent s'accompagner d'un effet antitumoral (« effet du greffon contre la maladie ») et de complications (« maladie du greffon contre l'hôte », infections sévères…). Il est donc essentiel de penser l'Allo-CSH comme une thérapie cellulaire antitumorale dans les indications hématologiques malignes.

2. Historique

En 1945, au décours des explosions atomiques au Japon, le monde scientifique étudiait l'impact de la radioactivité sur l'hématopoïèse et apportait les premières connaissances fondamentales sur les cellules souches hématopoïétiques (CSH).

En étudiant les effets d'une irradiation létale sur des modèles murins, Jacobson *et al.* [26] découvraient les rôles cruciaux de la rate et des fémurs dans l'hématopoïèse physiologique [26-28] et démontraient pour la première fois une reconstitution hématologique après irradiation. En 1950, Lorenz *et al.* confirmaient l'effet protecteur sur l'hématopoïèse d'une infusion intraveineuse de moelle osseuse chez des modèles murins irradiés [29]. Entre 1950 et 1955, il fut établi que les CSH d'un donneur syngénique étaient capables de reconstituer une moelle

osseuse chez le receveur après irradiation [30]. On apportait alors le nom de chimère à l'animal recevant le système hématopoïétique de l'animal donneur [31].

En 1958, Mathé *et al*. réalisaient la première expérience d'infusion de moelle osseuse chez l'être humain. Plus précisément, chez 6 physiciens ayant développé une aplasie médullaire au décours d'un accident nucléaire en Yougoslavie, cinq présentaient alors une reconstitution hématopoïétique transitoire [32]. Ensuite, en 1959, Thomas *et al.* décrivaient la première prise de greffe d'un patient leucémique transplanté avec un greffon de jumeau homozygote [33]. Dès 1960, Beilby *et al.* rapportaient une reconstitution hématologique partielle chez un patient atteint de lymphome de Hodgkin recevant un greffon de donneur non apparenté [34]. Au total, 19 Allo-CSH étaient rapidement décrites avec des résultats divers [35,36] : 13 décès sans prise de greffe, 2 reconstitutions hématologiques autologues et 4 prises de greffe rechutant dans les 3 premiers mois.

Dès 1966, on dénombre 417 allogreffes réalisées avec pour principaux résultats 3 reconstitutions hématologiques durables [37]. De nombreuses équipes considèrent alors l'Allo-CSH comme un traitement sans avenir (**Figure 1**).

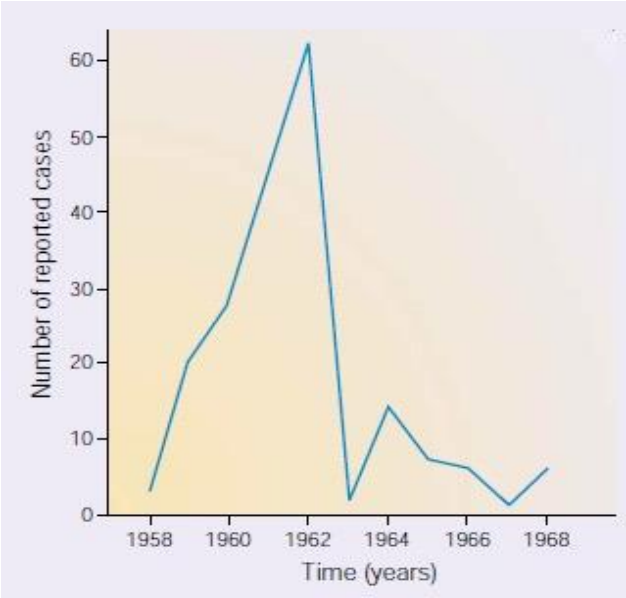

Figure 1 : Nombre d'allogreffes de CSH de 1958 à 1968.

L'équipe d'E.D. Thomas à Seattle entreprenait alors la majorité des travaux fondamentaux sur des modèles canins. Les principaux problèmes rencontrés étaient le rejet précoce du greffon par l'organisme receveur et la « maladie du greffon contre l'hôte » (« Graft-versus-Host Disease » ou GvHD, initialement appelée « syndrome secondaire »). Ces syndromes secondaires apparaissaient après prise de greffe et se caractérisaient par de la diarrhée, une perte de poids, des atteintes cutanées et des lésions hépatiques.

En 1966, Billingham *et al.* décrivaient les conditions du développement de la GvHD [38] :

- Le greffon doit contenir des cellules immunitaires compétentes.
- Le receveur doit exprimer des antigènes différents de ceux du donneur.
- L'hôte doit être incapable de développer une réponse effectrice contre le greffon.

Plus récemment, un quatrième critère fut ajouté : « les cellules immunitaires effectrices doivent migrer dans les tissus cibles » [39].

La découverte du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) ou Human Leucocyte Antigen (HLA) par Jean Dausset fut déterminante pour le développement de l'Allo-CSH [40].

A partir des années 1970, les équipes d'hématologie réalisaient des Allo-CSH avec des donneurs familiaux HLA-compatibles (dits « génoidentiques ») dans le traitement de leucémies aiguës et d'aplasies médullaires. L'utilisation de molécules de chimiothérapie telles que le méthotrexate après Allo-CSH permettait notamment d'améliorer la prise de greffe et de réduire le risque de GvHD [41]. Dans les années 1980, l'association de la ciclosporine au méthotrexate a permis de réduire à nouveau le risque de GvHD [42].

Lors des années 1980, on assiste à une augmentation considérable du nombre d'Allo-CSH en raison de progrès majeurs : la diversification des types de greffons et l'apparition de techniques de cryopréservation. Dès 1981, les équipes d'E.D Thomas décrivaient une réduction significative de l'incidence des rechutes chez les patients allogreffés qui développaient une GvHD aiguë et/ou chronique. Plusieurs études démontraient alors une corrélation entre la survenue de la GvHD et une amélioration de la survie sans rechute. Plus précisément, la

survenue d'une GvHD chronique s'associait à une augmentation de la survie tandis que la survenue d'une GvHD aiguë n'améliorait pas la survie en raison d'une augmentation importante de la mortalité précoce après l'Allo-CSH [43-45].

En 1988, Gluckman *et al.* réalisaient la première Allo-CSH de sang placentaire chez un enfant atteint d'un Syndrome de Fanconi [46] et depuis les années 2000, cette source de greffon s'est progressivement élargie aux adultes. Dès 1995, les études menées sur les cellules souches périphériques (CSP) permettaient une stimulation/mobilisation par injection de facteurs de croissance (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ou G-CSF) et un recueil par cytaphérèse sanguine. Les CSP représentent aujourd'hui la principale source de CSH (environ 75%) [47].

Grâce aux nombreux progrès réalisés depuis 1980 (développement des conditionnements à intensité réduite, diversification des sources de greffon, meilleure prise en charge des complications infectieuses, soins de supports…), on assiste à un nombre croissant d'indications. Le nombre annuel d'Allo-CSH a ainsi augmenté de 37% depuis 2005 [48] (**Figure 2**).

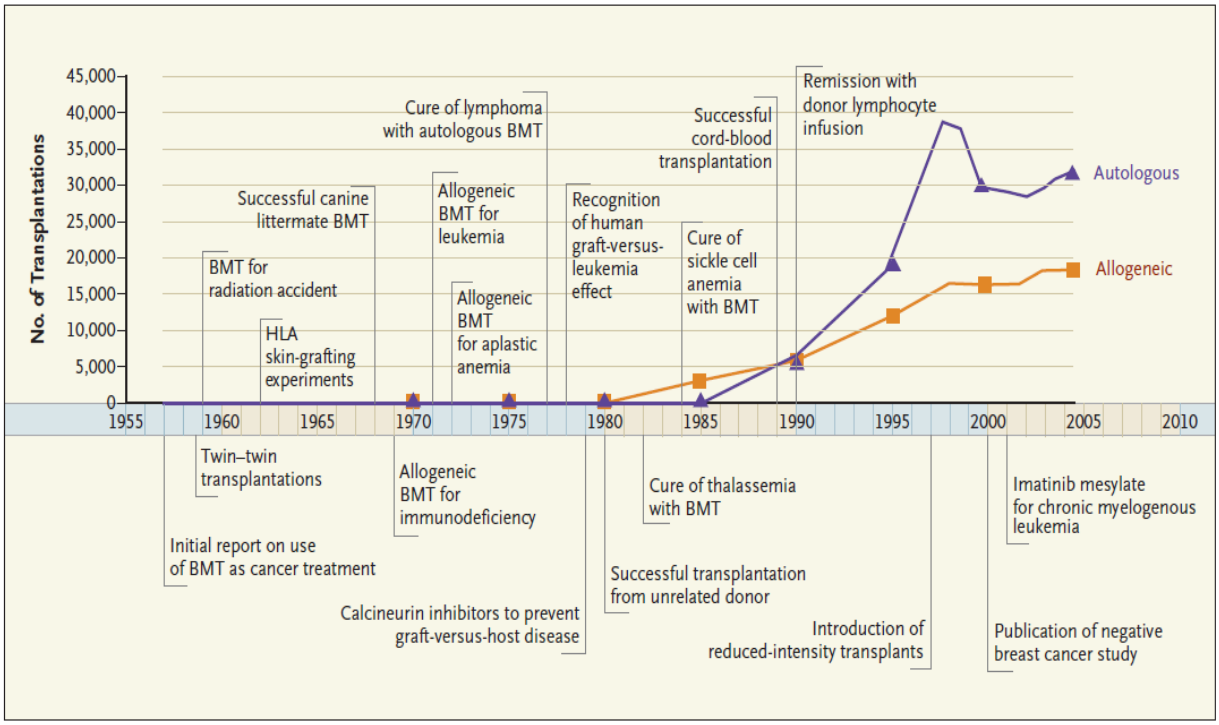

Figure 2. Histoire de l'allogreffe de CSH de 1957 à 2006.

Appelbaum *et al.* N Engl J Med 2007

3. Effet antitumoral de l'allogreffe de CSH

Dès 1956, l'effet immunologique bénéfique de l'Allo-CSH sur la tumeur, dit effet « Graft *versus* Tumor » (GvT) ou « Graft versus Leukemia » (GvL), fut mis en évidence sur des modèles murins. En étudiant l'éradication de cellules leucémiques chez des souris irradiées recevant un greffon allogénique non-syngénique, Barnes *et al.* observaient pour la première fois l'effet GvL [49,50]. Ces observations ont alors incité Kolb *et al.* à transfuser des lymphocytes de donneur (DLI) chez les patients allogreffés de CSH en rechute [51] : cette thérapeutique s'accompagnant alors de complications graves et notamment de GvHD [52]. Depuis ces prémices, l'effet GvL des DLI a largement été documenté par l'obtention de réponses tumorales complètes, plus particulièrement dans le cadre de la leucémie myéloïde chronique.

Outre les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), les cellules de l'immunité impliquées dans l'effet GvL sont principalement les lymphocytes T $CD4^+$, $CD8^+$ et les lymphocytes NK. Les lymphocytes T sont cruciaux dans l'effet GvL et il a été démontré un risque supérieur de rechute chez les patients recevant des greffons déplétés en lymphocytes T [53].

Les antigènes ciblés par l'effet GvL sont essentiellement les antigènes mineurs d'histocompatibilité et les peptides polymorphiques présentés par les molécules HLA des cellules du receveur. Cette immunogénicité des antigènes mineurs d'histocompatibilité résulte notamment d'un polymorphisme nucléotidiques dans les gènes homologues du donneur ou du receveur [54].

Lorsque les lymphocytes T du donneur sont activés par un antigène mineur d'histocompatibilité du receveur (exprimé sur les cellules hématopoïétiques ou sur les cellules endothéliales), ils engendrent un effet GvL et une GvHD. En revanche, lorsque les lymphocytes T sont activés par un antigène mineur d'histocompatibilité uniquement exprimé à la surface des cellules hématopoïétiques du receveur, seul un effet GvL est observé (**Figure 3**) [55]. La production d'anticorps dirigés contre des gènes exprimés sur le chromosome Y de patients masculins

allogreffés avec un donneur féminin a également été associée à l'effet GvL, à une diminution du risque de rechute et à une augmentation du risque de GvHD chronique [56].

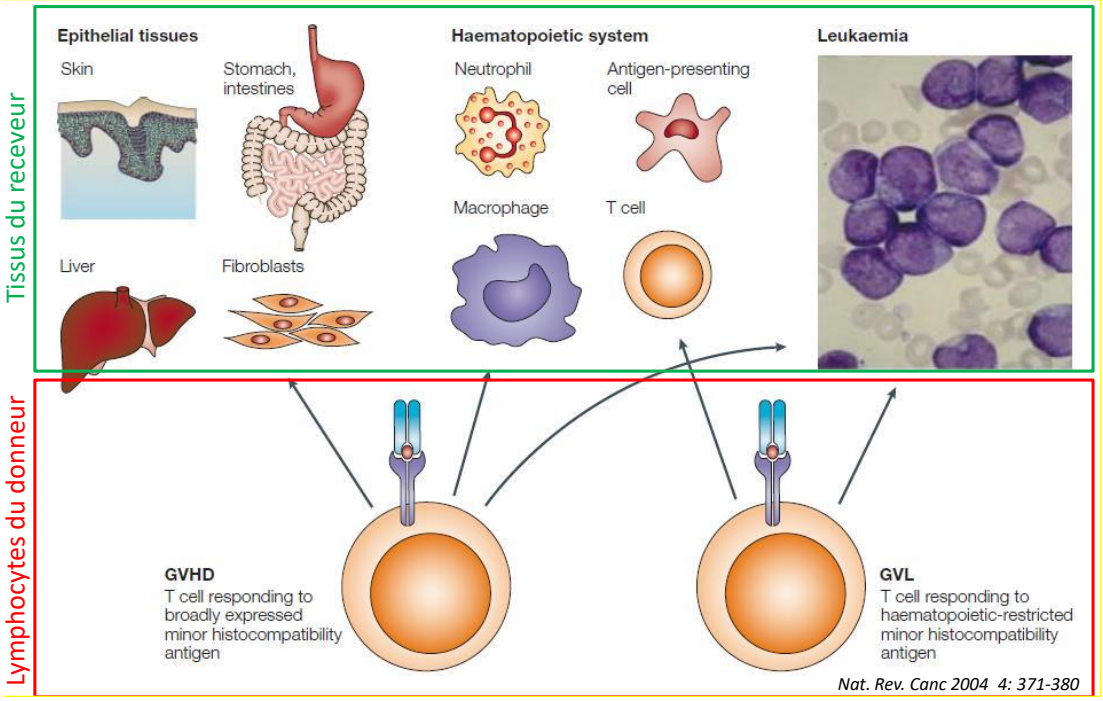

Figure 3. Illustration des effets GvL et GvHD.
Bleakley *et al.* Nat Rev Cancer 2004

4. Procédure de l'allogreffe de CSH

L'Allo-CSH peut être décomposée en plusieurs étapes (**Figure 4**). :

- La validation de l'indication.
- Le choix du donneur.
- Le recueil d'un greffon et la réalisation du conditionnement.
- L'infusion des CSH.
- La reconstitution hématologique et immunologique.

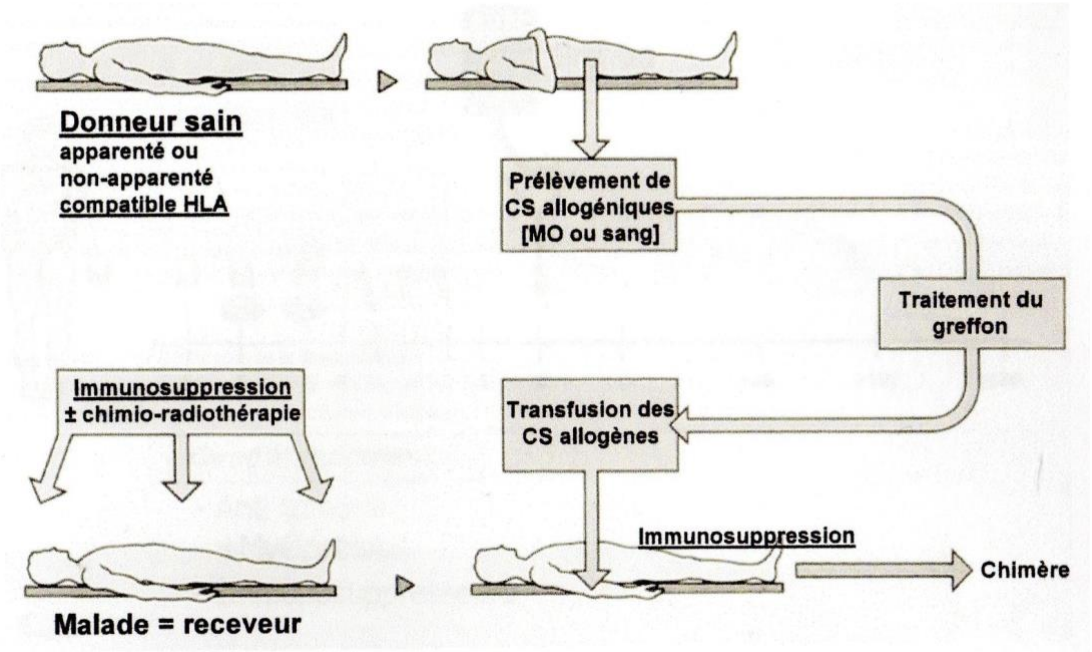

Figure 4. Étapes de l'allogreffe de CSH.

a. Les indications

Réservée historiquement au traitement des leucémies aiguës, de la leucémie myéloïde chronique et des aplasies médullaires, les indications de l'Allo-CSH se sont progressivement élargies à d'autres hémopathies malignes (syndromes myélodysplasiques, néoplasies myéloprolifératives, hémopathies lymphoïdes), aux hémoglobinopathies (thalassémie β majeure, drépanocytose), aux déficits immunitaires congénitaux sévères et à certaines maladies métaboliques (leucodystrophie, ostéopétrose).

Aujourd'hui, les principales indications d'Allo-CSH en France (**Figure 5**) sont :

- Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) de pronostic intermédiaire et défavorable.
- Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) de haut risque.
- La myélofibrose primaire ou secondaire.
- Les aplasies médullaires selon l'âge et la réponse au traitement.
- Les syndromes myélodysplasiques (SMD) de risque élevé.

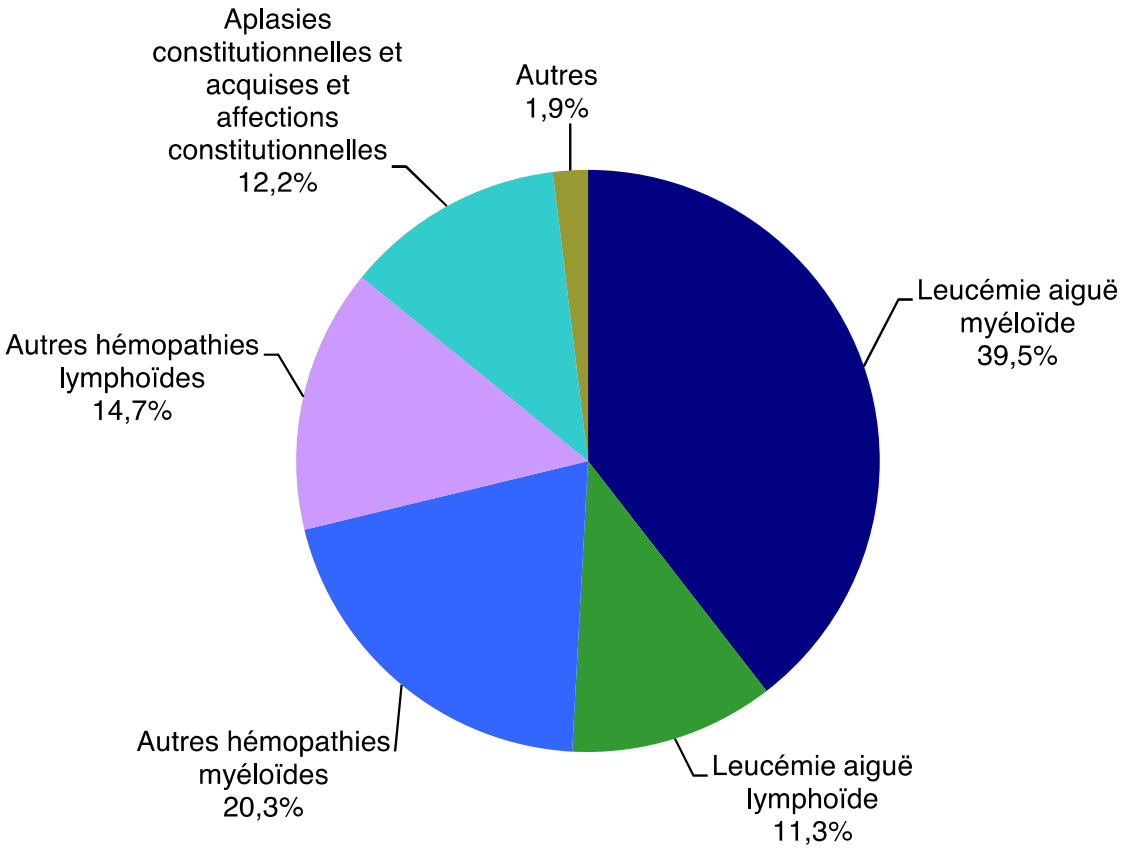

Figure 5. Indications des allogreffes de CSH en France en 2018.
Données de l'Agence de Biomédecine.

www.agence-biomedecine.fr

Ces indications évoluent au gré des progrès, tant en termes d'efficacité qu'en termes de toxicité de la procédure, de l'émergence de nouvelles thérapeutiques ciblées et des progrès biologiques (en particulier cytologiques, cytogénétiques et moléculaires) (**Figure 6**). Ces indications sont discutées selon l'âge du patient, ses comorbidités et la disponibilité d'un greffon [57].

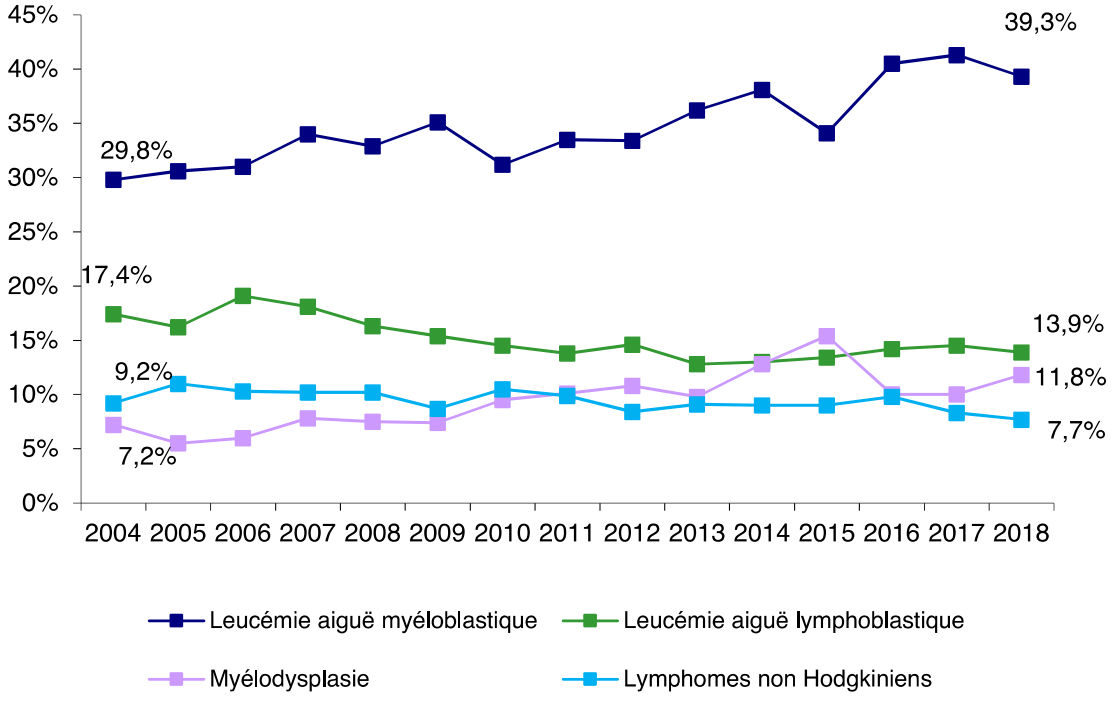

Figure 6. Évolution des indications d'allogreffe de CSH en France. Données de l'Agence de Biomédecine.

www.agence-biomedecine.fr

b. Le choix du donneur et du type de greffon

Le choix d'un donneur respecte en premier lieu l'histocompatibilité HLA entre le donneur et le receveur. Le système HLA, découvert par Jean Dausset et récompensé d'un prix Nobel en 1980, est un système comprenant plus de 200 gènes situés sur une région du bras court du chromosome 6 et divisée en 3 parties (HLA de classe I, II et III) [58,59].

Les gènes du système HLA sont majoritairement impliqués dans la réponse immunitaire et ont la caractéristique commune d'être polymorphes et d'expression co-dominante. La transmission à la descendance respecte des haplotypes complets.

Le système HLA de classe I est exprimé par une grande majorité des cellules nucléées de l'organisme et par les plaquettes. Les principaux loci sont nommés A, B et C. La fonction

essentielle de ces molécules HLA est de présenter les antigènes des pathogènes endocytoplasmiques aux lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$.

Le système HLA de classe II est exprimé par les CPA : les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les lymphocytes T activés. Les principaux loci sont nommés DR, DQ et DP. Les molécules HLA de classe II lient les peptides dérivés des antigènes internalisés dans les compartiments endosomiques de la cellule. Ces antigènes sont alors reconnus par les lymphocytes T auxiliaires naïfs lors de l'étape initiale de la réponse immunitaire.

Dans le contexte de l'Allo-CSH, les lymphocytes T du receveur peuvent reconnaître comme étrangers les antigènes du greffon et le rejeter. Inversement, les lymphocytes du donneur peuvent engendrer une GvHD par reconnaissance des antigènes tissulaires du receveur. La sélection du donneur est donc essentielle dans la réussite d'une Allo-CSH par respect d'une histocompatibilité dite 10/10 (2 allèles A, B, C, DRB1 et DQB1).

Les donneurs HLA-compatibles peuvent être apparentés (ou intrafamilial) au receveur. Ils sont alors dits :

- Génoidentiques : il s'agit des frères et sœurs du patient de compatibilité HLA 10/10. Chaque frère et sœur a une chance sur 4 d'être génoidentique avec le patient.
- Haploidentiques : il s'agit des parents, des enfants, ou des frères et sœurs, partageant un haplotype, la compatibilité sera au moins de 5/10.

Dans 70% des cas, il n'existe pas de donneur apparenté HLA-compatible et les donneurs recherchés sont alors non-apparentés au receveur. La recherche d'un donneur extrafamilial est réalisée dans registre international nommé Bone Marrow Donors Worlwide et le greffon est alors prélevé chez un volontaire sain. Ce registre dénombrait en 2020 plus de 38 millions de

donneurs et plus de 730 000 unités de sangs de cordons placentaires au sein de 98 registres et 54 pays. Les chances de trouver un donneur compatible sur ce registre approchent les 40 %.

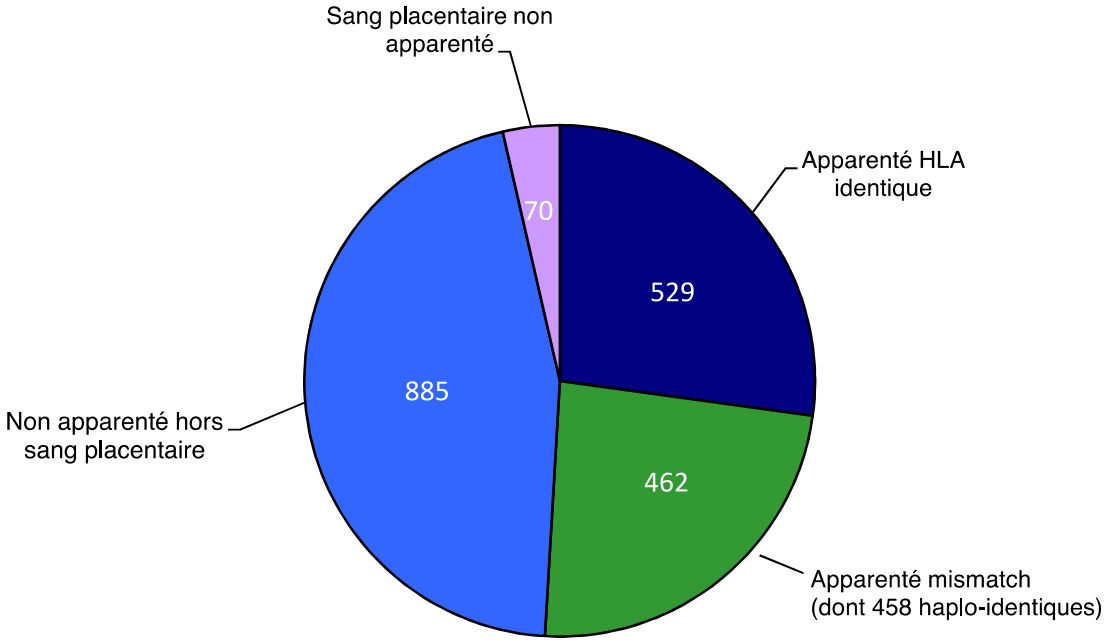

Figure 7. Répartition des allogreffes de CSH par type de donneur en 2018. Données de l'Agence de Biomédecine.

www.agence-biomedecine.fr

En France, les allogreffes réalisées à partir de donneurs non apparentés ont représenté la majorité des allogreffes de CSH en 2018 et leur importance tend à augmenter au fil du temps en lien avec les politiques de dons volontaires de moelle osseuse (**Figure 7 et 8**). En effet, les registres de donneurs deviennent plus importants, et donc la probabilité de trouver un donneur compatible croit et permet d'offrir une opportunité d'allogreffe à de nouveaux candidats.

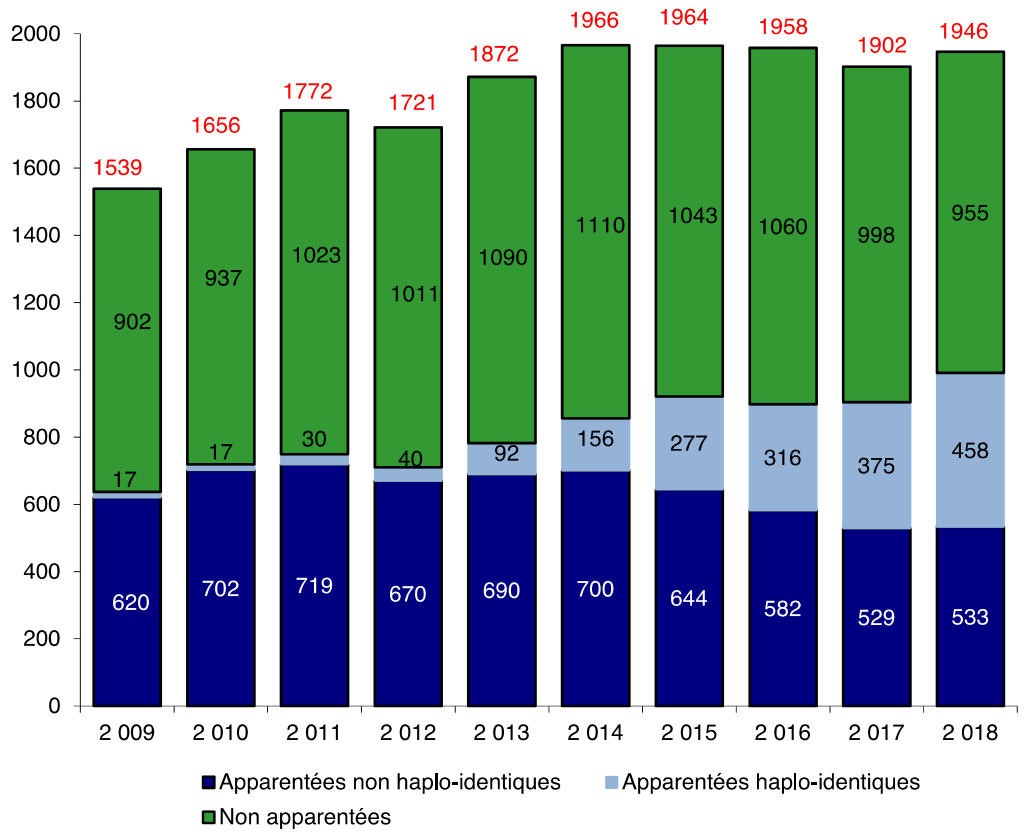

Figure 8. Évolution du nombre d'allogreffes de CSH par type de donneur. Données de l'Agence de Biomédecine.

www.agence-biomedecine.fr

Les autres critères pris en compte dans le choix du donneur sont ensuite :

- La richesse pour les unités de sang de cordons placentaires.
- Le statut sérologique pour le cytomégalovirus.
- L'âge du donneur.
- Le sexe du donneur (en évitant les donneurs féminins et allo-immunisés).
- Le groupe sanguin ABO rhésus.

Après sélection du donneur, il existe différentes sources de greffon :

- La moelle osseuse (MO) : prélevée par ponction osseuse sous anesthésie générale.
- Les cellules souches périphériques (CSP) : prélevées par cytaphérèse après stimulation/mobilisation par injection de facteurs de croissance.
- Le sang de cordon placentaire : provenant de dons volontaires.

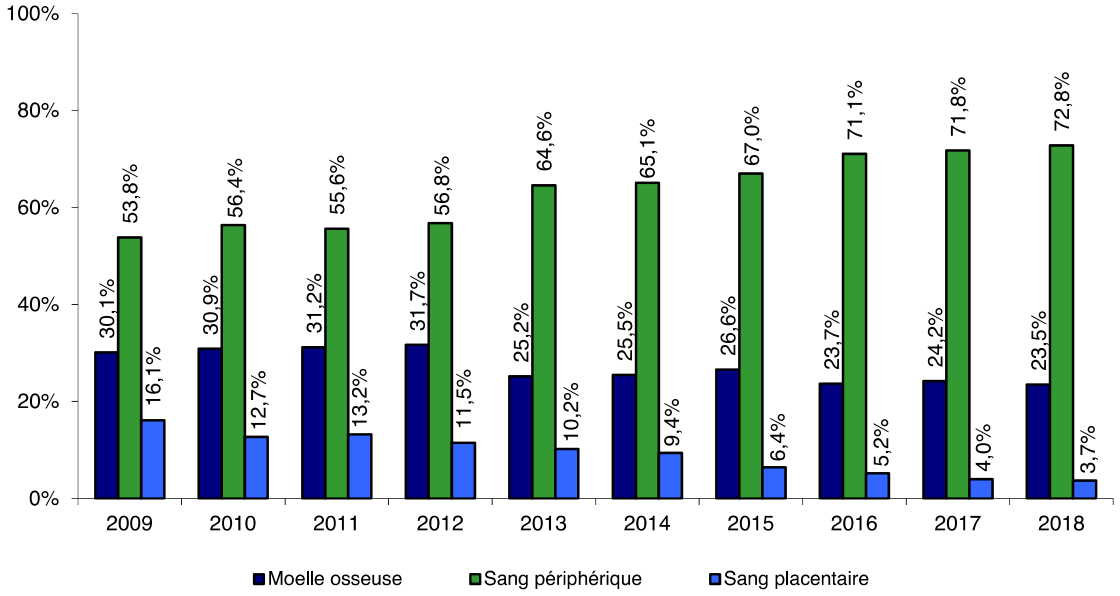

Figure 9. Évolution de la répartition des sources de greffon de CSH.

www.agence-biomedecine.fr

En France, les CSP représentent aujourd'hui la principale source de greffons (73% en 2018) (**Figure 9**). La relative facilité technique de leur recueil, leur richesse supérieure en CSH et en lymphocytes T expliquent que les CSP soient choisies préférentiellement par rapport à la MO, qui conservent une place importante, notamment dans les indications hématologiques non malignes. L'utilisation des unités de sang de cordons placentaires reste très minoritaire (environ 4%).

c. *Le conditionnement de l'allogreffe de CSH*

Le conditionnement est une séquence thérapeutique permettant de détruire les cellules tumorales du receveur par l'administration d'une chimiothérapie et/ou d'une radiothérapie à forte intensité, avant d'infuser le greffon d'un donneur. On obtient alors des effets antitumoral, myéloablatif et immunosuppresseur. Les principaux types de conditionnement sont :

- Le conditionnement myéloablatif qui est le conditionnement conventionnel dont la toxicité importante limite l'utilisation chez les patients de plus de 50-55 ans et/ou présentant des comorbidités.
- Le conditionnement d'intensité réduite, définit par une intensité moindre et une myélosuppression transitoire, permettant de réduire la morbi-mortalité induite et de rendre l'Allo-CSH accessible à des patients âgé et/ou ayant des comorbidités.
- Les conditionnements myéloablatifs à toxicité réduite ont été rapportés plus récemment [57,60-62] , et ont pour caractéristique d'être myéloablatifs tout en maintenant un profil de tolérance compatible avec la greffe du sujet âgé et/ou ayant des comorbidités.

5. Complications de l'allogreffe de CSH

a. *Le rejet de greffe*

La prise de greffe est définie comme les trois premiers jours consécutifs ou le taux de polynucléaires neutrophiles est supérieur ou égal à 0,5 x 10^9/L. Le rejet de greffe primaire est une complication rare classiquement définie par l'absence de prise de greffe dans les 42 jours suivant la transplantation. Si le rejet de greffe intervient au décours d'une prise de greffe initiale on parle de rejet de greffe secondaire. Les principaux facteurs de risque sont une faible richesse du greffon, les mismatchs HLA, la présence d'un anticorps anti-HLA chez le receveur dirigé contre un antigène HLA du donneur, le sang de cordon placentaire, les greffons déplétés en lymphocytes T et les infections virales actives.

b. *La réaction du Greffon contre l'Hôte*

La GvHD est une pathologie de type allo-immun, secondaire à la reconnaissance d'antigènes du receveur par les cellules immunocompétentes du donneur. Cette complication fréquente est la source d'une morbidité et d'une mortalité non négligeables. Son mécanisme d'action et sa présentation clinique diffèrent selon son caractère aigu ou chronique.

Historiquement, les GvHD aiguë et chronique sont définies respectivement comme survenant dans les 100 premiers jours ou au-delà des 100 premiers jours après allogreffe de CSH. En 2005, la conférence de consensus du NIH (National Institute of Health) a établi la définition des GvHD aiguë et chronique sur le type de manifestations cliniques plutôt que sur le moment de survenue par rapport à la greffe (**Tableau 1**) [63].

Tableau 1. Classification de la GvHD aiguë et chronique.
Filipovich et al. Biol Blood Marrow Transplant 2005

Category	Time of Symptoms after HCT or DLI	Presence of Acute GVHD Features*	Presence of Chronic GVHD Features*
Acute GVHD			
Classic acute GVHD	≤100 d	Yes	No
Persistent, recurrent, or late-onset acute GVHD	>100 d	Yes	No
Chronic GVHD			
Classic chronic GVHD	No time limit	No	Yes
Overlap syndrome	No time limit	Yes	Yes

GVHD indicates graft-versus-host disease; HCT, hematopoietic cell transplantation; DLI, donor lymphocyte infusion.

Ainsi, certains patients présentent des GvHD aiguës tardives, récidivantes, persistantes, et d'autres associent des signes de GvHD aiguë et chronique correspondant à des formes de chevauchement. La GvHD chronique peut apparaître de novo sans GvHD aiguë préalable, lorsqu'elle fait suite à une GvHD aiguë après un intervalle libre (forme « quiescente ») ; ou succéder à une GvHD aiguë sans intervalle libre (forme « progressive ») avec un plus mauvais pronostic [64,65].

La GvHD aiguë touche environ 30 à 50 % des patients allogreffés de CSH et les organes les plus atteints sont la peau, le tube digestif et le foie. Au stade initial, la GvHD aiguë cutanée touche avec prédilection les faces palmaires des mains et des pieds. L'atteinte cutanée se présente ensuite sous la forme d'un rash cutané pouvant évoluer vers des bulles pour les formes les plus sévères. L'atteinte digestive de la GvHD aiguë comprend des nausées, des douleurs abdominales, une diarrhée aqueuse voire parfois des rectorragies. La GvHD aiguë hépatique se manifeste essentiellement par une cholestase. La sévérité des atteintes de GvHD aiguë se cote du grade I pour les formes les plus légères au grade IV pour les formes les plus sévères.

La prévention de la GvHD aiguë est primordiale et repose le plus souvent sur l'association d'un inhibiteur de calcineurine telle que la ciclosporine avec un antimétabolite comme le méthotrexate ou le micophénolate mofétil. L'administration de sérum antilymphocytaire dans le conditionnement de l'allo-CSH contribue également à la prévention de la GvHD aiguë.

Un modèle physiopathologique impliquant trois étapes a été proposé par Reddy et Ferrara [66], accordant un rôle prépondérant aux lymphocytes T du greffon et aux cytokines (**Figure 10**):

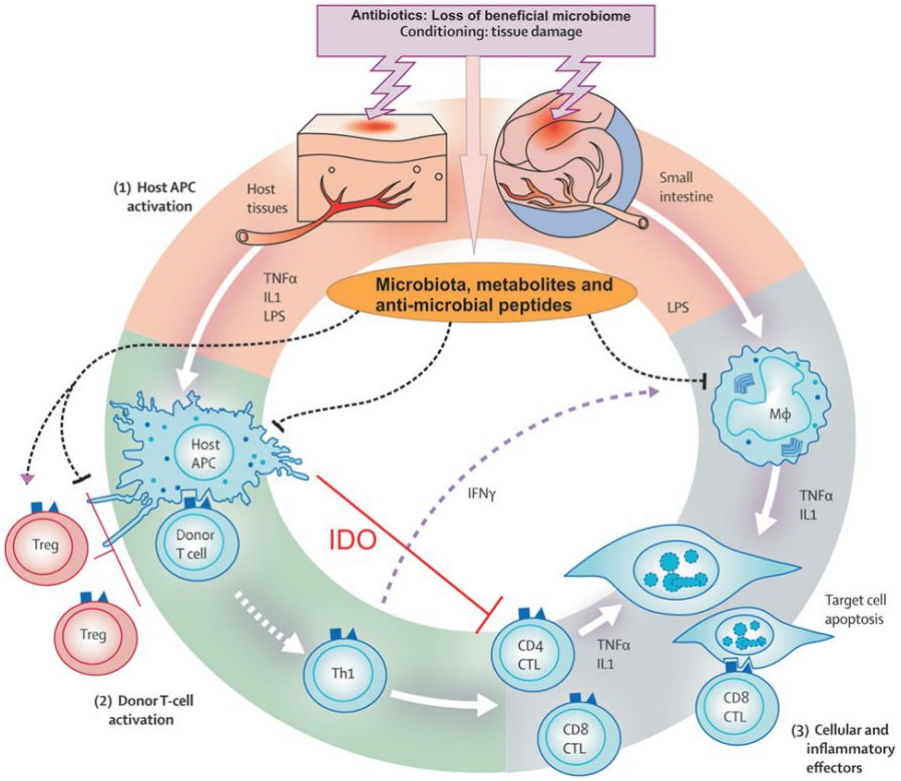

Figure 10. Modèle physiopathologique de la GvHD aigue.
Reddy et Ferrara. Blood Rev 2003

- Lors de la phase 1, des lésions tissulaires induites par le conditionnement engendre la production transitoire de cytokines proinflammatoires (interleukine-1, Tumor Necrosis Factor α), activant les CPA de l'hôte. Le conditionnement est également responsable d'une perte de la diversité microbienne qui par sécrétion de métabolites participe à l'homéostasie immunitaire.
- Lors de la phase 2, les CPA de l'hôte activent les lymphocytes T alloréactifs du donneur, présents au sein du greffon. Ces derniers vont proliférer et se différencier en lymphocytes de type Th1 et Th17, des lymphocytes T cytotoxiques et des lymphocytes natural killer.
- Lors de la phase III, les lymphocytes T cytotoxiques activés et les cytokines proinflammatoires vont engendrer des lésions de l'épithélium des tissus cibles (peau, foie, poumon et tube digestif). Ces lésions tissulaires induiront le recrutement de cellules myéloïdes qui produiront des cytokines proinflammatoires et accroîtront les lésions épithéliales.

La GvHD chronique touche 40 à 70% des patients après allogreffe de CSH dont elle représente la principale complication à moyen et court terme [67-69]. La GvHD chronique présente des similarités avec des maladies auto-immunes telles que la sclérodermie, le lupus érythémateux, le syndrome de Gougerot-Sjögren, la polyarthrite rhumatoïde, le lichen plan, la bronchiolite oblitérante ou encore la cirrhose biliaire primitive. Les manifestations cliniques de la GvHD chronique les plus fréquemment observées sont les atteintes cutanées (65 à 80%), buccales (48-72%), hépatiques (40-73%) et oculaires (18-47%). La médiane de survenue est de 6 mois après la greffe et la majorité des cas se déclarent dans les 2 ans. Bien que la prévalence diminue à partir de 2-3 ans, près de 20% des patients atteints de GvHD chronique nécessitent un traitement immunosuppresseur jusqu'à 5 ans après la greffe [70]. Par ailleurs, de nombreux patients présentent des séquelles de GvHD chronique altérant la qualité de vie (syndrome sec, bronchiolite oblitérante…).

L'évaluation de la sévérité de la GvHD chronique est donc une étape importante qui oriente la décision thérapeutique et sert de référence pour le suivi de la réponse au traitement.
Une des premières classifications a été proposée par l'équipe de Seattle en 1980 [71] et portait sur des critères cliniques, biologiques et histologiques étudiés chez 20 patients allogreffés ayant reçu un conditionnement myéloablatif, avec comme source du greffon de la moelle osseuse d'un donneur génoidentique.

La GvHD chronique était alors classifiée en limitée ou extensive (**Tableau 2**).

Tableau 2. Classification de la GvHD chronique.
Shulman *et al.* Am J Med 1980

Limited chronic GVHD
Either or both:
1. Localized skin involvement
2. Hepatic dysfunction due to chronic GVHD

Extensive chronic GVHD
Either:
1. Generalized skin involvement; or
2. Localized skin involvement and/or hepatic dysfunction due to chronic GVSD, plus:
   a. Liver histology showing chronic aggressive hepatitis, bridging necrosis or cirrhosis; or
   b. Involvement of eye: Schirmer's test with less than 5 mm wetting; or
   c. Involvement of minor salivary glands or oral mucosa demonstrated on labial biopsy; or
   d. Involvement of any other target organ.

Différents facteurs pronostiques ont été identifiés tels que l'extension cutanée initiale (>50% de la surface corporelle), le caractère progressif ou l'existence d'une thrombopénie. Des scores de sévérité plus précis ont récemment été proposés par le NIH, basés sur des gradations des atteintes organiques et constituant 3 groupes distincts : la GvHD légère, modérée et sévère [68,72,73]. Les principaux facteurs de risque établis sont l'âge du patient, un antécédent de GvHD aiguë, un donneur de sexe féminin avec un receveur de sexe masculin, l'existence d'une incompatibilité HLA, les greffons de fichier, l'administration de DLI et l'utilisation de CSP [74-80].

Sur le plan immunologique, la GvHD chronique s'associe à l'effet GvL mais l'intensité de la GvHD chronique n'est pas corrélée à cet effet [81]. L'état d'immunodépression associé à la GvHD chronique et les infections induites sont les principales causes de mortalité non liée à la rechute (NRM) chez les patients long-survivant après allogreffe [67,82-84].

D'autre part, l'administration de sérum antilymphocytaire, en adjonction au traitement immunosuppresseur prophylactique, a permis d'obtenir une diminution significative du risque de GvHD chronique y compris sévère, de GvHD chronique pulmonaire, de la NRM et une amélioration de la qualité de vie des patients allogreffés de donneur apparenté et non-apparenté [67,82,85-88].

Si la GvHD chronique survient fréquemment chez des patients ayant présenté une GvHD aiguë, la clinique et la physiopathologie de la GvHD chronique diffèrent de celles de la GvHD aiguë [89]. Alors que la GvHD chronique a longtemps été considérée comme une réaction lymphocytaire T en réponse aux antigènes du receveur, des données ont montré plus récemment que les lymphocytes B jouaient également un rôle important dans ce phénomène.

En effet, il existe une perturbation de l'homéostasie lymphocytaire B au cours de la GvHD chronique. Une expansion de lymphocytes B CD21^{lo} [90] a été observée avec un rôle supposé dans l'auto-immunité [91]. Par ailleurs, il a été décrit une diminution de la fréquence des cellules B mémoires et des lymphocytes B B1-like [92] dans ce contexte. Une hyperréactivité des récepteurs des cellules B pour l'antigène (BCR, B cell receptor) a aussi été démontrée [93], s'associant à des taux sériques élevés de BAFF (B cell activating factor of the TNF family) [94]. Récemment, il a été démontré un déficit en fréquence des lymphocytes B régulateurs chez les patients avec une GvHD chronique sévère ou active [95], possiblement en lien à une réduction des populations cellulaires productrices d'interleukine-10. Ce déficit des lymphocytes B régulateurs s'associe à un déficit de reconstitution des cellules B mémoires et une expansion des plasmablastes (**Figure 11**) [96,97]. Enfin, il a été observé que la déplétion lymphocytaire B par le rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20, au moment de l'allogreffe pourrait diminuer l'incidence de GvHD chronique chez l'homme [98].

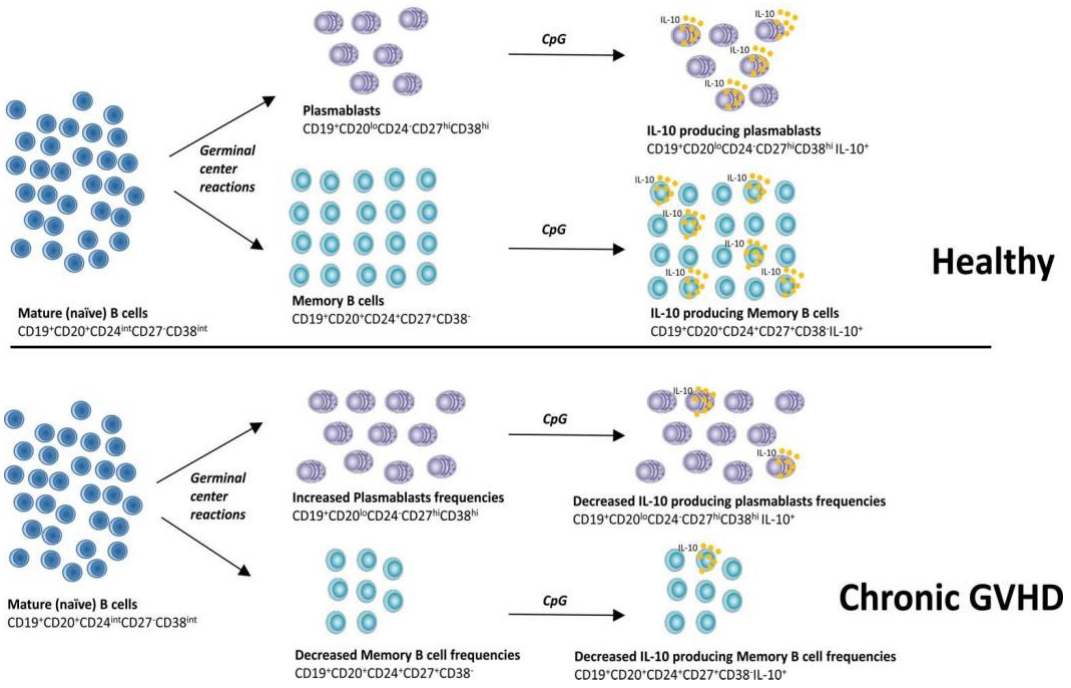

Figure 11. Altération de l'homéostasie B dans la GvHD chronique.

de Masson *et al*. OncoImmunology 2015

Si le traitement de première ligne de la GvHD chronique est standardisé, il n'existe pas de standard de traitement de la GvHD chronique réfractaire (ou cortico-résistante). Ainsi, le traitement de seconde ligne repose régulièrement sur des études de phase précoce ou rétrospectives dont la faiblesse relative des effectifs, les critères d'inclusion et d'évaluation de la sévérité différents rendent la comparaison difficile.

Le traitement de première ligne repose sur la corticothérapie (1mg/kg/24h de prednisone) éventuellement associé à la reprise de la ciclosporine. Ce traitement doit être diminué de manière très progressive après recul suffisant sur son efficacité [99].

La GvHD chronique est considérée comme réfractaire s'il existe une progression des symptômes sous 1mg/kg/24h de prednisone, ou une stabilité au-delà de 4 semaines de traitement sous au moins 0,5mg/kg/24h de prednisone ou l'impossibilité de diminuer la corticothérapie en dessous de 0,5mg/kg/24h et nécessitant l'institution d'un traitement de 2ème ligne.

En seconde ligne de traitement, les principaux traitements proposés sont les bolus de corticoïdes [100], la photochimiothérapie extracorporelle [101-104], le mycophénolate mofétil [105], le rituximab [106,107], les inhibiteurs de tyrosine kinase [108], les anti-JAK1/JAK2 (ruxolitinib) et les anti-Bruton tyrosine kinase (ibrutinib).

Alors que la moitié des patients traités répondent à la corticothérapie, la GvHD chronique réfractaire reste aujourd'hui associée à une morbi-mortalité importante. La majorité des patients poursuivent un traitement immunosuppresseur pendant 12 mois, et plus de la moitié des patients sont toujours sous traitement à 24 mois.

c. La reconstitution hématologique et immunologique

Après une Allo-CSH, la reconstitution des différentes populations de cellules immunitaires respecte plusieurs phases (figure 1). Au décours du conditionnement, les patients subissent une « phase aplasique » (neutropénie sévère ou phase de pré-greffe) jusqu'à ce que les neutrophiles se reconstituent (**Figure 12**) [109]. La dose totale de cellules nucléées (CNT) et la dose de cellules $CD34^+$ dans le greffon sont des facteurs essentiels pour la prise de greffe. Les greffes de sang de cordon ombilical contiennent notamment des taux de CNT inférieurs à ceux de la greffe de moelle osseuse (GMO) et de la greffe de cellules souches du sang périphérique (CSP), ce qui augmente le temps de prise de greffe (sortie des neutrophiles vers 14 jours après greffe de CSP, vers 21 jours après greffe de MO et vers 30 jours après greffe de sang de cordon ombilical [110,111]. Une dose élevée de CNT a récemment été associée à une amélioration de la survie globale (SG), à une diminution des rechutes et à une incidence accrue de GvHD chronique chez les patients recevant un greffon de CSP [112]. D'autre part, les patients recevant un greffon de CSP avec un taux élevé de $CD34^+$ présentaient une prise de greffe des plaquettes plus rapide, au détriment d'une SG plus faible et d'un taux de rechute plus élevé [113].

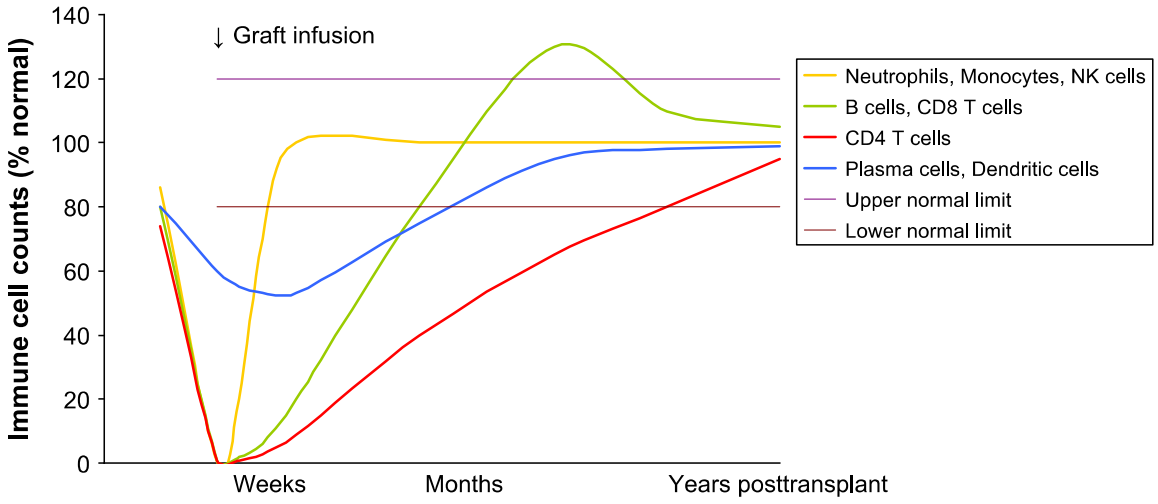

Figure 12. Reconstitution immunologique après allogreffe de CSH.
Storek J *et al*. Expert Opin Biol Ther 2008

Les courbes représentent la reconstitution des différentes populations immunitaires. La courbe orange représente les cellules de l'immunité innée (neutrophiles, monocytes, lymphocytes natural killer) ; la courbe verte représente les lymphocytes T CD8 et les lymphocytes B ; la courbe bleue représente les plasmocytes et les cellules dendritiques ; la courbe rouge représente les lymphocytes T CD4.

Au décours de l'aplasie, l'immunodépression persiste malgré la restauration des fonctions phagocytaires. La reconstitution immunitaire lymphocytaire est un processus intervenant dans les mois suivant la prise de greffe. Ainsi, l'immunocompétence n'est retrouvée qu'après de nombreux mois et certains patients présentent toujours certains déficits immunitaires plusieurs années après une allogreffe de CSH. Typiquement, les lymphocytes natural killer sont les premiers lymphocytes à se reconstituer, suivi par les lymphocytes T $CD8^+$ qui atteignent des valeurs physiologiques entre 2 et 8 mois après la greffe. Les lymphocytes B puis les lymphocytes T $CD4^+$ se reconstituent dans un délai proche des lymphocytes T $CD8^+$ [109].

Une reconstitution rapide et fonctionnelle d'un système immunitaire à partir des cellules du donneur est essentielle à la survie à long terme des patients allogreffés de CSH. La durée de l'immunosuppression et la qualité de la reconstitution de chaque population cellulaire de l'immunité sont hautement dépendantes de nombreux facteurs tels que le type de conditionnement, la source de cellules souches, la nature du traitement immunosuppresseur, l'existence d'une GvHD aiguë ou chronique, et l'existence de complications infectieuses [114]. Récemment, le développement des greffes à partir de donneurs dits alternatifs (sang de cordon ombilical ou donneur haploidentique) ont été associés à une immunodéficience prolongée en raison d'un retard de reconstitution immunitaire et de nouvelles stratégies d'optimisation de la reconstitution immunitaire deviennent nécessaires.

1. Reconstitution des lymphocytes T

La reconstitution des populations lymphocytaires T repose sur l'expansion périphérique des lymphocytes T mémoires du greffon, médiée par les cytokines et la rencontre des antigènes allogéniques de l'hôte, secondairement suivie d'une production thymique de lymphocytes T naïfs [115]. Les lymphocytes T $CD4^+$ dépendent davantage de la génération thymique des lymphocytes T naïfs $CD4^+CD45RA^+$ et se reconstituent plus tardivement que les lymphocytes T $CD8^+$, qui se reconstituent généralement vers J100 ; ce qui explique l'inversion du rapport CD4/CD8 tôt après Allo-CSH [110,116]. Le délai de reconstitution complète des lymphocytes T $CD4^+$ peut prendre jusqu'à 2 ans après Allo-CSH [117].

La reconstitution des lymphocytes T naïfs $CD4^+CD45RA^+$ est essentielle pour contrôler les infections et éviter la réapparition de cellules tumorales après Allo-CSH [118,119]. Trois mois après Allo-CSH, un nombre médian de 200 lymphocytes T $CD4^+$ / µL était observé [120]. Les cercles d'excision d'ADN (TREC) lors du réarrangement des récepteurs des lymphocytes T (TCR) ont été étudiés comme paramètre d'évaluation de la reconstitution lymphocytaire T naïve $CD4^+CD45RA^+$, dérivés du thymus [118]. Les taux de TREC restent faibles jusqu'à 3 à 6 mois après greffe allogénique [115].

Alors que l'âge est directement associé à une atrophie thymique et une perte de fonction thymique [121], l'homéostasie des lymphocytes T est préservée par expansion périphérique [115]. Ainsi, les patients âgés ont une mauvaise reconstitution thymique après allo-CSH, malgré l'utilisation de conditionnements non myéloablatifs. De même la survenue d'une GvHD aiguë ou chronique, ont des effets dévastateurs sur la reconstitution thymique après Allo-CSH [119,122-124].

Les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ naïfs sont dépendants de l'interleukine-7 (IL-7), de l'interleukine-2 (IL-2) et de l'activation via le TCR pour proliférer et survivre [125]. En revanche, les lymphocytes T mémoires $CD8^+CD27^+$ peuvent se développer indépendamment du TCR, sous l'influence seule de cytokines telles que l'IL-7 et l'interleukine-15 (IL-15) [126]. Chez les patients plus âgés, le déficit en lymphocytes T naïfs $CD4^+CD45RA^+$ associé à un faible répertoire TCR conduit à un risque accru d'infections opportunistes et probablement à un risque accru de rechute tumorale [127,128]. Le déficit en lymphocytes T naïfs $CD4^+CD45RA^+$ est en outre aggravé par la GvHD [129,130].

Les lymphocytes T mémoires [mémoires centraux et mémoires effecteurs, les lymphocytes mémoires résidant dans les tissus et les lymphocytes effecteurs sont essentiels au contrôle des réactivations virales après Allo-CSH. En rencontrant des antigènes, les lymphocytes T mémoires se différencient en lymphocytes effecteurs puis lysent les cellules infectées et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (IFN-γ et TNF-α) [131]. La surveillance immunitaire des TCM survient par le trafic des lymphocytes mémoires effecteurs et lymphocytes effecteurs depuis les organes lymphoïdes secondaires vers les organes non-lymphoïdes [132]. Inversement, les lymphocytes mémoires résidant dans les tissus (exemple : le foie, les poumons, l'intestin et la peau) fournissent une réponse antivirale immédiate (cytotoxicité et sécrétion d'IFN-γ) sans trafic préalable [133].

Une sous-population de lymphocytes T $CD4^+$ aux fonctions régulatrices (lymphocytes T régulateurs ou Treg) ont démontré leur importance dans les résultats de l'Allo-CSH [134]. De nombreux modèles cliniques, précliniques et expérimentaux ont démontré que la reconstitution des lymphocytes Treg jouait un rôle essentiel dans le contrôle du risque de GvHD tout en préservant l'effet du greffon contre la leucémie (GvL) [135,136]. En effet, les Treg inhibent l'activité des lymphocytes T effecteurs, réduisant ainsi l'inflammation et favorisant l'homéostasie immunitaire après l'Allo-CSH [137,138].

Le facteur de transcription FoxP3, est essentiel pour le développement et la fonction des Treg et est utilisé comme marqueur d'identification de cette population cellulaire [138,139]. Cette sous-population fonctionnellement mature de lymphocytes T peut également être induite à partir de lymphocytes T naïfs $CD4^+CD45RA^+$ périphériques [140]. Les Tregs naturels (nTregs) sont dérivés du thymus et sont caractérisés par la co-expression de CD4, une forte expression de CD25 et FoxP3 [141]. Les Treg induits ou adaptatifs (iTregs) sont générés dans les organes lymphoïdes périphériques en présence de TGF-β [142]. Certaines études récentes ont montré que les nTregs étaient plus stables que les iTregs en termes de profils de méthylation de l'ADN et de régulation épigénétique de FoxP3 [143,144].

2. Reconstitution lymphocytaire B

Les patients allogreffés de CSH présentent souvent une récupération tardive des lymphocytes B, conduisant à un déficit de l'immunité médiée par ces cellules. En général, le nombre de lymphocytes B revient dans les valeurs normales dans les 12 mois suivant l'Allo-CSH [145], bien qu'une reconstitution complète puisse nécessiter jusqu'à 2 ans. Au cours des premiers mois, très peu de lymphocytes B circulants sont observés [145,146] et dans les 1 à 2 ans suivant l'Allo-CSH, le nombre de lymphocytes B atteint des niveaux dépassant ceux des adultes normaux suivis d'un déclin graduel, similaire à l'ontogénie physiologique observée chez les jeunes enfants [146]. Les premiers lymphocytes B émergeant dans le sang sont les formes B transitionnelles

$CD19^{+}CD21^{low}CD38^{high}$, qui diminuent par la suite en pourcentages tandis que les formes B matures $CD19^{+}CD21^{high}CD27^{-}$ naïves sont en voie de reconstitution [110,147].

Les lymphocytes B transitionnels ont d'abord été décrits comme $CD24^{high}CD38^{high}$ [147] avant qu'un autre marqueur soit identifié, distinguant les formes transitionnelles T1 et T2. Les formes T1 $CD21^{low}$ ont été décrites comme la première population de lymphocytes B migrant de la moelle osseuse, se différenciant vers un phénotype $CD21^{+}$ (formes T2) et devenant alors les précurseurs du pool de lymphocytes B naïfs $CD19^{+}CD21^{high}CD27^{-}$ dans le sang périphérique et les tissus [148].

La reconstitution complète des lymphocytes B nécessite à la fois la récupération des lymphocytes B $CD19^{+}CD21^{high}CD27^{-}$ naïfs et des $CD19^{+}CD27^{+}$ mémoires. La reconstitution des lymphocytes B mémoires se produit suite à une exposition à un antigène de l'environnement, ou à un vaccin, et nécessite le soutien des lymphocytes T $CD4^{+}$ [122]. La reconstitution complète des lymphocytes B mémoires $CD19^{+}CD27^{+}$ peut nécessiter jusqu'à 5 ans après Allo-CSH [146]. Dans l'étude de Corre *et al.*, le nombre de lymphocytes B naïfs $CD19^{+}CD21^{high}CD27^{-}$ s'était normalisé à 6 mois, avant d'atteindre des valeurs supérieures à la normale près de 24 mois après une Allo-CSH avec conditionnement myéloablatif [149]. En revanche, les lymphocytes B mémoires $CD19^{+}CD27^{+}$ restaient déficitaires, de manière persistante pendant les 2 premières années de suivi [149]. D'autres auteurs ont également observé une reconstitution relativement rapide des lymphocytes B naïfs suivie d'une reconstitution retardée des lymphocytes B mémoires [150,151].

Par ailleurs, une expansion précoce de lymphocytes B $CD19^{+}CD5^{+}$, décrits comme une sous-population circulante de lymphocytes B pré-naïfs de phénotype intermédiaire entre les lymphocytes B transitionnels et naïfs, [152] a été rapportée [92,149]. Ces lymphocytes n'ont démontré que des réponses faibles à la stimulation des récepteurs lymphocytaires B (BCR) et au ligand CD40. Cependant, à l'image des lymphocytes B naïfs $CD19^{+}CD21^{high}CD27^{-}$, ces lymphocytes étaient capables de se différencier en plasmocytes et de fonctionner comme des cellules présentatrices d'antigène (APC) [152].

Lors des 2 premières années après l'Allo-CSH, la réponse humorale des lymphocytes B reste défectueuse en raison de délais de reconstitution variables des différentes sous-populations B. La reconstitution retardée des lymphocytes T et l'inversion du rapport CD4/CD8 peuvent également contribuer au faible nombre de lymphocytes B circulants après Allo-CSH [146].
De plus, les lymphocytes B mémoires $CD19^{+}CD27^{+}$ peuvent être impactés par le faible taux de lymphocytes T auxiliaires dont ils nécessitent le soutien lors de la commutation isotypique [146].

L'hypermutation somatique semble également être affectée, notamment en présence de lymphocytes T $CD4^{+}$ provenant du donneur, laissant suggérer un défaut du microenvironnement [146,153]. Des taux sériques normaux d'IgM sont généralement mesurables 3 à 6 mois après Allo-CSH [154,155], suivis d'une normalisation des IgG1/IgG3, IgG2/IgG4 et IgA sériques, respectant les étapes du développement physiologique lors des premières années de la vie [156]. Cependant, des déficits de classe d'anticorps ont été rapportés à long terme chez certains patients [157]. Le répertoire des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) est souvent caractérisé par un changement de classe retardé et une dominance oligoclonale en raison de réarrangements spécifiques dominants à différents temps chez ces patients [155,158]. La mesure de la diversité du répertoire lymphocytaire B, par analyse de la région 3 déterminant la complémentarité IgH (CDR3), a révélé une variation limitée du répertoire IgH CDR3 dans les lymphocytes B mémoires $CD19^{+}CD27^{+}$ par rapport aux lymphocytes B naïfs $CD19^{+}CD21^{high}CD27^{-}$ à 3 et 6 mois après Allo-CSH. Une diminution du répertoire IgH CDR3 des lymphocytes B mémoires $CD19^{+}CD27^{+}$, mais pas des lymphocytes B naïfs $CD19^{+}CD21^{high}CD27^{-}$ a également été observée par rapport à des témoins sains suggérant un rôle des lymphocytes B mémoires $CD19^{+}CD27^{+}$ dans la restriction oligoclonale décrite [154]. Les lymphocytes B mémoires $CD19^{+}CD27^{+}$ et les lymphocytes B naïfs $CD19^{+}CD21^{high}CD27^{-}$ tendent à atteindre une diversité normale, comparable aux individus sains, 12 mois après Allo-CSH [154].

Différents paramètres de l'Allo-CSH peuvent influencer la reconstitution des lymphocytes B. Ainsi, les patients recevant de l'anti-thymoglobuline (Grafalon, anciennement ATF-fresenius) présentent un retard de reconstitution des lymphocytes B $CD19^+$ jusqu'à 5 mois après l'Allo-CSH en comparaison aux autres patients [159]. L'ATG est un puissant immunosuppresseur administré avant la greffe pour prévenir le rejet de greffe et réduire l'incidence de la GvHD aiguë et chronique chez les patients recevant des greffons de donneurs non apparentés [159,160]. Ainsi, les patients traités par ATG présentaient une reconstitution des lymphocytes B naïfs $CD19^+CD21^{high}CD27^-$ et mémoires $CD19^+CD27^+$ significativement inférieure aux patients ne recevant pas d'ATG dans le premier mois après Allo-CSH, soulignant l'impact délétère de l'ATG sur la reconstitution lymphocytaire B.

Une reconstitution retardée des lymphocytes B a été observée chez les patients recevant un conditionnement non-myéloablatif en comparaison aux patients recevant un traitement myéloablatif, avec une réduction significative du nombre de lymphocytes B chez la majorité des patients jusqu'à 12 mois après Allo-CSH [161]. Cependant, ces résultats peuvent en partie être expliqués par l'âge plus avancé des patients et une incidence plus élevée de GvHD aiguë dans cette cohorte [161].

Les GvHD aiguë et chronique ont été associées à une diminution du nombre de précurseurs lymphoïdes B chez les patients, en comparaison aux patients ne présentant pas de GvHD, après allogreffe de moelle osseuse [129]. Les patients développant une GvHD chronique extensive dans l'année suivant la greffe présentaient des pourcentages de précurseurs lymphoïdes B inférieurs en comparaison aux patients sans GvHD chronique ou avec une GvHD chronique limitée [129]. D'autre part, un déficit en lymphocytes B $CD19^+$ et une perturbation de l'homéostasie des lymphocytes B ont été observées au diagnostic de GvHD chronique et chez les patients atteints de GvHD chronique active [162,163]. La source de cellules souches peut également influencer le nombre de lymphocytes B circulants avec des taux plus élevés chez les receveurs de greffons de cellules souches périphériques. Cependant, ceci peut être attribué à la quantité supérieure de

lymphocytes B matures dans les greffons de CSP en comparaison aux greffons de moelle osseuse [129,164,165].

Enfin, les patients présentant un nombre de lymphocytes B $CD19^+$ normaux ne sont pas considérés comme pleinement immunocompétents en raison de l'observation d'une diminution de la fonctionnalité des lymphocytes B et de réponses vaccinales altérées chez ces patients [146]. L'absence de lymphocytes B mémoires $CD19^+CD27^+$, des hypogammaglobulinémies, une altération de la commutation de classe des immunoglobulines et une perte de complexité dans le réarrangement des gènes des immunoglobulines exposent les patients allogreffés aux infections à bactéries encapsulées telles que Streptococcus pneumoniae et Haemophilus influenzae [110,166].

3. Facteurs influençant la reconstitution immunitaire après Allo-CSH

La GvHD aiguë, qui est une réponse immunitaire dirigée contre le système immunitaire, les tissus et les organes de l'hôte [167,168] peut inhiber les fonctions des lymphocytes T en limitant la diversité du TCR, en impactant le développement des lymphocytes T et en engendrant une dysrégulation de la sécrétion cytokinique (en lien à des dommages médullaires, thymiques, ou à un syndrome de relargage de cytokines) [169].

De nombreux chercheurs se sont également concentrés sur l'évaluation du nombre de lymphocytes Treg après Allo-CSH, en raison de leur rôle majeur dans le contrôle du risque de GvHD. Ainsi, il a été démontré que la fréquence de Treg $CD4^+CD25^+$ était significativement inférieure chez les patients atteints de GvHD aiguë ou chronique sévère [170]. Par ailleurs, une diminution du taux de Treg $CD4^+CD25^+$ était corrélée à une augmentation de la sévérité de la GvHD [170].

La moelle osseuse, qui donne naissance à l'ensemble des lignées hématopoïétiques, est le site d'origine des lymphocytes de l'immunité adaptative [171]. Récemment, la moelle osseuse a été établie comme une cible supplémentaire de la GvHD conduisant à l'épuisement des progéniteurs hématopoïétiques au sein de la niche médullaire [172], et entraînant une hématopoïèse perturbée et une reconstitution immunitaire retardée [173]. Avec la moelle osseuse, le thymus joue un rôle important dans la maturation des précurseurs hématopoïétiques et le développement des lymphocytes T [119]. La GvHD aiguë diminue considérablement la production thymique et donc la récupération des lymphocytes T $CD4^+$ et des répertoires de lymphocytes T diversifiés [119]. La lymphopénie T et le répertoire inadéquat de lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ jusqu'à 1 an après Allo-CSH favorisent les infections récurrentes avec des virus latents.

D'autre part, le traitement par corticostéroïdes des patients atteints de GvHD aiguë, ou d'autres médicaments immunosuppresseurs, augmente le risque de réactivation virale [174,175]. Il a été démontré que le risque d'infections à CMV était directement lié à la dose et à la durée d'administration des corticostéroïdes [176]. L'administration de doses élevées de corticostéroïdes s'est avérée être un facteur de risque indépendant de troubles de la récupération fonctionnelle des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ spécifiques du CMV [176]. De plus, Özdemir *et al.* ont rapporté que les corticostéroïdes induisaient une altération significative de la production de TNF-α par les lymphocytes T $CD8^+$ [177].

Bien que la déplétion des lymphocytes T lors de l'Allo-CSH réduise le risque de GvHD, elle s'associe à un retard de reconstitution immunitaire, à des complications infectieuses et à un risque accru de rechute [178]. Ainsi, la déplétion *ex vivo* des lymphocytes T, par sélection des cellules $CD34^+$ ou par déplétion des cellules $CD3^+/CD19^+$, n'est pas réalisée en routine et les protocoles de réplétion ont largement été étudiés [179,180]. Par ailleurs, les agents réduisant ou altérant les lymphocytes T *in vivo* comprennent l'anti-thymoglobuline (ATG) et un anticorps anti-CD52 (alemtuzumab) [178,181]. L'administration d'ATG induit ainsi une immunosuppression

prolongée des lymphocytes T $CD4^+$, des lymphocytes Treg $CD4^+CD25^+CD127^-$ [181] et semble être moins lymphopéniant que l'alemtuzumab [182].

La source de cellules souches impacte également le délai à la reconstitution immunitaire après Allo-CSH. Ainsi, il a été démontré que la source du greffon était un facteur prédictif de la récupération des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques du CMV (CTL-CMV) [120]. Les patients recevant un greffon de cellules souches périphériques avaient une meilleure récupération fonctionnelle des CTL-CMV et une reconstitution plus précoce des lymphocytes T $CD4^+$ spécifiques du CMV que les patients recevant des greffons de moelle osseuse [176,183]. Ces résultats peuvent être expliqués par la richesse supérieure des greffons de cellules souches périphériques en lymphocytes et en lymphocytes T mémoires $CD4^+CD45RO^+$ [184] et en cellules T spécifiques du CMV [185].

d. Les infections

Selon les phases d'immunodépression précédemment décrites, les patients présentent une vulnérabilité spécifique aux différents agents infectieux (**Figure 13**) [114,186].

- Pendant l'aplasie avant la prise de greffe, il existe une susceptibilité accrue aux infections bactériennes (bacilles gram négatif et cocci gram positif) et fongiques (notamment *Aspergillus*) de la flore du tube digestif, de la flore cutanée ou de l'environnement du patient ; qui restent relativement bien contrôlées par les prophylaxies médicamenteuses et les traitements curatifs [187].
- Les 100 premiers jours après la prise de greffe (phase post-greffe) sont caractérisés par des déficits immunitaires cellulaires, avec des nombres réduits de lymphocytes NK (système immunitaire inné) et de lymphocytes T (système immunitaire adaptatif), engendrant une vulnérabilité des patients aux réactivations virales à CMV et à virus Epstein – Barr (EBV) et aux maladies virales associées [188]. Le risque d'infections fongiques (*Aspergillus* ou *Pneumocystis jirovecii*) reste considérable.

- Au-delà des 100 premiers jours, les réactivations virales à CMV, à Varicelle-Zona virus, à virus respiratoires, à EBV, à *Pneumocystis jirovecii* et les infections bactériennes (germes bactériens encapsulés) sont autant d'agents infectieux potentiellement pathogènes pour le patient allogreffé.

L'occurrence d'une GvH, aigue ou chronique, nécessitant l'introduction d'une corticothérapie à forte dose et d'immunosuppresseurs renforcent l'état d'immunodépression du patient allogreffé et majore le risque d'infections (bactérien, viral et fongique) [114].

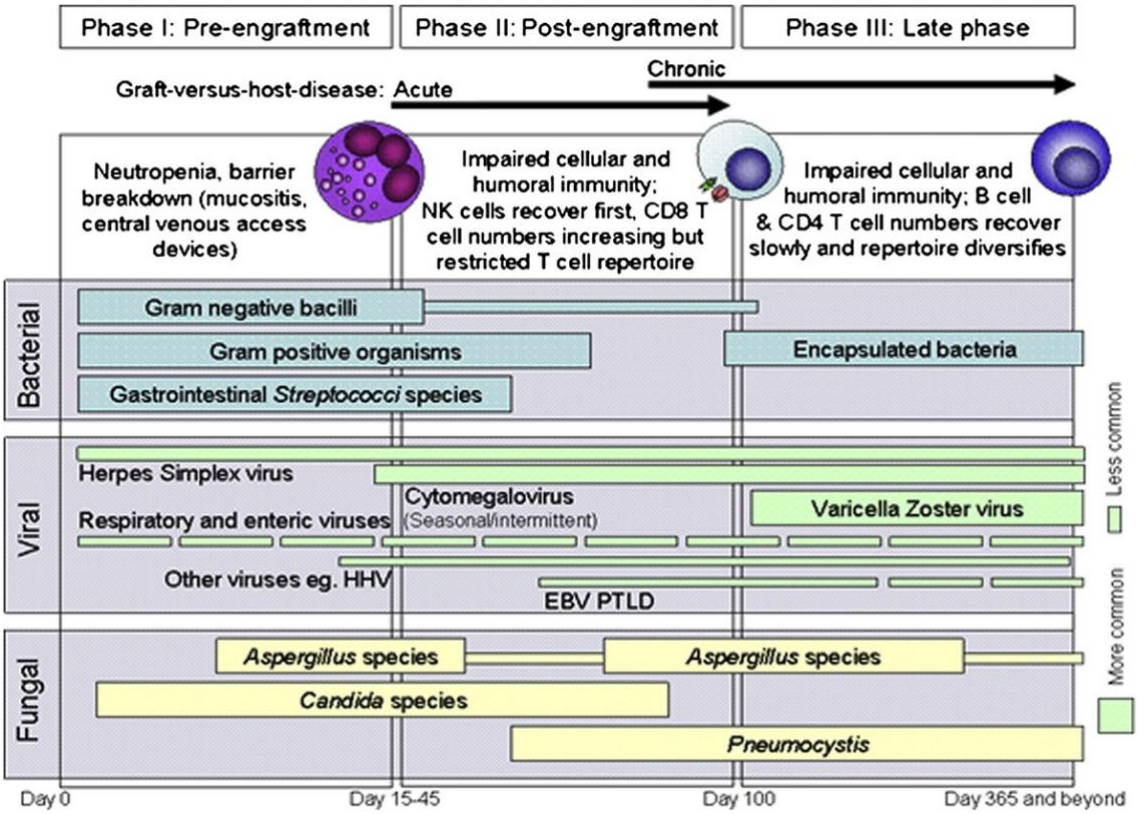

Figure 13. Phases de risque infectieux chez les patients allogreffés. EBV, Epstein-Barr virus ; HHV6, human herpesvirus 6 ; PTLD, Lymphoprolifération post-transplantation.

Tomblyn *et al*. Biol Blood Marrow Transplant 2009

LES LYMPHOCYTES T GAMMA-DELTA

1. Généralités

Lors de l'intrusion d'un agent pathogène dans l'organisme, une réponse immunitaire dite innée est induite, faisant intervenir les cellules immunitaires tissulaires avoisinant le site de l'infection. Dans les premiers jours de l'infection, une réponse immunitaire adaptative se développe, faisant intervenir les lymphocytes B et T des organes lymphoïdes secondaires responsables du drainage lymphatique du site infectieux concerné. Ces lymphocytes, dès leur activation auront pour particularité d'être spécifiques des antigènes de l'agent pathogène.

A la différence des lymphocytes T conventionnels qui reconnaissent les peptides antigéniques présentés par les molécules du CMH de classe I (CMH-I) ou II (CMH-II), les lymphocytes T non conventionnels reconnaissent des peptides antigéniques présentés par les molécules non classiques du CMH. Certaines populations, telles que les lymphocytes Natural Killer (NK) ou les lymphocytes invariants associés aux muqueuses (MAIT) peuvent exprimer un TCR αβ tandis que les lymphocytes T gamma-delta (γδ) expriment un TCR composé des chaînes γ et δ.

Après identification des gènes codant pour la structure des immunoglobulines dans les années 80, les séquences codantes pour la structure du TCR firent l'objet de nombreuses recherches. En 1987, Chien *et al.* décrivaient une région codante inédite, localisée dans le locus de la chaîne α du TCR, et qui semblait se réarranger précocement lors de la différentiation intra-thymique des lymphocytes [189]. Une autre équipe identifiait alors un transcrit dans le thymus murin, et permettait alors la découverte de la chaîne δ du TCR [190]. L'identification de ces nouvelles chaines γ et δ du TCR donnait naissance à une nouvelle sous-population de lymphocytes T non conventionnels.

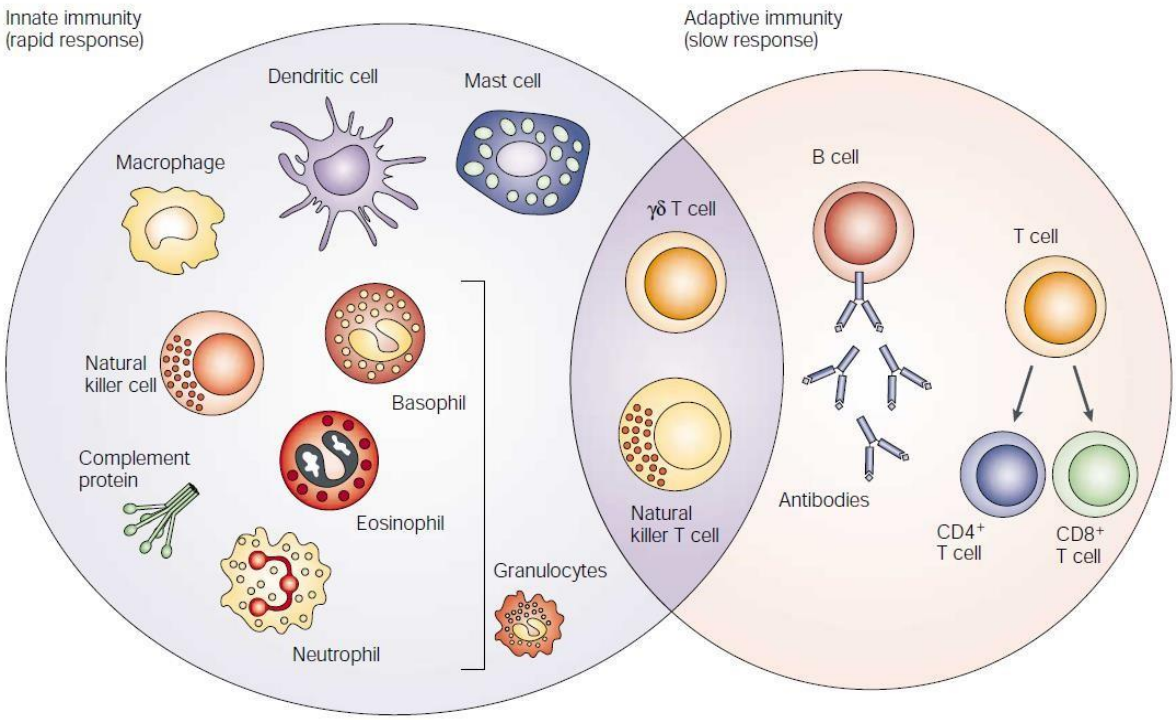

Figure 14. Des lymphocytes T à l'interface entre immunité innée et adaptative.

Dranoff *et al*. Nature Reviews Cancer 2004

Les lymphocytes T γδ sont traditionnellement classés à l'interface des immunités innée et adaptative [191] (**Figure 14**). Leur expansion rapide, le développement de fonctions effectrices sans sélection clonale, et leurs mécanismes de reconnaissance antigénique leur confèrent des caractéristiques propres à l'immunité innée. D'autre part, la structure et les réarrangements de leur TCR confèrent aux lymphocytes T γδ des caractéristiques de l'immunité adaptative.

Les lymphocytes T γδ interviennent précocement dans la défense de l'organisme contre les pathogènes. Leur activation rapide est expliquée par les mécanismes suivants :

- Leur localisation principalement tissulaire (pouvant représenter jusqu'à 70% des lymphocytes présents), permettant une détection *in situ* des cellules infectées ou tumorales (à la différence des lymphocytes T αβ, majoritairement présents dans les organes lymphoïdes secondaires).

- La capacité à reconnaitre les cellules infectées ou tumorales indépendamment d'une présentation antigénique par les CPA.
- Leur fréquence élevée permet aux lymphocytes T γδ de ne nécessiter ni sélection ni expansion clonale pour répondre efficacement à une infection ou au stress.

2. Répertoire des lymphocytes T γδ

Les lymphocytes T γδ expriment un TCR sous forme d'hétérodimère TCRγ/TCRδ, en liaison au complexe CD3. De manière comparable au TCR des lymphocytes T conventionnels, chaque chaîne est constituée d'une partie variable (V), d'une partie constante (C), qui respectent des mécanismes de recombinaison similaires aux mécanismes décrits pour les lymphocytes T αβ.

Ainsi, la diversité du TCR γδ est générée par la recombinaison :

- Des segments V (Variable), D (Diversité) et J (Jonctionnel) de la chaîne δ.
- Des segments V et J de la chaîne γ.

Cependant, les lymphocytes T γδ humains présentent un répertoire génique restreint des segments V en comparaison aux lymphocytes T conventionnels. Il existe donc 6 gènes Vγ fonctionnels : 5 appartiennent à la famille VγI (Vγ2, 3, 4, 5, 8) et le dernier (Vγ9) appartient à la famille VγII (**Tableau 3**) [192]. Le nombre de gènes Vδ fonctionnels est également plus faible que le nombre de gènes fonctionnels de la chaîne β.

Cependant, la diversité combinatoire théorique du TCR γδ est supérieure à celle du αβ (environ 10^{20} combinaisons possibles contre 10^{15}). Ce phénomène s'expliquerait principalement par l'utilisation de nombreuses copies en tandem de gènes D, et par une importante diversité jonctionnelle (insertion ou délétion de nucléotides) qui engendrerait une diversité forte de la « Complementary determining region 3 » de la chaîne δ [193].

Tableau 3. Gènes des TCR αβ et γδ murins et humains.
Girardi *et al.* J Invest Dermatol 2006

γδ Segments			αβ Segments		
	Mouse	Human		Mouse	Human
Vδ	11	3	Vα	23	41
Dδ	2	3	Jα	61	61
Jδ	2	4			
			Vβ	31	30
Vγ	7	5	Dβ	2	2
Jγ	4	3	Jβ	14	14

[1]Total number of genes that are available for recombination for both mouse and human TCRs.

Cependant, la diversité du TCR γδ observée est nettement moins importante en raison d'associations préférentielles entre les chaînes γ et les chaînes δ (porteuses de régions Vγ ou Vδ spécifiques) lors de la maturation thymique. Par exemple, la chaîne Vγ9 humaine s'associe exclusivement avec la chaîne Vδ2 tandis que les autres chaînes Vγ (2, 3, 4, 5 et 8) s'associent à la chaîne Vδ1 [194].

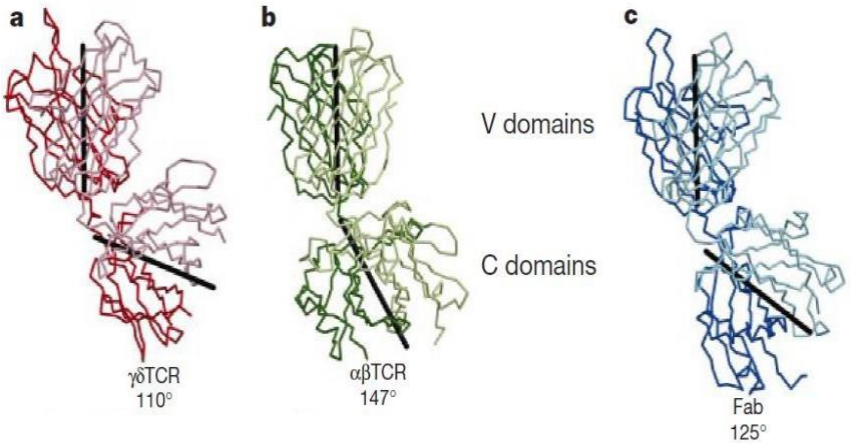

Figure 15. Structure tridimensionnelle du TCR γδ.
Allison *et al*. Nature 2001
Structure d'un TCR humain de type Vγ9Vδ2 (a), d'un TCR αβ (b) et de la partie Fab d'une immunoglobuline (c).
Les traits noirs représentent l'angulation des domaines C et V.

L'analyse de la structure tridimensionnelle du TCR γδ révèle de nombreuses différences avec le TCR αβ : l'angle formé entre les domaines C et V est plus prononcé dans un TCR γδ et présente une proximité structurelle avec le fragment Fab d'une immunoglobuline (Ig) (**Figure 15**). Cette structure tridimensionnelle particulière semble expliquer la nature différente des complexes antigéniques reconnus.

Les sous-populations de lymphocytes T γδ, caractérisées par la nature des parties variables (V) des chaînes γ et δ de leur TCR, diffèrent chez l'Homme et la souris et il n'existe pas toujours de correspondance entre les répertoires de ces espèces. Par exemple, les lymphocytes T dendritiques épidermiques Vγ5Vδ1 observés dans l'épiderme murin n'existe pas chez l'Homme ; et les lymphocytes T Vγ9Vδ2 présents dans la circulation sanguine chez l'Homme sont propres aux primates supérieurs.

Tableau 4. Nomenclature des lymphocytes T γδ murins et humains.
Selon Bergstresser et Takashima.

Table 1. Nomenclature for murine Vγ gene segments

Official designation[a]	Heilig and Tonegawa [2]	Garmen et al. [5]
TCRGV1S1	Vγ5	Vγ3
TCRGV2S1	Vγ6	Vγ4
TCRGV3S1	Vγ4	Vγ2
TCRGV4S1	Vγ7	Vγ5
TCRGV5S1	Vγ1	Vγ1.1
TCRGV5S2	Vγ2	Vγ1.2
TCRGV5S3	Vγ3	Vγ1.3

In the proposed official designation, TCR refers to T cell receptor; G refers to γ; V to variable; 1 to the allocated number for the particular V region family (in this case, numbers 1–5 are based on increasing distance from Jγ); S refers to the designation of a V segment as a member of the family.
[a] WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee on TCR Designation 1995 [3, 4].

Table 3. Nomenclature for human Vγ gene segments

Official designation[a]	Lefranc et al. [24] Foster et al. [25]	Strauss et al. [26] Quertermous et al. [27]
TCRGV1S1P	Vγ1	Vγ1.1 pseudogene
TCRGV1S2	Vγ2	Vγ1.2
TCRGV1S3	Vγ3	Vγ1.3
TCRGV1S4	Vγ4	Vγ1.4
TCRGV1S5	Vγ5	Vγ1.5
TCRGV1S5P	Vγ5P	Vγ1.5 pseudogene
TCRGV1S6P	Vγ6P	Vγ1.6 pseudogene
TCRGV1S7P	Vγ7P	Vγ1.7 pseudogene
TCRGV1S8	Vγ8	Vγ1.8
TCRGV2S1	Vγ9	Vγ2
TCRGV3S1P	Vγ10	Vγ3
TCRGV4S1P	Vγ11	Vγ4
TCRGV5S1P	VA	VA pseudogene
TCRGV6S1P	VB	VB pseudogene

See footnote to table 1 for basis of official designation. In addition, P refers to pseudogene.
[a] WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee on TCR Designation 1995 [3, 23].

Chaque sous-population possède des caractéristiques d'activation, de différenciation, de sécrétion cytokinique ou d'activité cytotoxique propres. Les différentes nomenclatures proposées pour identifier ces sous-populations reflètent la grande complexité du répertoire des lymphocytes T γδ (**Tableau 4**).

3. Distribution tissulaire des lymphocytes T γδ

Chez l'Homme, les lymphocytes T γδ représentent ainsi 0,5 à 16% des lymphocytes présents dans le sang périphérique ou dans les organes lymphoïdes (thymus, amygdales, ganglions lymphatiques, rate). Elles sont également fortement représentées dans le derme, les muqueuses et les tractus digestif et génital (jusqu'à 30% des lymphocytes observés).

La représentation tissulaire des lymphocytes T γδ diffère en fonction de la nature des parties variables des chaînes du TCR γδ [195]. Ainsi, il existe 3 principales sous-populations chez l'Homme : Vδ1, Vδ2 et Vδ3. La sous-population T Vγ9Vδ2 est majoritairement représentée dans le sang périphérique humain (50 à 95% des T γδ) tandis que les lymphocytes T Vδ1 et Vδ3 sont majoritairement présents dans les tissus et organes (thymus, rate, foie, tractus digestif et génital). Le derme, quant à lui, est principalement constitué de lymphocytes T Vδ1.

Chez la souris, les lymphocytes T γδ représentent 1 à 4% des lymphocytes du thymus et des organes lymphoïdes secondaires ; et peuvent représenter jusqu'à 40% des lymphocytes du tractus intestinal et près de 70% des lymphocytes du derme. Les lymphocytes T Vδ1 et Vδ4 sont présents dans la rate, les T Vγ7Vδ4, Vγ7Vδ5 et Vγ7Vδ6 dans l'épiderme et l'épithélium intestinal, les lymphocytes T Vγ4 et Vγ6 dans l'épithélium pulmonaire et les T Vγ6Vδ1 dans les organes génitaux. Une population spécifique de lymphocytes T dendritiques épidermiques Vγ5Vδ1, inexistante chez l'Homme, est retrouvée dans l'épiderme murin (**Tableau 5**) [196].

Tableau 5. Distribution tissulaire des populations T γδ.
Chaque population T γδ murines ou humaines, est caractérisée par son TCR, sa distribution tissulaire et le niveau de diversité de V(D)J.
Bonneville *et al.* Nat Rev Immunol 2010

Species	Peripheral location	Predominant V gene segment usage	V(D)J diversity
Mouse	Adult thymus	Diverse	High
	Spleen	Vγ1 and Vγ4	High
	Lymph nodes	Diverse	High
	Epidermis	Vγ5Vδ1	Invariant
	Liver	Vγ1Vδ6.3, Vγ4 and Vγ6	Intermediate
	Gut epithelia	Vγ7Vδ4, Vγ7Vδ5 and Vγ7Vδ6	Intermediate
	Uterovaginal epithelia	Vγ6Vδ1	Invariant
	Lung epithelia	Vγ4 and Vγ6	Intermediate
Human	Thymus	Vδ1	High
	Peripheral blood	Vγ9Vδ2	Intermediate
	Spleen	Vδ1	High
	Liver	Vδ1 and Vδ3	High
	Gut epithelia	Vδ1 and Vδ3	High
	Dermis	Vδ1	High

4. Modalités d'activation des lymphocytes T γδ

a. Détection de multiples antigènes

L'activation des lymphocytes T γδ, à l'instar de l'activation des lymphocytes T αβ, nécessite la reconnaissance d'antigènes par le TCR. Ainsi, les signaux induits par le stress cellulaire, une transformation tumorale ou une infection par un agent pathogène sont détectés sous forme native par les lymphocytes T γδ.

Cependant, la nature des antigènes reconnus diffère et les lymphocytes T γδ sont activés par des peptides, des lipides associés à des molécules apparentées au CMH (CD1c, CD1d) [197], ou des composés phosphorylés nommés phosphoantigènes. Au total, différents types d'antigènes ont été identifiés [198], capables d'activer chacune des sous-populations T γδ (**Tableau 6**).

Tableau 6. Les ligands des lymphocytes T γδ.
Modifié d'après Vantourout *et al.* Nat Rev Immunol 2013

	Population T γδ	Ligand
Humain	Vδ1	MICA
	Vδ1 (clones)	CD1c
	Vδ1 (sang)	Tétramères CD1d chargés avec sulphatides
	Vδ1	Lipohexapeptides
	Vδ2	ULBP4
	Vγ9Vδ2	Phosphoantigènes
	Vγ4Vδ5 (clones)	EPCR
	Vγ1.3Vδ2	Histidyl-tRNA synthase
	Plusieurs populations	Phycoerythrine
Souris	Vγ2Vδ5 (clones)	I-E^K
	Vγ2Vδ8 (clones)	HSV glycoprotein I
	Vγ1 (clones)	Cardiolipine, apolipoprotéine H
	Vγ1 (clones)	Peptide insuline
	Plusieurs populations	H2-T10, H2-T22
	Plusieurs populations	Phycoerythrine

Des populations de lymphocytes T Vδ1 sont ainsi capables de reconnaitre des molécules du CMH (I-E^K par les T Vγ2Vδ5 murins, H2-T10/H2-T22 par différents clones de T γδ murins) [199] ou des molécules apparentées telles que MICA (Major histocompatibility complex class I-related Chain A), ULBP (UL16 Binding Protein), CD1d ou CD1c. Récemment, la reconnaissance d'une protéine transmembranaire de type 1, homologue des molécules du CMH-I/CD1, par les T Vγ4Vδ5 humains a été décrite : le récepteur EPCR (Endothelial Protein C Receptor) [200]. Enfin, d'autres antigènes tels que les phosphoantigènes, impliqués dans l'activation des T Vγ9Vδ2, apparaissent comme des ligands uniques des lymphocytes T γδ.

b. Régulation de l'activation

Les lymphocytes T γδ étant capables de reconnaitre des antigènes du soi (exemple des molécules du CMH), leur activation nécessite une régulation fine à même de discriminer les cellules saines des cellules infectées et/ou tumorales ; et de contrôler le risque de manifestations auto-immunes. Ainsi, les signaux induits lors d'un stress cellulaire sont détectés par des récepteurs membranaires régulant l'activation des lymphocytes T γδ, et donc leurs fonctions effectrices, par induction de signaux activateurs ou inhibiteurs (**Figure 16**).

Plus précisément, les lymphocytes T γδ possèdent des *Pattern Recognition Receptors* (PRR), impliqués dans la détection des différents agents pathogènes (bactéries, virus, champignon ...), et responsables de l'initiation de la réponse immunitaire par reconnaissance de motifs communs des agents pathogènes (PAMPs). Par exemple, les *Toll-Like Receptors* (TLR), une classe de PRR transmembranaires, sont capables de détecter une grande variété d'agents pathogènes. Les *Nucleotide Oligomerization Domain Receptors* (NLR), une classe de PRR cytoplasmiques, sont également capables de détecter une grande variété d'agents pathogènes. La reconnaissance des PAMPs par les différents PRR active des voies de signalisation, dépendantes ou indépendantes de la molécule MyD88, et mène à la transcription de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-8 ou TNF) et/ou d'interféron de type I (IFN α/β) [201].

Initialement décrits sur les lymphocytes NK, les *Natural Killer Receptors* (NKR) sont également exprimés sur les lymphocytes T γδ et peuvent induire des signaux activateurs ou inhibiteurs. Par exemple, le récepteur activateur NKG2D possède un rôle majeur dans la détection des cellules tumorales ou infectées [202]. Certains lymphocytes T γδ peuvent également exprimer des récepteurs appartenant à la famille des récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR, tels que NKp30, NKp44 ou NKp46) dont la stimulation induit des signaux activateurs. D'autres types de récepteurs, tels que les récepteurs aux fragments Fc des Ig (FcγRIIIA /CD16) ou encore des molécules d'adhérence, sont exprimés et occupent un rôle majeur dans l'activation des

lymphocytes T γδ en maintenant le contact à la cellule cible. Ainsi, la molécule d'adhérence LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1), exprimée à la surface des lymphocytes T Vγ9Vδ2 humains, participe à leur activation en se liant à la molécule ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1), exprimée sur les cellules cibles [203].

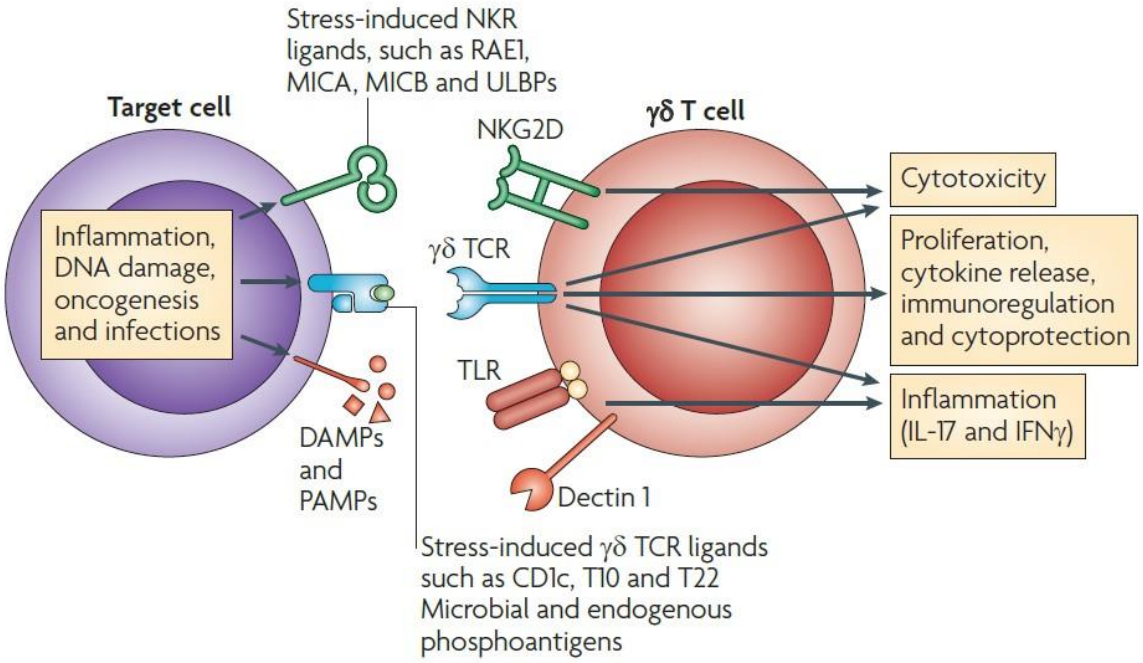

Figure 16. Reconnaissance d'une cellule cible par les lymphocytes T γδ.
Bonneville *et al.* Nat Rev Immunol 2010

Il est admis que la stimulation du TCR γδ est nécessaire à l'activation des lymphocytes T γδ. Cependant, la stimulation des récepteurs NKG2D, qui fonctionne généralement en synergie avec le TCR, à la particularité d'induire une activité cytotoxique des Vγ5Vδ1 murins ou des Vγ9Vδ2 humains contre des cellules tumorales, en l'absence d'engagement du TCR [204,205].

5. Fonctions effectrices des lymphocytes T γδ

En raison de leur distribution tissulaire et de leur grande réactivité, les lymphocytes T γδ occupent un rôle central dans l'immunité de l'organisme contre les agents pathogènes (de nature bactérienne, virale ou parasitaire) et contre certains types de cancers. Cependant, la diversité phénotypique, les spécificités antigéniques et la répartition tissulaire variables engendrent des fonctions effectrices diffèrentes selon les populations.

a. Activité cytotoxique

Les lymphocytes T γδ peuvent éliminer les cellules cibles selon différents mécanismes cytotoxiques, qu'il s'agisse d'une lyse cellulaire directe ou d'une induction de l'apoptose.
Plus précisément, une lyse directe sera médiée par la libération de granules lytiques contenant le couple perforine/granzyme, capable d'engendrer une perforation de la membrane plasmique (via la perforine) puis l'apoptose par clivage des caspases (via les granzymes) [205]. De manière comparable aux lymphocytes NK, ces granules lytiques sont préformés dans le cytoplasme des lymphocytes T γδ, permettant une cytotoxicité rapide : dès le contact avec la cellule cible établi, les granules sont orientés vers cette dernière pour induire la mort cellulaire.
De manière complémentaire, des granules contenant des molécules aux propriétés antimicrobiennes peuvent également être relarguées, telles que la granulysine ou les défensines, [206]. Enfin, l'apoptose de la cellule cible peut être induite par l'engagement des récepteurs de mort CD95 (Système Fas /FasL) ou TRAILR (système TRAIL/TRAILR) [207].

b. Sécrétion cytokinique

Les lymphocytes T γδ peuvent produire puis sécréter des cytokines immunomodulatrices, qui joueront un rôle essentiel dans la réponse immunitaire aux différents agents pathogènes. Impliqués préférentiellement dans l'immunité anti-infectieuse contre les pathogènes intracellulaires, les lymphocytes T γδ produisent principalement des cytokines de type Th1 (IFN-γ et TNF). Cependant, ces cellules sont également capables de sécréter de l'interleukine

17 (IL-17) en présence de champignons ou de bactéries extracellulaires (profil dit « Th17 »), ou de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 en présence de parasites (profil dit « Th2 »). Le profil de sécrétion peut également être intermédiaire par la sécrétion de cytokines issues de différentes polarisations (**Figure 17**) [208].

Les cytokines sécrétées jouent un rôle bénéfique par élimination des agents pathogènes mais peuvent s'avérer être délétères par exacerbation de symptômes auto-immuns (par production d'IFN-γ et d'IL-17), d'allergie ou d'asthme (par sécrétion d'IL-4 et IL-13). D'autre part, la production de cytokines immunorégulatrices (IL-10, TGFβ) confère aux lymphocytes T γδ le contrôle de la réponse des cellules effectrices de l'immunité innée et adaptative, ou la modulation des fonctions des cellules stromales telles que les lymphocytes T dendritiques épidermiques (production de facteurs de croissance épithéliaux) [209].

Les lymphocytes T γδ sécrètent aussi des chimiokines leur permettant de recruter des cellules de l'immunité. Ainsi, certains lymphocytes T Vγ9Vδ2 sécrètent du CXCL13, qui régule l'organisation des lymphocytes B dans les organes et tissus lymphoïdes [210]. D'autres lymphocytes T γδ sécrètent du CCL4 et du CXCL10, favorisant le recrutement de macrophages et de lymphocytes NK [198].

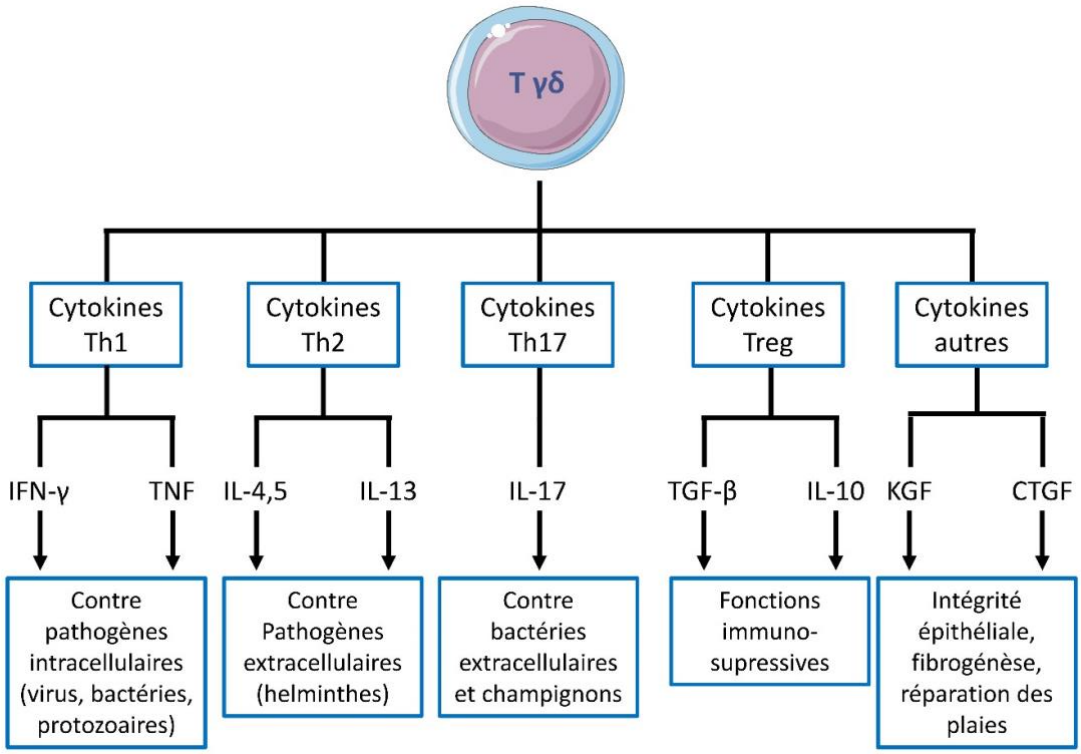

Figure 17. Les profils cytokiniques des lymphocytes T γδ.
KGF: keratinocyte growth factor. CTGF: Connective tissue growth factor.

6. Les lymphocytes T Vγ9Vδ2

Chez l'Homme, la population Vγ9Vδ2 (aussi nommée Vγ2Vδ2 ou γ2δ2) est majoritairement présente dans le sang périphérique (65-90% des lymphocytes T γδ), où elle représente 1 à 10% des lymphocytes T circulants (et peut même atteindre jusqu'à 50% lors d'une infection bactérienne).

Depuis de nombreuses années, les lymphocytes T Vγ9Vδ2 sont étudiés pour leur propriété antibactérienne contre *Mycobacterium tuberculosis* notamment, et suite à la mise en évidence des premiers phosphoantigènes stimulants leur croissance. Il a depuis été démontré que ces cellules reconnaissaient les phosphoantigènes produits par un grand nombre de bactéries ou parasites, tels qu'*Escherichia Coli, Brucella, Listeria, Mycobacterium, Campylobacter, Francisella, Pseudomonas, Salmonella, Yersinia, Plasmodium ou Toxoplasma* [211]. Plus récemment, les propriétés antitumorales et antivirales des lymphocytes T Vγ9Vδ2 ont été étudiées et il a été démontré que la stimulation de ces lymphocytes par des phosphoantigènes engageait une réponse de type Th1 (caractérisée par la sécrétion d'IFN-γ et de TNF) ainsi qu'une activité cytotoxique [212].

a. Propriétés antitumorales

Les propriétés antitumorales des lymphocytes T γδ ont été décrites dans différents types de tumeurs dont les lymphomes, les myélomes, les mélanomes et les néoplasies mammaires, coliques, pulmonaires, ovariennes, rénales ou prostatiques [196]. Ces cellules agissent par cytotoxicité directe ou production de cytokines agissant directement sur la tumeur ; ou régulant indirectement les fonctions effectrices des cellules dendritiques ou les lymphocytes T $CD8^+$, requises pour initier et maintenir une réponse immunitaire efficace.

Les lymphocytes T Vγ9Vδ2 reconnaissent les cellules tumorales par différents mécanismes :

- La dérégulation d'une voie de biosynthèse du cholestérol, nommée voie du mévalonate, qui engendre un excès de production d'isopentenyl-pyrophosphate [213,214] et qui stimule les lymphocytes T Vγ9Vδ2 [215,216].
- Les cellules tumorales modulent l'expression de ligands des récepteurs NKR présents sur les lymphocytes T Vγ9Vδ2. Ainsi, certaines cellules tumorales surexpriment des molécules MICA et ULBP, activant une sécrétion cytokinique (IFNγ, TNF) et engageant une activité cytotoxique par stimulation du récepteur NKG2D [202,217]. Par exemple, les molécules ULBP sont fortement exprimées sur les cellules leucémiques, de lymphomes, ou encore de tumeurs solides telles que les carcinomes du colon ou des ovaires [218,219]. L'expression d'autres ligands de NKR, tels que DNAM-1 (CD155), est modulée au sein des cellules tumorales et induit l'activation des lymphocytes T Vγ9Vδ2 par co-stimulus du TCR et du NKG2D [220]. Les ligands inhibiteurs de NKR peuvent aussi être sous-exprimés par les cellules tumorales, à l'instar des molécules de CMH classiques et non classiques.
- D'autres récepteurs, tels que le récepteur CD16 (FcγRIIIA), sont impliqués dans la détection des cellules tumorales. Ainsi, les lymphocytes T Vγ9Vδ2 peuvent être activés par les anticorps monoclonaux utilisés comme immunothérapie antitumorale, via une activité ADCC dépendante du CD16 [221]. Ces données ont été confirmées par une étude démontrant une efficacité supérieure d'une immunothérapie par trastuzumab (anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain HER2), médiée par les lymphocytes T Vγ9Vδ2 chez des patients atteints de néoplasie mammaire [222]. D'autre part, la combinaison d'une amplification *ex vivo* des lymphocytes T Vγ9Vδ2 $CD16^+$ et d'immunothérapies par trastuzumab et rituximab induit une augmentation de l'activité cytotoxique (ADCC) des lymphocytes T Vγ9Vδ2 et le ciblage de cellules tumorales résistantes aux anticorps monoclonaux seuls [223].

Les études *in vitro* réalisées sur le potentiel antitumoral des lymphocytes T Vγ9Vδ2 ont rapidement été complété d'études *in vivo*. Cependant, ces lymphocytes étant absents chez la

souris, les études précliniques se sont limitées à des modèles de souris immunodéficientes (SCID) xénogreffées avec des tumeurs humaines, et infusées de lymphocytes T Vγ9Vδ2 humains préalablement amplifiés par phosphoantigènes ou aminobisphosphonates et IL-2.

L'importante capacité d'infiltration des lymphocytes T Vγ9Vδ2 humains, après injection dans les tumeurs de sein, de vessie, de mélanome ou de pancréas fut démontré ; avec l'obtention d'un contrôle de la croissance tumorale [222,224]. De manière intéressante, l'infiltration tumorale corrélait avec la diminution de leur taux dans le sang périphérique [225]. Il a également été démontré que les T Vγ9Vδ2 pouvaient infiltrer des xénogreffes de tumeurs mammaires et freiner leur croissance *in vivo* chez la souris [226,227].

Le potentiel antitumoral des lymphocytes T Vγ9Vδ2 a permis le développement d'essais cliniques d'immunothérapie anticancéreuse, par utilisation de phosphoantigènes synthétiques ou d'aminobiphosphonates, chez des patients atteints d'hémopathies ou de tumeurs solides (**Figure 18**) [228,229].

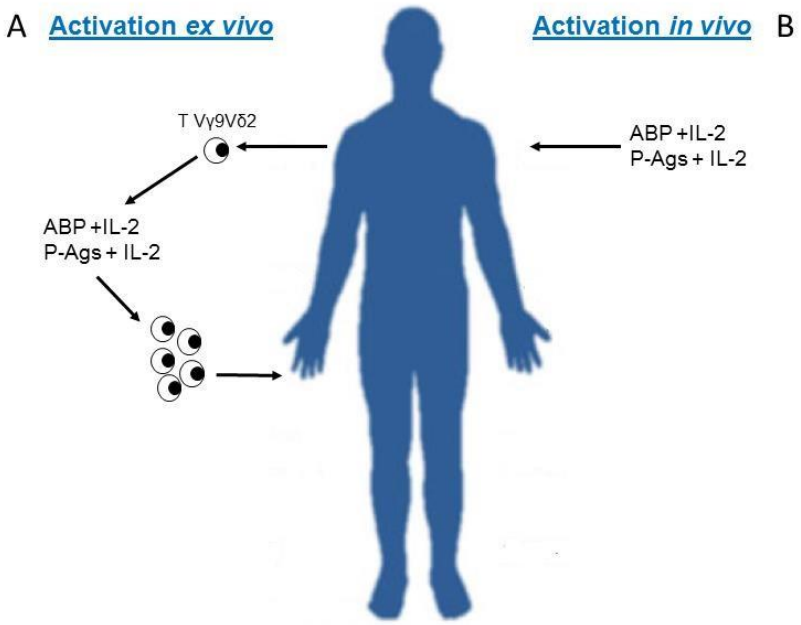

Figure 18. Stratégies d'immunothérapie utilisant les T Vγ9Vδ2.
Adapté de Castella *et al.* Cell Mol Life Sci 2011

Dans ces essais cliniques, les lymphocytes T Vγ9Vδ2 autologues faisaient soit l'objet d'un transfert adoptif après amplification *ex vivo* (via phosphoantigènes ou aminobisphosphonates et IL-2, **Figure 18A**); soit l'objet d'une amplification *in vivo* par administration de phosphoantigènes, ou aminobisphosphonates, et d'IL-2 (**Figure 18B**). Les résultats cliniques observés étaient encourageants, avec le contrôle de la progression tumorale chez certains patients et une tolérance satisfaisante de l'amplification *in vivo* [228,229].

b. Propriétés antivirales

Parmi les entités cellulaires impliquées dans l'immunité innée, les lymphocytes T γδ ont fait la preuve d'une activité antivirale large (rétrovirus, flavivirus, paramyxovirus, orthomyxovirus, picornavirus, coronavirus, arénavirus, herpesvirus, hepadnavirus et orthopoxvirus) [230,231]. Si les propriétés antivirales des lymphocytes T $V\delta2^-$ ont largement été décrites, les lymphocytes T Vγ9Vδ2 ont récemment été étudiés grâce au développement des stratégies d'amplification. Ainsi, les lymphocytes T Vγ9Vδ2 font l'objet d'études pour leur activité antivirale contre les coronavirus, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus de l'hépatite C (VHC), le virus de la grippe (Influenza) et l'EBV :

- Severe Acute Respiratory Syndrome lié au coronavirus (SARS-CoV) : une expansion de lymphocytes T Vγ9Vδ2 et un taux important d'immunoglobulines anti-SARS-CoV furent observés à 3 mois de l'installation des premiers symptômes chez des patients présentant un syndrome de détresse respiratoire aigu [232]. Par ailleurs, des modèles de co-cultures *in vitro* ont démontré que des lymphocytes T Vγ9Vδ2 inhibaient la réplication virale du SARS-CoV après activation par des phosphoantigènes [232]. Cette inhibition de la réplication virale du SARS-CoV était partiellement induite par la sécrétion d'IFN-γ.
- VIH : une inversion du rapport $V\delta1^+/V\delta2^+$ a été observée dans le sang circulant des patients atteints du VIH. Plus précisément, une expansion de lymphocytes T $V\delta1^+$ s'associait à une diminution du nombre de lymphocytes T $V\delta2^+$ [233,234]. Une étude sur un modèle de macaque permit d'établir un lien entre cette expansion de lymphocytes T $V\delta1^+$ et la translocation de

produits bactériens dans l'épithélium intestinal ; suggérant un lien indirect avec l'infection par le VIH [235]. Les lymphocytes T Vδ1$^+$ induisent une lyse des cellules infectées via les récepteurs NKp30 et CD94/NKG2C [236,237] ; mais peuvent également lyser des cellules non infectées par le VIH [238]. En parallèle de cette expansion T Vδ1$^+$, le nombre de T Vδ2$^+$ diminue significativement chez les patients atteints du VIH, présentant un stade avancé, un pool T CD4$^+$ diminué, une virémie élevée et/ou l'apparition d'infections opportunistes [239].

- VHC : le VHC appartient à la famille des *flaviviridae* et engendre des hépatites chez l'Homme. Une diminution du nombre de lymphocytes T Vδ2$^+$ circulants a été observé chez les patients atteints d'infections chroniques par le VHC [240]. Cette population cellulaire, stimulée par des P-Ags (IPP, BrHPP) ou des aminobisphosphonates (acide zoledronique), inhibe la réplication virale du VHC *in vitro* [241]. Cette activité antivirale serait médiée par la production d'IFN-γ et non par une activité cytotoxique directe.
- Influenza : il a récemment été décrit un rôle antiviral des T Vγ9Vδ2, pré-activés *in vitro* par des aminobisphosphonates (acide pamidronique), sous la forme d'une activité cytotoxique en présence de macrophages (dérivés de monocytes) ou de cellules épithéliales alvéolaires infectées par différentes souches d'Influenza (H1N1, H9N2) [242,243]. Dans ce contexte, les lymphocytes T Vγ9Vδ2 pré-activés induisent la mort des cellules infectées par contact direct, et plus précisément via l'activation du récepteur NKG2D. Cette activité cytotoxique implique une dégranulation de type perforine/granzyme, le système Fas/Fas-ligand, mais également l'inhibition de la réplication virale via la sécrétion d'IFN-γ [243]. Sur un modèle de souris humanisées (Rag-/- γc-/- reconstituées avec des PBMC humains), la sévérité des atteintes organiques associées à l'infection par l'Influenza virus était significativement inférieur après traitement *in vivo* par aminobisphosphonates (acide pamidronique) [244], soulignant la probable activité antivirale des lymphocytes T Vγ9Vδ2 contre l'Influenza après stimulation par P-Ags ou aminobisphosphonates.
- EBV : les lymphocytes T Vγ9Vδ2, activés par des aminobisphosphonates (acide pamidronique), sont capables d'exercer une activité cytotoxique sur les cellules d'une lignée lymphoblastoïde infectée par l'EBV, par la stimulation du récepteur NKG2D et par

activation des voies Fas et TRAIL [16]. *In vivo,* au sein de souris immunodéficientes humanisées (Rag-/-γc-/-) et inoculées par des cellules lymphoblastoïdes EBV-induites, l'administration de lymphocytes T Vγ9Vδ2 (après culture *in vitro* sous acide pamidronique) induisait une régression tumorale significative [16].

LE VIRUS EPSTEIN-BARR

1. Généralités

a. Histoire

En 1958, Denis Burkitt, chirurgien britannique, observait une importante prévalence de tumeurs du maxillaire supérieur chez les enfants de certaines régions d'Afrique de l'Est [245]. Il mettait en évidence une prolifération de lymphocytes B et décrivait alors, pour la première fois, le lymphome qui portera son nom : le lymphome de Burkitt.

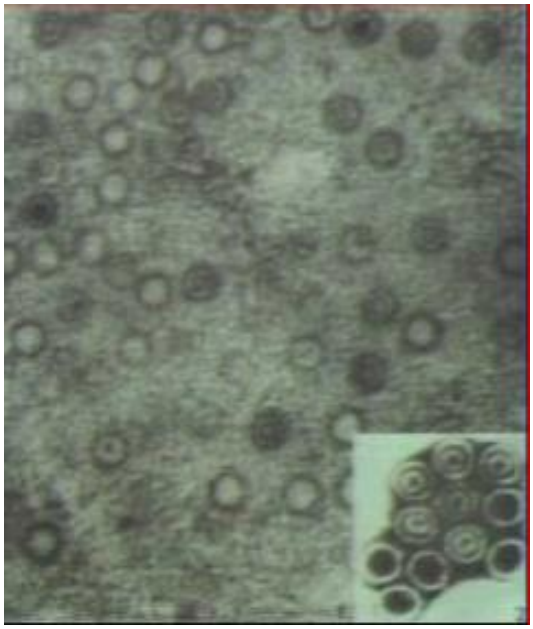

Figure 19. Particules virales découvertes dans le lymphome de Burkitt.

Dès 1961, lors d'une conférence sur ce lymphome dont la répartition répondait à des facteurs géographiques et climatiques particuliers, Denis Burkitt et Anthony Epstein suspectaient une influence virale et décidaient d'en isoler la souche. En 1964, le développement de lignées cellulaires de lymphome de Burkitt permettait à Epstein, Achong et Barr d'identifier par microscopie électronique des particules virales de type herpès-virus [246] (**Figure 19**).

Dès 1968, des études séro-épidémiologiques démontraient que ce virus, nommé virus d'Epstein-Barr (EBV), infectait plus de 95% de la population et qu'il était l'agent étiologique de la mononucléose infectieuse [247].

A partir des années 1970, le génome viral de l'EBV était mis en évidence dans les cellules de lymphome de Burkitt et dans les carcinomes indifférenciés du nasopharynx, confirmant l'association de ce virus avec des cancers humains [248,249]. La capacité de l'EBV à immortaliser les lymphocytes B *in vitro* au sein de lignées cellulaires lymphoblastoïdes et à induire des lymphomes chez les primates était alors démontrée et confortait son rôle oncogénique chez l'homme. Depuis lors, l'EBV était impliqué dans de nombreuses pathologies bénignes ou malignes d'origine épithéliale ou lymphoïde. En 1984, l'EBV était le premier virus humain au génome entièrement séquencé [250].

b. Taxonomie

EBV ou HHV-4 (pour « Human Herpe-Virus 4 ») appartient à la famille des Herpes-viridae humains qui comprend à l'heure actuelle 8 membres. Il fait partie de la sous-famille des Gamma Herpes-viridae et appartient au genre Lymphocryptovirus (**Figure 20**).

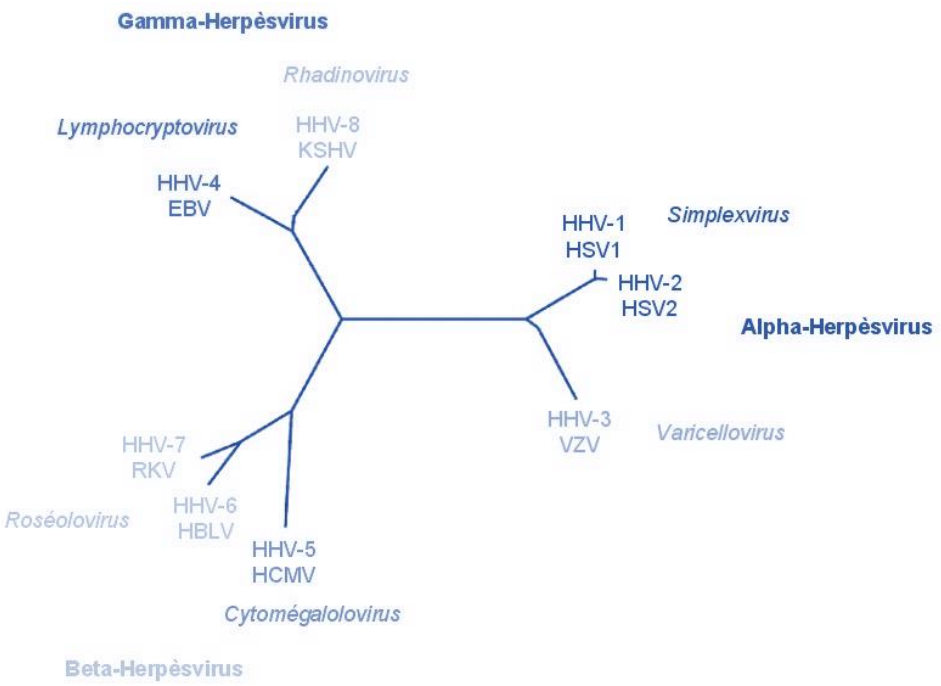

Figure 20. Organisation de la famille des Herpès-virus humains.
Selon Antman *et al.*

Chaque virus possède un nom standard (HHV-n) et un nom "usuel. HHV : Human Herpes Virus ; HSV : Herpes Simplex Virus ; VZV : Varicella-Zoster Virus ; EBV : Epstein-Barr Virus ; HCMV : Human Cyto Megalo Virus ; HBLV : Human B-Lymphotropic Virus ; RKV : RK patient Virus ; KSHV : Kaposi's Sarcoma associated Herpes Virus.

Les souches d'EBV peuvent être classées en 2 types (EBV-1 et EBV-2) sur la base du polymorphisme de leurs gènes EBNA2 (EBV Nuclear Antigen 2), 3A, 3B et 3C.
Des études de séroprévalence démontrent que la souche EBV-1 est majoritaire dans les pays occidentaux, alors que la souche EBV-2 ne prévaut que dans certaines zones d'Afrique Équatoriale et de Nouvelle-Guinée [251].

c. *Épidémiologie*

EBV est détectable dans plus de 95 % de la population adulte. Le virus est véhiculé tout au long de la vie par production salivaire et par l'intermédiaire de l'infection latente des lymphocytes B. La majorité des primo-infections touchent les enfants et sont asymptomatiques. Les primo-infections plus tardives, chez l'adolescent ou l'adulte jeune comme c'est le cas dans les pays développés, induisent une infection bénigne nommée mononucléose infectieuse. Il s'agit d'une maladie lymphoproliférative B, généralisée et transitoire, qui se traduit sur le plan hématologique par une prolifération de lymphocytes B infectés par EBV au sein du sang périphérique et par une expansion oligoclonale massive de lymphocytes T CD8+ anti-EBV.
La transmission virale se fait généralement via les sécrétions oropharyngées qui sont riches en particules virales infectieuses. Le virus peut également être transmis après transplantation d'organe ou Allo-CSH, par transfert de lymphocytes B infectés via le greffon. Cette infection constitue alors un facteur de risque important de syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (PTLD). Toutefois, si les cellules tumorales des PTLD dérivent généralement des lymphocytes B du receveur post-transplantation d'organes solides, l'origine des cellules tumorales des PTLD reste méconnue après Allo-CSH [252,253].

2. Cibles cellulaires et pathologies

Le lymphocyte B est la cellule cible classique de l'EBV où se situe le réservoir viral pour la majorité des personnes infectées (1 à 10 lymphocytes B mémoire infectées/100 000) [254]. Ces cellules sont aisément infectables *in vitro* car elles expriment fortement le récepteur principal de l'EBV (CD21, récepteur de la gp350) et son corécepteur (CMH de classe II, récepteur de la gp42). L'infection de cultures primaires de lymphocytes B humains par l'EBV se traduit par une transformation cellulaire aboutissant à des lignées cellulaires lymphoblastoïdes B (LCL). Dans les cellules infectées, le virus établit un programme de latence modifiant profondément le phénotype et les fonctions des lymphocytes B : hyperexpression de molécules d'adhérence (CD54/ICAM1, LFA1 et LFA3) et de marqueurs d'activation (CD23, CD39 et CD40).

Historiquement, les cellules épithéliales furent la seconde cible cellulaire à être associée à l'EBV suite à de nombreux cas de carcinomes du nasopharynx. *In vivo*, la pénétration de l'EBV dans les cellules épithéliales de l'oropharynx et/ou des amygdales est une étape précoce de l'infection par EBV. La séquence d'infection entre les cellules épithéliales et les lymphocytes B est largement débattue dans la littérature [255-258]. L'infection des cellules épithéliales est moins bien comprise car ces cellules n'expriment pas la molécule CD2. Cependant, les cocultures de cellules épithéliales et de lymphocytes B infectés par l'EBV ont révélé une infection des cellules épithéliales par les virions produits [256,259,260].

Il s'agit du premier virus tumoral humain décrit et impliqué dans de nombreuses pathologies hématologiques malignes d'origine B, NK, T mais également épithéliales chez l'hôte immunodéprimé et immunocompétent. Le très large spectre de pathologies bénignes et malignes de l'EBV est représenté dans le **Tableau 7**.

Tableau 7. Pathologies associées à l'EBV.

- **Pathologies bénignes :** Mononucléose infectieuse | Infection chronique active | Leucoplasie orale chevelue
- **Pathologies malignes :**

<table>
<tr><th></th><th>Hôte Immunocompétent</th><th colspan="2">Hôte Immunodéprimé</th></tr>
<tr><td rowspan="2">Lymphoïdes B</td><td rowspan="2">Lymphome de Burkitt

Lymphome de Hodgkin classique</td><td>Immunodéficience acquise</td><td>▪ Lymphome B associé au VIH
▪ Lymphoprolifératif post-transplantation (PTLD)
▪ Granulomatose lymphomatoïde
▪ Lymphome B associé au méthotrexate</td></tr>
<tr><td>Immunodéficience congénitale</td><td>▪ Lymphome B associé à l’immunodéficience sévère combinée
▪ Lymphome B associé au syndrome de Wiskott-Aldrich
▪ Lymphome B associé aux lymphoproliférations liées à l’X</td></tr>
<tr><td>Mésenchymateuses</td><td>Sarcome associé aux cellules dendritiques folliculaires</td><td colspan="2">Leïomyosarcome</td></tr>
<tr><td>Lymphoïdes T</td><td>Lymphome NK/T extranodal de type nasal
Lymphome T des Syndromes Hémophagocytiques</td><td colspan="2" rowspan="2"></td></tr>
<tr><td>Épithéliales</td><td>Carcinome nasopharyngé non-glandulaire
Carcinome de type lympho-épithélial
Carcinome mammaire
Carcinome hépatocellulaire</td></tr>
</table>

3. Infection EBV et PTLD associé à l'EBV

La primo-infection à virus EBV est définie par la détection de l'ADN viral ou d'anticorps spécifiques du virus chez un individu souvent asymptomatique, ou présentant plus rarement une mononucléose infectieuse. La détection d'anticorps IgG anti-EBV dans le sang d'un individu préalablement infecté définit la récurrence du virus de l'EBV.

Les pathologies associées au virus EBV au décours d'une Allo-CSH se manifestent sous forme d'atteintes sévères d'organes ou de lymphoproliférations (PTLD). Les incidences des virémies et des PTLD associés à l'EBV (EBV-PTLD) se situent entre 0,1-63% et diffèrent selon les tests de détection utilisés, les types d'allogreffes et les centres de greffe [261-270].

L'EBV-PTLD est une prolifération néoplasique de cellules lymphoïdes ou plasmacytiques, et représente une complication sévère associée aux transplantations. Si la fièvre et les adénopathies sont les symptômes les plus fréquents, une défaillance multi-organe et le décès sont rapidement observés en l'absence de traitement [13]. Avant 2000, la mortalité attribuable à l'EBV-PTLD était ainsi de 84,6% après Allo-CSH [271].

Le diagnostic d'EBV-PTLD nécessite un examen physique (amygdales, adénopathies, hépatomégalie, splénomégalie, fièvre), une imagerie (scanner/tep-scanner), une endoscopie digestive en cas de symptômes digestifs, et une biopsie pour apporter la preuve histologique du diagnostic. Lorsque l'état clinique du patient rend impossible la réalisation d'une biopsie, une approche non-invasive associant une PCR quantitative de la virémie EBV et une imagerie (scanner/TEP-scanner) est privilégiée.

Le diagnostic histologique repose sur les critères suivants ($n \geq 2$) :

- Une rupture de l'architecture cellulaire par un processus lymphoprolifératif.
- La présence de populations cellulaires monoclonales ou oligoclonales révélant une atteinte virale.
- L'existence d'une infection EBV dans de nombreuses cellules sous forme d'ADN, d'ARN ou de protéines virales.

La méthode de référence pour la détection du virus EBV dans les biopsies est la détection de l'ARN de l'EBV par hybridation *in situ* (EBER-ISH). L'immunohistochimie et la détection de l'ADN viral par PCR sont des méthodes inappropriées étant donné leurs faibles spécificité et valeur prédictive positive [272-277].

La première classification des PTLD fut établie par Swerdlow et Greig [278]. Cependant, la classification la plus utilisée est celle de l'OMS qui classe les PTLD en 4 types distincts [279] :

- Les lésions précoces polyclonales
- Les lésions polymorphes
- Les lésions monomorphes (B, T ou NK)
- Les lésions de type Lymphome de Hodgkin classique

Le risque de développer un EBV-PTLD est influencé par une interaction complexe entre le type d'hémopathie maligne, le type d'allogreffe, le type de donneur et de greffon. Ce risque est étroitement lié au degré d'immunosuppression ou de déplétion des lymphocytes T [280]. Ainsi, une incidence importante d'EBV-PTLD a été démontré après allogreffe de sang placentaire, après conditionnement d'intensité réduite et utilisation d'ATG ou de l'alemtuzumab (anticorps monoclonal anti-CD52) [281,282].

Les approches préemptives et curatives vis à vis de la virémie EBV et de l'EBV-PTLD incluent l'administration de rituximab, la réduction du traitement immunosuppresseur, la chimiothérapie, l'administration de lymphocytes T cytotoxiques anti-EBV ou encore l'administration de DLI. Les données des études démontrent que l'administration préemptive de rituximab permet un taux de réponse globale approximativement de 90% chez les patients présentant une virémie EBV, et de 65% chez les patients atteints d'EBV-PTLD [262,263,267,270,273,274,283-295].

Récemment, il a été démontré que la réduction du traitement immunosuppresseur en combinaison au rituximab permettait une survie de plus de 80% des patients présentant une réactivation EBV tandis que son utilisation préemptive seule donnait un taux de réponse globale de 68% [264,285]. L'administration préemptive de lymphocytes T cytotoxiques anti-EBV permet la survie de plus de 90% des patients présentant une réactivation EBV, et 75% des patients en traitement curatif de l'EBV-PTLD [285,296-301]. L'accès aux lymphocytes T cytotoxiques anti-EBV reste complexe, essentiellement dans le cadre de protocoles qui ne sont pas disponibles dans la majorité des centres.

Sur un plan immunologique, il a été démontré que l'immunité innée et plus particulièrement les lymphocytes T γδ, tenaient un rôle majeur dans le contrôle de nombreuses familles virales (notamment la famille des herpès-virus) [22,230,231,302]. Plus en détail, le rôle des lymphocytes T Vγ9Vδ2 dans l'immunité cellulaire anti-EBV a été récemment décrit [16,24].

RESULTATS

Grâce aux progrès réalisés lors des dernières décennies, avec l'utilisation croissante de conditionnements d'intensité atténuée et de CSH haploidentiques avec prophylaxie de la GvHD par administration de PTCy [47,303-305], de nombreux patients ne disposant pas de donneur-HLA-identiques ont pu être allogreffés. Cependant, cette procédure thérapeutique reste complexe, en raison de l'immunosuppression et des toxicités induites, du risque de GvHD et des nombreuses complications infectieuses, causes majeures de NRM.

En accord avec les données de la littérature [306], nous observons une augmentation de l'incidence des infections virales à EBV chez les patients traités par Haplo-CSH à l'hôpital Saint-Antoine, AP-HP [9]. Alors que la reconstitution immunitaire des patients Haplo-CSH est insuffisamment documentée, notre constat soulève la question de l'impact du PTCy sur la reconstitution immunitaire des effecteurs jouant un rôle dans l'immunité cellulaire anti-EBV (notamment les lymphocytes T γδ et T Vγ9Vδ2).

D'autre part, si l'administration préemptive de rituximab dès l'augmentation de deux charges virales EBV consécutives dans le sang (selon les recommandations de l'European Conference on Infections in Leukemia [14]) permet d'obtenir un taux de négativation des charges virales proche de 90%, l'impact du traitement pré-emptif par rituximab sur la reconstitution immunitaire des cellules immunitaires $CD20^+$ et sur le risque infectieux reste tout autant méconnu à ce jour.

Les objectifs de ce travail de thèse étaient donc les suivants :

Étude 1. Impact du cyclophosphamide sur la reconstitution lymphocytaire T gamma-delta après greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques

- Évaluer l'impact de l'utilisation de cyclophosphamide post greffe en prophylaxie de la maladie du greffon contre l'hôte sur la reconstitution immunitaire des effecteurs immunitaires T conventionnels et T non conventionnels de patients, en comparaison avec des patients ne recevant pas de cyclophosphamide post greffe.
- Établir des corrélations clinicobiologiques entre les données de reconstitution immunitaire, notamment précoces, et les évènements cliniques apparaissant à distance de la greffe.

Étude 2. Impact du traitement préemptif par rituximab sur la reconstitution immunitaire dans le contexte de réactivation EBV après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

- Étudier l'impact des traitements préemptifs des réactivations virales (notamment EBV) sur la reconstitution immunitaire des patients allogreffés de CSH.
- Établir des corrélations clinicobiologiques entre les données de reconstitution immunitaire et les évènements cliniques apparaissant à distance du traitement préemptif suite à la réactivation EBV.

ARTICLE 1 : IMPACT DU CYCLOPHOSPHAMIDE SUR LA RECONSTITUTION LYMPHOCYTAIRE T GAMMA-DELTA APRES GREFFE ALLOGENIQUE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES

1. Résultats principaux

Notre étude rétrospective, conduite sur une première cohorte de 106 patients allogreffés de CSH périphériques mobilisées par G-CSF à l'hôpital Saint-Antoine, AP-HP entre avril 2013 et décembre 2016, a permis une étude quantitative et phénotypique de la reconstitution immunitaire des patients recevant une Haplo-CSH avec PTCy, comparée à celle des patients recevant une Allo-CSH sans PTCy. A J20 après Allo-CSH, les médianes de valeurs absolues de toutes les populations cellulaires étaient significativement inférieures chez les patients Haplo-CSH, en comparaison aux autres patients. Dès J30 après Allo-CSH, tous les patients présentaient des valeurs absolues de lymphocytes T conventionnels ($CD3^+$ totaux, $CD4^+$ et $CD8^+$) comparables. En revanche, les populations de lymphocytes T non-conventionnels γ/δ, et T $V\delta2^+$, restaient significativement diminuées chez les patients Haplo-CSH. La diminution des lymphocytes T $V\delta2^+$ persistait au moins jusqu'à J360 après la greffe.

Afin d'élucider le mécanisme responsable de ce déficit de reconstitution des lymphocytes T γ/δ après Haplo-CSH, nous avons constitué une seconde cohorte prospective de 25 patients pour étudier la prolifération précoce des populations lymphocytaires T par marquage de l'index de prolifération Ki67 à J3, J7 et J10 après la greffe. Nous avons observé une importante prolifération des différentes populations de lymphocytes T dès J3 après la greffe. A J7 et J10, au décours de l'administration du PTCy (J+3/+5) chez les patients recevant un greffon Haplo-CSH, nous avons observé une réduction significative des populations de lymphocytes T $CD8^+$, T γ/δ et T $V\delta2^+$ exprimant le Ki67, en comparaison aux patients ne recevant pas cette prophylaxie. Ainsi le PTCy semble directement impacter la prolifération des lymphocytes T γ/δ après Haplo-CSH, conduisant à un défaut de reconstitution chez ces patients.

Sur le plan du devenir clinique, les groupes de patients étaient comparables en termes d'incidence de GvHD aigüe, de GvHD chronique, de rechute et ne différaient pas en termes de survie. Cependant, le taux de réactivation virale EBV était significativement augmenté chez les patients Haplo-CSH, en comparaison aux autres patients (61% contre 34%, $P = 0.02$). Après avoir établi des courbes ROC, nous avons observé que les valeurs absolues de lymphocytes T γ/δ et $V\delta2^+$ à J30 de la greffe étaient des variables discriminantes du risque de réactiver le virus EBV. Ainsi, les patients présentant un compte de γ/δ ≤4.63/µl (la valeur seuil pour discriminer les patients suite à l'analyse des courbes ROC) à J30 avaient un risque supérieur de réactiver le virus EBV ($P = 0.006$). Les patients présentant un compte de $V\delta2^+$ ≤0.49/µl (la valeur seuil pour discriminer les patients suite à l'analyse des courbes ROC) à J30 avaient un risque supérieur de réactiver le virus EBV ($P = 0.003$). Finalement, une analyse de régression logistique multivariée confirmait qu'un compte de lymphocytes T γ/δ >4.63/µl à J30 après Allo-CSH était l'unique paramètre indépendant significativement associé à une réduction du risque de présenter une infection EBV au décours de l'Allo-CSH (RR 0.34; 95% CI, 0.15-0.76, $P = 0.009$).

En dépit de l'efficacité indiscutable du PTCy dans la prophylaxie de la GvHD après Haplo-CSH, nos résultats suggèrent un effet délétère et durable de ce traitement sur la reconstitution lymphocytaire T γ/δ. En effet, la prolifération précoce de ces populations cellulaires est rapidement impactée par ce traitement qui induit un délai à leur reconstitution ; qui corrèle directement avec un risque accru de présenter une infection virale EBV au décours de l'Allo-CSH.

2. Article

High-Dose Post-Transplant Cyclophosphamide impairs gamma delta T Cell Reconstitution after Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation using Low Dose Anti-Thymocyte globulin and Peripheral Blood Stem Cell Graft.

Nicolas Stocker [1,2], Béatrice Gaugler [1], Myriam Labopin [1,2,3], Agathe Farge [1], Yishan Ye [1,4], Laure Ricard [1], Eolia Brissot [1,2], Remy Duléry [1,2], Simona Sestili [2], Giorgia Battipaglia [1,2], Clémence Médiavilla [1,2], Annalisa Paviglianiti [1,2], Anne Banet [2], Zoe Van De Wyngaert [2], Tounes Ledraa [1,2], Mohamad Mohty [1,2,3], and Florent Malard [1,2].

[1] Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), F-75012 Paris, France

[2] AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Hématologie Clinique, F-75012, Paris, France

[3] Acute Leukemia Working Party, Paris Study office, European Society for Blood and Marrow Transplantation, Paris, France

[4] Bone Marrow Transplantation Center, The First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, 310003, China.

Published in Clinical & Translational Immunology

2020;9(9):e1171. doi: 10.1002/cti2.1171

Clinical & Translational Immunology

Australian and New Zealand SOCIETY FOR IMMUNOLOGY INC.

Clinical & Translational Immunology 2020; e1171. doi: 10.1002/cti2.1171
www.wileyonlinelibrary.com/journal/cti

ORIGINAL ARTICLE

High-dose post-transplant cyclophosphamide impairs γδ T-cell reconstitution after haploidentical haematopoietic stem cell transplantation using low-dose antithymocyte globulin and peripheral blood stem cell graft

Nicolas Stocker[1,2], Béatrice Gaugler[1], Myriam Labopin[1,2,3], Agathe Farge[1], Yishan Ye[1,4], Laure Ricard[1], Eolia Brissot[1,2], Remy Duléry[1,2], Simona Sestili[2], Giorgia Battipaglia[1,2], Clémence Médiavilla[1,2], Annalisa Paviglianiti[2], Anne Banet[2], Zoe Van De Wyngaert[2], Tounes Ledraa[1,2], Mohamad Mohty[1,2,3] & Florent Malard[1,2]

[1]INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Sorbonne Université, Paris, France
[2]Service d'Hématologie Clinique et Thérapie Cellulaire, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France
[3]Acute Leukemia Working Party, Paris Study Office, European Society for Blood and Marrow Transplantation, Paris, France
[4]Bone Marrow Transplantation Center, The First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, China

Correspondence
F Malard, Service d'Hématologie Clinique, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, F-75012, Paris, France.
E-mail: florent.malard@inserm.fr

Received 29 April 2020;
Revised 16 July 2020;
Accepted 4 August 2020

doi: 10.1002/cti2.1171

Clinical & Translational Immunology
2020; **9**: e1171

Abstract

Objectives. Haploidentical haematopoietic cell transplantation (Haplo-HCT) using peripheral blood stem cell (PBSC) grafts and post-transplant cyclophosphamide (PTCy) is being increasingly used; however, data on immunological reconstitution (IR) are still scarce. **Methods.** This retrospective study evaluated T-cell immunological reconstitution in 106 adult patients who underwent allogeneic haematopoietic cell transplantation for haematologic malignancies between 2013 and 2016. **Results.** At D30, while conventional T cells reached similar median counts in Haplo-HCT recipients ($n = 19$) and controls ($n = 87$), γδ and $V\delta2^+$ T-cell median counts were significantly lower in Haplo-HCT recipients and it persists at least until D360 for $V\delta2^+$ T cells. PTCy induces a significant reduction in early γδ and $V\delta2^+$ T-cell proliferation at D 7. At one year, the rate of increase in Epstein–Barr virus (EBV) viral load was significantly higher in Haplo-HCT recipients as compared to controls (61% versus 34%, $P = 0.02$). In multivariate analysis, a higher γδ T-cell count (> 4.63 μL^{-1}) at D30 was the only independent parameter significantly associated with a reduced risk of increase in EBV viral load (RR 0.34; 95% CI, 0.15–0.76, $P = 0.009$). **Conclusion.** Immunological reconstitution of γδ T cells is significantly delayed after Haplo-HCT using PTCy and low-dose ATG and is associated with an increased risk of increase in EBV viral load.

Keywords: allogeneic haematopoietic cell transplantation, Epstein–Barr virus, haploidentical haematopoietic cell transplantation, immune reconstitution, post-transplantation cyclophosphamide, γδ T cell

© 2020 The Authors. *Clinical & Translational Immunology* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Australian and New Zealand Society for Immunology, Inc.

INTRODUCTION

Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (Allo-HCT) is the only curative treatment for many patients with malignant and non-malignant diseases. Nevertheless, a fully matched related donor is available for only 30% of patients. Therefore, the use of alternative donors, matched or mismatched unrelated donors, umbilical cord blood or haploidentical donors, was developed. Haploidentical haematopoietic cell transplantation (Haplo-HCT) is associated with an important bidirectional alloreactivity, and first results were disappointing with a very high toxicity and mortality of the procedure.[1] Fortunately, development of Haplo-HCT using post-transplant cyclophosphamide (PTCy) significantly improved the rates of graft-versus-host disease (GvHD), non-relapse mortality and engraftment.[2–7] Compared with Allo-HCT with matched related or unrelated donor, retrospectives studies reported similar overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) with Haplo-HCT and even sometimes a decreased incidence of acute and/or chronic GvHD.[2–7] PTCy acts through induction of functional impairment of alloreactive T cells without toxic effects on haematopoietic stem cells.[8] Furthermore, after allogeneic stimulation, donor regulatory T cells express a higher level of aldehyde dehydrogenase, the enzyme responsible for *in vivo* detoxification of cyclophosphamide. Therefore, donor regulatory T cells are resistant to PTCy-induced cytotoxicity and contribute to the prevention of GvHD after PTCy.[1]

Nevertheless, we and others recently reported high incidences of viral reactivation following Haplo-HCT with PTCy.[9–11] In particular, an increased EBV viral load was reported in 19–53% of patients[9,10,12] and up to 72% when a longer follow-up of 2 years was considered.[9]

Several studies have shown the role of gamma delta (γδ) T cells in EBV surveillance. De Paoli *et al.*[13] have described an expansion of γδ T cells during the acute phase of EBV-induced infectious mononucleosis, suggesting their possible role in controlling EBV infection. Furthermore, pamidronate-expanded $V\gamma9^{+}V\delta2^{+}$ T cells can directly kill EBV-lymphoblastoid cell lines *in vitro* and *in vivo*.[14] γδ T cells exhibit both innate and adaptive features[15] and differ from conventional α/β T cells not only in TCR composition, but also in their development, tissue distribution and physiological functions.[16–18] The $V\delta2^{+}$ T-cell subset is the predominant peripheral blood γδ T-cell population in most adults.[19]

In the setting of Allo-HCT, expansion of γδ $V\delta1^{+}$ T cells has been reported in one patient with an increase in EBV viral load after an umbilical cord blood transplantation.[20] Furthermore, inverse correlations between CD4/CD8 double negative or γδ $V\delta2^{+}$ T-cell recovery and increase in EBV viral load were reported after Haplo-HCT with high-dose antithymocyte globulin (ATG).[21,22]

With this background, we evaluated the impact of PTCy administration on γδ T-cell immune reconstitution after Allo-HCT with peripheral blood stem cell (PBSC) grafts, and the correlations with the increase in EBV viral load.

RESULTS

Characteristics of patients, donors and transplantations

For cohort 1, patients, donors and transplant characteristics are summarised in Table 1. Twenty-nine patients had a matched related and 58 a matched unrelated donor (control group, $n = 87$), while 19 patients received Haplo-HCT with PTCy (PTCy group). The median age was 56 years (range, 18–70) in the control and 57 (range, 27–71) in the PTCy group ($P = 0.83$). All donor/recipient pairs were EBV positive (respectively, positive/negative 2%, negative/positive 10% and positive/positive 87% in the control group versus 16%, 0% and 84% in the PTCy group).

According to the Disease Risk Index,[23] patients were considered to be low, intermediate, high or very high risk (respectively, 2%, 51%, 39% and 8% in the control group and 0%, 42%, 53% and 5% in the PTCy group, $P = 0.78$). Twenty-two patients who were not in complete remission at the time of Allo-HCT, 16 being in the control (18%) and 6 being in the PTCy group (32%), received a sequential conditioning regimen, while the remaining patients received a RIC (respectively, 14 and 0) or a RTC regimen (respectively, 57 and 13; $P = 0.08$).

Immune reconstitution

The IR of T-cell and γδ T-cell subsets is illustrated in Figure 1 and summarised in Supplementary table 1. At D20 after Allo-HCT, the median counts of all immune cell subsets were significantly lower

© 2020 The Authors. *Clinical & Translational Immunology* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Australian and New Zealand Society for Immunology, Inc.

Table 1. Cohort 1 population and transplant characteristics

Characteristics	Control group (n = 87)	PTCy group (n = 19)	P-value
Patient age in years, median (range)	56 (18–70)	57 (27–71)	0.83
Patient gender			
Male	53 (61)	15 (79)	0.14
Female	34 (39)	4 (21)	
Donor gender			
Female to male	22 (25)	8 (42)	0.14
CMV-seronegative donor–recipient pair	25 (29)	4 (21)	0.50
EBV serostatus donor–recipient pair			
Positive/Negative	2 (2)	3 (16)	**0.03**
Negative/Positive	9 (10)	0	
Positive/Positive	76 (87)	16 (84)	
Negative/Negative	0	0	
Diagnosis			
Myeloid malignancies	58 (67)	12 (63)	0.77
Acute myeloid leukaemia	28 (33)	10 (53)	
Myeloproliferative neoplasms	22 (25)	1 (5)	
Myelodysplastic syndrome	8 (9)	1 (5)	
Lymphoid malignancies	29 (33)	7 (37)	
Acute lymphoblastic leukaemia	17 (19)	4 (21)	
Non-Hodgkin lymphoma	10 (12)	3 (16)	
Hodgkin lymphoma	2 (2)	0	
Disease Risk Index			
Low	2 (2)	0	0.78
Intermediate	44 (51)	8 (42)	
High	34 (39)	10 (53)	
Very High	7 (8)	1 (5)	
Conditioning regimen			
RIC	14 (16)	0	0.08
RTC	57 (66)	13 (68)	
Sequential	16 (18)	6 (32)	
Antithymocyte globulin			
Median (range)	5 (5–6)	5 (2.5–5)	0.07
2.5 mg kg^{-1}	0	3	
5 mg kg^{-1}	86	16	
6 mg kg^{-1}	1	0	
Post-transplant immunosuppression			
CsA alone	15 (17)	0	< **0.0001**
CsA and MMF	64 (74)	0	
CsA and MTX	8 (9)	0	
CsA and MMF and PTCy	0	19[a] (100)	
Median follow-up, months (range)	35 (22–42)	30 (19–41)	0.62

CMV, cytomegalovirus; CsA, cyclosporine A; EBV, Epstein–Barr virus; MMF, mycophenolate mofetil; MTX, methotrexate; PTCy, post-transplant cyclophosphamide; RIC, reduced intensity conditioning; RTC, reduced toxicity conditioning; yrs, years.
Bold denotes statistically significant.
[a]PTCy 50 mg kg^{-1} day^{-1} at D3 and D5 (2 patients received PTCy at D3 only).

in PTCy groups as compared to the control group (Figure 1). At D30, total lymphocytes, $CD3^+$ T cells, $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells reached similar median counts in the two groups (Figure 1a–d). In contrast, γδ T-cell and $V\delta2^+$ T-cell median counts remained significantly low at D30 (Figure 1e, f). Furthermore, while γδ T-cell median count in the PTCy group reached values similar to those in the control at D90 (Figure 1e), $V\delta2^+$ T-cell median counts remained significantly lower in the PTCy than the control group up to D360 after transplantation (Figure 1f). Finally, compared to healthy donors, $V\delta2^+$ T-cell counts remained significantly lower in both PTCy and control groups at least until D360 (Figure 1f). Of note, IR of T-cell and γδ T-cell subsets was similar in a subgroup analysis including

© 2020 The Authors. *Clinical & Translational Immunology* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Australian and New Zealand Society for Immunology, Inc.

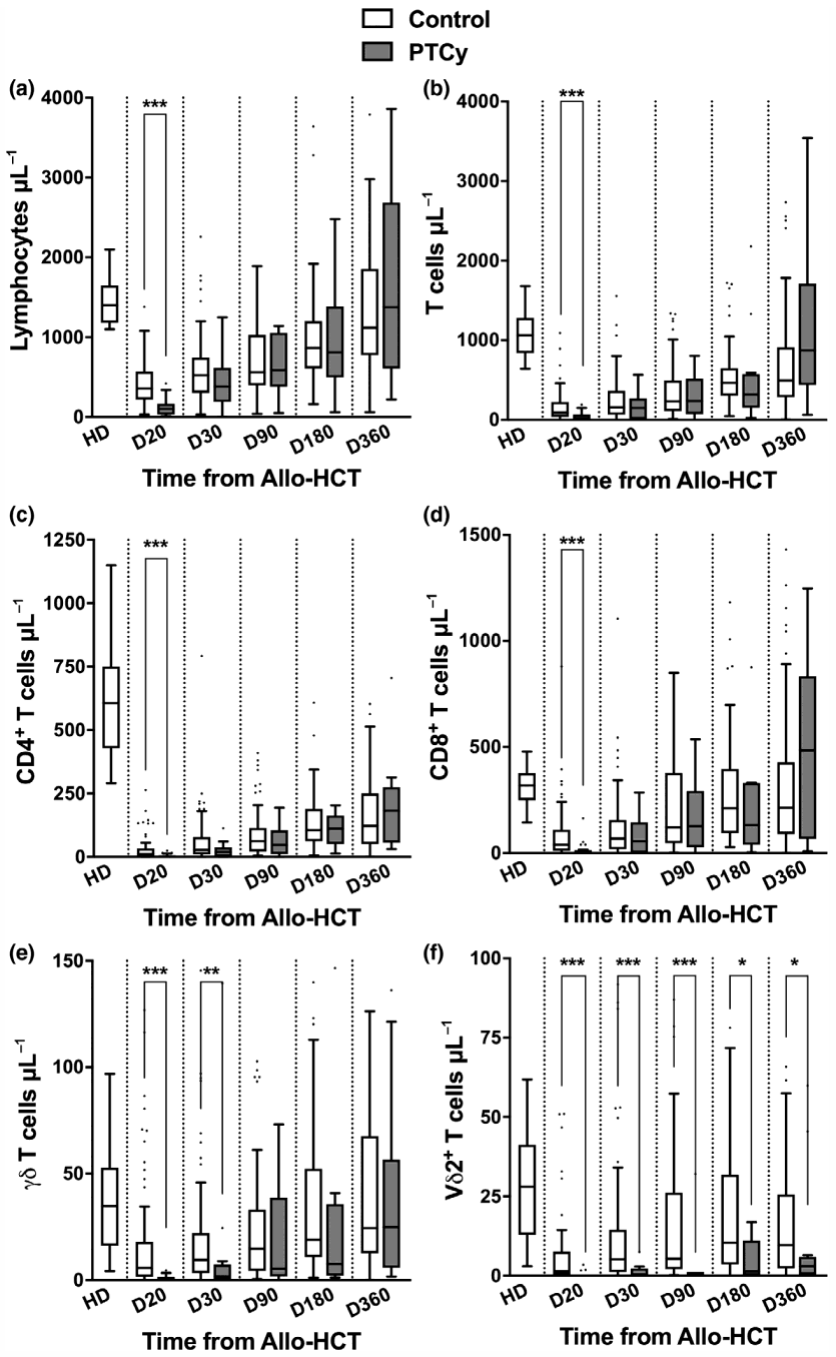

Figure 1. Immune recovery of T cells after Allo-HCT. Kinetics of absolute lymphocyte **(a)**, T-cell **(b)**, $CD4^+$ T-cell **(c)**, $CD8^+$ T-cell **(d)**, γδ T-cell **(e)** and $V\delta2^+$ T-cell **(f)** counts in blood from control (n = 87) and Haplo-HCT with PTCy (n = 19) recipients following Allo-HCT. Samples from healthy donors serve as baseline reference. Box and whisker plots displaying the median, the 25th percentile, the 75th percentile of the distribution (box), and the most extreme data point (whiskers), which is no more than 1.5 times the interquartile range from the box. Allo-HCT, allogeneic haematopoietic stem cell transplantation; HD, healthy donors; PTCy, post-transplant cyclophosphamide.

only patients receiving CsA and MMF (Supplementary figure 2). In contrast, acute GvHD and subsequent use of corticosteroids had no impact on γδ T-cell and $V\delta2^+$ T-cell immune recovery (Supplementary figure 3) but were associated with an impaired long-term immune reconstitution of lymphocytes, $CD3^+$ T cells, $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells (Supplementary figure 3).

© 2020 The Authors. *Clinical & Translational Immunology* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Australian and New Zealand Society for Immunology, Inc.

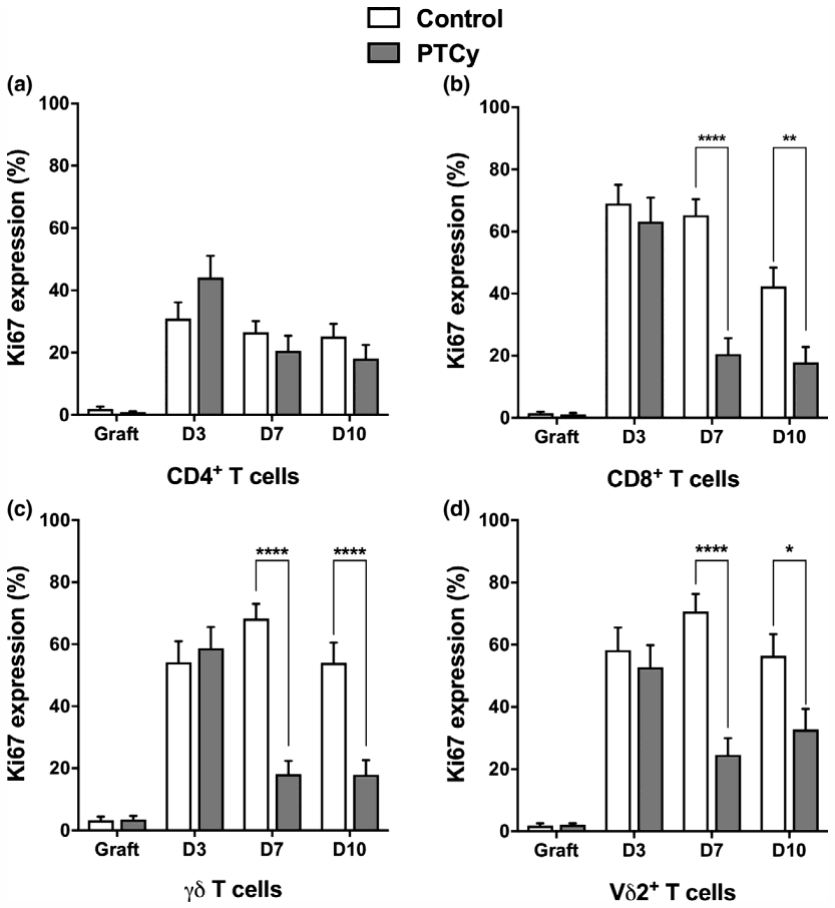

Figure 2. Kinetics of Ki67-expressing T cells after Allo-HCT. Kinetics of Ki67-expressing CD4$^+$ T-cell **(a)**, CD8$^+$ T-cell **(b)**, γδ T-cell **(c)** and Vδ2$^+$ T-cell **(d)** proportions in the graft and at D3, D7 and D10 in control (not receiving PTCy, n = 16) and Haplo-HCT with PTCy (n = 12) recipients after Allo-HCT. Bars displaying the mean of Ki67 MFI and 95% confidence intervals (error bars) are shown. Allo-HCT, allogeneic haematopoietic stem cell transplantation; PTCy, post-transplant cyclophosphamide.

Early proliferation of T cells

To decipher the mechanism of impaired γδ and Vδ2$^+$ T-cell recovery after Haplo-HCT with PTCy, we analysed T-cell proliferation (Ki67$^+$), on fresh samples of the PBMC graft, and at early time points after Allo-HCT (D3, D7 and D10) in a second cohort of 16 controls and 12 PTCy recipients. Patient, donor and transplant characteristics are summarised in Supplementary table 2 for cohort 2. In the graft, the proportions of Ki67-expressing cells were low for all T-cell subsets (Figure 2). Graft infusion was associated with proliferation of all T-cell subsets, as demonstrated by the high proportion of Ki67-expressing cells at D3 in CD8$^+$ T cells, γδ T cells, Vδ2$^+$ T cells and to a lesser extent CD4$^+$ T cells. Interestingly, there were no differences at D3 (before administration of PTCy) in the proportions of Ki67-expressing T cells between control and PTCy groups (Figure 2).

After PTCy treatment, at D7 and D10 after Allo-HCT, we observed a significant decrease in Ki67-expressing CD8$^+$, γδ and Vδ2$^+$ T cells (Figure 2b–d) in the PTCy group, as compared with the control group. In contrast, there were no differences in the proportions of Ki67-expressing CD4$^+$ T cells between Haplo-HCT and control recipients at D7 and at D10 (Figure 2a).

Clinical outcomes

Clinical outcomes were only evaluated in cohort 1. The median follow-up among surviving patients was 33 months (range, 22–42). At 2 years, the rates of NRM, PFS, GPFS and OS were 9%, 72%, 64% and 78%, respectively (Table 2). At D180, the cumulative incidences (CIs) of grade II-IV and

© 2020 The Authors. *Clinical & Translational Immunology* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Australian and New Zealand Society for Immunology, Inc.

Table 2. Clinical outcomes after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation

Outcomes	All patients (n = 106)	Control group (n = 87)	PTCy group (n = 19)	P-value
aGvHD incidence at D180, % (95% CI)				
Grade II–IV	20 (12–29)	19 (11–29)	24 (7–46)	0.59
Grade III–IV	2 (0–6)	2 (1–8)	0	0.52
cGvHD incidence at month 24, % (95% CI)	36 (26–45)	36 (26–46)	33 (13–55)	0.70
Extensive	14 (7–19)	12 (6–19)	17 (4–37)	0.67
Non-relapse mortality at month 24, % (95% CI)	9 (4–15)	8 (4–15)	11 (2–30)	0.70
CMV incidence at month 12, % (95% CI)	27 (18–37)	24 (14–35)	46 (15–72)	0.16
EBV incidence at month 12, % (95% CI)	39 (30–49)	34 (24–45)	61 (34–80)	**0.02**
Relapse incidence at month 24, % (95% CI)	19 (12–27)	19 (12–28)	19 (4–42)	0.61
Progression-free survival at month 24, % (95% CI)	72 (64–81)	73 (63–82)	70 (47–93)	0.83
GPFS at month 24, % (95% CI)	64 (54–74)	64 (53–75)	62 (37–87)	0.72
Overall survival at month 24, % (95% CI)	78 (70–86)	78 (69–87)	79 (61–97)	0.85
Median follow-up, months (range)	33 (22–42)	35 (22–42)	30 (19–41)	0.62

aGvHD, acute graft-versus-host disease; cGvHD, chronic graft-versus-host disease; CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; EBV, Epstein–Barr virus; GPFS, graft-versus-host disease and progression-free survival; PTCy indicate post-transplantation cyclophosphamide.
Bold denotes statistical significance.

grade III-IV aGvHD were 20% and 2%, respectively. The 2-year CIs of cGvHD, extensive cGvHD and relapse were 36%, 14% and 19%, respectively, while CIs of CMV reactivation and increase in EBV viral load at one year were 27% and 39%, respectively. There were no differences between the control group and the PTCy group with respect to all outcomes considered, except for increase in EBV viral loads at 12 months (Table 2): this was significantly higher in the PTCy group (respectively, 61% versus 34%, $P = 0.02$).

To further investigate a potential role of T cells in the increased risk of increase in EBV viral load after Haplo-HCT with PTCy, we then performed ROC curves analysis for each T-cell subset. It revealed that only γδ T-cell and Vδ2$^+$ T-cell counts at D30 following Allo-HCT were accurate discriminators of the risk of increase in EBV viral load. Patients having the lowest γδ and Vδ2$^+$ T-cell counts (respectively, ≤ 4.63 μL^{-1} and ≤ 0.49 μL^{-1}; the cut-off values used to segregate the patients between low and high γδ and Vδ2$^+$ T-cell counts) at D30 had a significantly higher risk of increase in EBV viral load (respectively, $P = 0.006$ and $P = 0.003$) (Supplementary table 3 and Figure 3a). In contrast, γδ and Vδ2$^+$ T-cell counts at D30 had no impact on the main outcomes after Allo-HCT, including relapse, NRM and OS (data not shown). In multivariate logistic regression analysis, a higher γδ T-cell count (> 4.63 μL^{-1}) at D30 following Allo-HCT was the only independent parameter significantly associated with a reduced risk of increase in EBV viral load (RR 0.34; 95% CI, 0.15–0.76, $P = 0.009$) (Table 3). Finally, in the subgroup of patients with an increase in EBV viral load ($n = 45$), median EBV viral copy number was 15748 (range, 5192–580 000) copies mL^{-1}. Interestingly, we find a correlation between EBV viral copy number and γδ T cell ($R = -0.67$, $P < 0.0001$; Figure 3b), median EBV viral copy number being significantly lower in patients with higher γδ T-cell count (> 4.63 μL^{-1}) at D30 (median 8116 copies mL^{-1} versus 38 502 copies mL^{-1}, $P = 0.0008$; Figure 3c).

DISCUSSION

A delayed IR after Allo-HCT has been associated with higher risk of relapse,[24] NRM,[24,25] GvHD[25] and bacterial, fungal and viral infections.[26] Therefore, IR is essential to control transplant complications and improve survival after Allo-HCT.[17]

In the setting of Allo-HCT with PTCy, previous analyses of IR focused on α/β T cells.[27–29] It was shown in animal models that T memory stem cells derive from naïve T cells after Allo-HCT.[28] In humans, Kanakry *et al.*[27] reported a favorable CD4$^+$, CD8$^+$ and CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$ T-cell reconstitution after Allo-HCT with bone marrow grafts and PTCy as a single agent for GvHD prophylaxis. Furthermore, it was shown that CMV seropositivity can drive T-cell reconstitution and α/β T-cell receptor diversity.[29] Data on γδ T cells are scarcer. Retiere *et al.*[30] recently reported that the use of PTCy was associated with fewer γδ T cells early after Allo-HCT compared to ATG, while it was the opposite for α/β T cells.

The current study shed a new light on γδ T-cell reconstitution and its impact on the increased EBV

© 2020 The Authors. *Clinical & Translational Immunology* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Australian and New Zealand Society for Immunology, Inc.

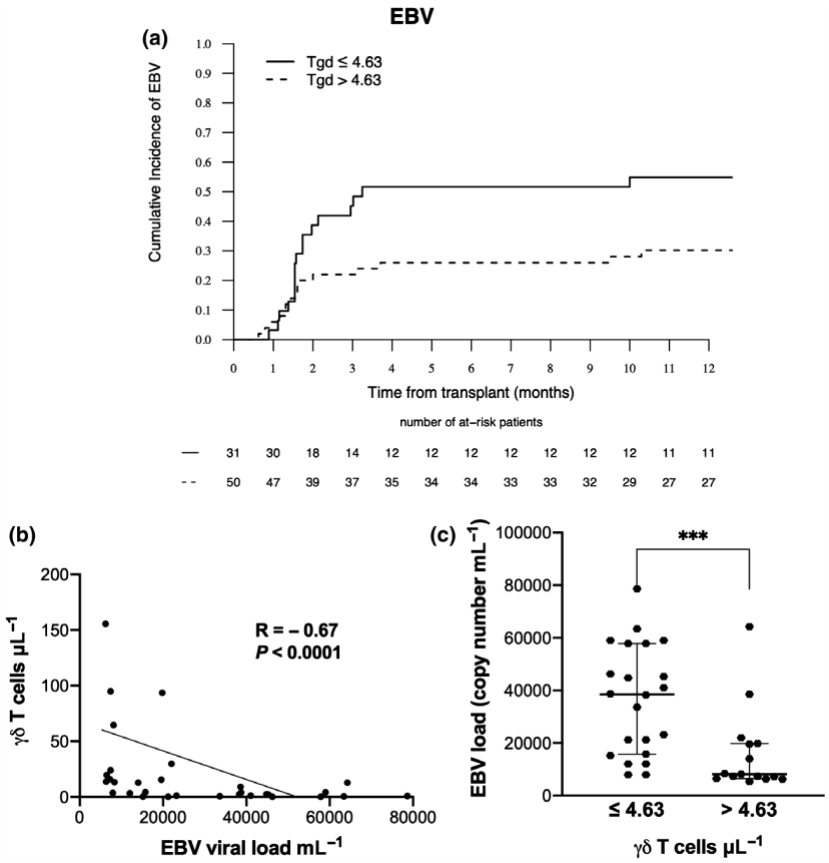

Figure 3. Increase in EBV viral load and γδ T-cell counts at D30 after Allo-HCT. Probability of increase in EBV viral load according to γδ T-cell count (below or over the best value of 4.63 μL^{-1}) at D30 after Allo-HCT **(a)**. Correlation between increase in EBV viral load and γδ T-cell count at D30 after Allo-HCT **(b)**. Increase in EBV viral load according to γδ T-cell count (below or over the best value of 4.63 μL^{-1}) at D30 after Allo-HCT **(c)**. The median of EBV viral load and 95% confidence intervals (error bars) are shown. Allo-HCT, allogeneic haematopoietic stem cell transplantation; EBV, Epstein–Barr virus.

Table 3. Multivariate analysis of EBV risk factors

Covariates	Hazard ratio (95% CI)	*P*-value
RIC vs RTC/sequential	0.39 (0.11–1.3)	0.13
Haplo-HCT vs Control	1.01 (0.39–2.6)	0.99
High–very-high DRI vs others	1.09 (0.52–2.3)	0.82
γδ T cells > 4.63 μL^{-1} vs ≤ 4.63 μL^{-1} at D30	0.34 (0.15–0.76)	**0.009**

CI, confidence interval; DRI, disease risk index; Haplo-HCT, haploidentical haematopoietic stem cell transplantation; RIC, reduced intensity conditioning; RTC, reduced toxicity conditioning; vs, versus.
Bold denotes statistical significance.

viral load after Haplo-HCT with PTCy and PBSC grafts. Administration of PTCy and low-dose ATG was associated with an early profound lymphopenia: at D20, all lymphocyte subsets assessed were significantly decreased compared to patients receiving ATG alone. Thereafter, α/β $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells progressively increased, and at D30, levels in the PTCy group were similar to those of patients receiving ATG alone, as previously described.[30] In contrast, γδ and $V\delta2^+$ T-cell IR was very slow and significantly delayed in patients receiving PTCy, with a dramatically lower median counts of $V\delta2^+$ T cells up to one year after Haplo-HCT. Dose of ATG was consistent across patients, with the majority of patients (96%) receiving 5 mg kg^{-1} ATG; therefore, we were not

© 2020 The Authors. *Clinical & Translational Immunology* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Australian and New Zealand Society for Immunology, Inc.

able to evaluate the impact of ATG dose on IR and patients' outcomes.

Since PTCy induces alloreactive proliferative T-cell dysfunction and suppression,[8] we assessed the effect of PTCy on the proliferation capacity of the different T-cell subsets to understand the mechanism of the profound γδ T-cell deficiency observed after PTCy. Interestingly, the proportions of proliferating $CD8^+$, γδ and $V\delta2^+$ T cells at D3 after Allo-HCT and before PTCy administration were high and comparable to those of patients receiving ATG alone. After PTCy administration, we observed a deleterious impact of PTCy on the $CD8^+$, γδ and $V\delta2^+$ T-cell proliferation, while proliferation was not affected in the control group.

Nevertheless, while $CD8^+$ T cells rapidly reached similar median counts, γδ T-cell counts remained significantly lower, up to one year for $V\delta2^+$ T cells, after Haplo-HCT and PTCy. Aldehyde dehydrogenase (ALDH), the major mechanism of resistance to cyclophosphamide, has been reported to drive regulatory T-cell resistance to PTCy.[27] Therefore, we assessed if the deleterious impact of PTCy on $CD8^+$, γδ and $V\delta2^+$ T cells was related to a lower expression of ALDH in those cells, but we could not find any difference between cell subsets within the PBSC graft (data not shown). Interestingly, we previously reported that PBSC grafts contain more than 10 times fewer γδ T cells than $CD8^+$ T cells,[31] and we hypothesised that the different pool size of $CD8^+$ and γδ T cells in the PBSC graft may explain the differences in IR.

A meta-analysis recently reported that high γδ T-cell values after Allo-HCT were associated with less disease relapse, fewer infections and higher OS and disease-free survival.[32] Nevertheless, despite a significantly delayed γδ T-cell IR in patients receiving an Haplo-HCT with PTCy and ATG, there was no difference in relapse incidence, OS and PFS between the two groups, suggesting that γδ T cells are not critical for disease control in this setting of Haplo-HCT. In contrast, as previously reported,[9] the incidence of increased EBV viral load was significantly higher in patients receiving Haplo-HCT with low-dose ATG and PTCy compared to patients with matched donor and receiving low-dose ATG alone, being 61% versus 34%, respectively ($P = 0.02$). Furthermore, in multivariate analysis, the impact of PTCy was overcome by a low number of γδ T cells at D30, which was the only parameter associated with a higher incidence of increased EBV viral load [HR, 0.34 (0.15–0.76), $P = 0.009$]. This finding is in accordance with previous studies which reported a correlation between the $V\delta2^+$ T cell or CD4/CD8 double-negative T-cell recovery and the occurrence of increase in EBV viral load in the setting of Haplo-HCT with high-dose ATG.[21,22]

Our study has several limitations, in particular regarding the absence of external validation cohort and the heterogeneity of the population in terms of conditioning regimen, GvHD prophylaxis or haematological diseases. In an attempt to have a more homogeneous population, we included only patients receiving a fludarabine and busulfan-based conditioning regimen; nevertheless, we cannot exclude that various doses of busulfan and additional drugs administered in some patients, in particular thiotepa, may have influence IR. Regarding GvHD prophylaxis, our findings were similar in a subgroup analysis of patients receiving CsA and MMF. Finally, we must also highlight that while γδ T cells represent only a minor part of the circulating T cells (1–5%), they are present in much higher number within epithelial tissues (10–100%).[33] It would be therefore very important to evaluate whether γδ T-cell infiltration correlates with our finding in the peripheral blood and the role of γδ T-cell homoeostasis in antiviral immunity.

CONCLUSION

Overall, the current study shows that administration of PTCy after Haplo-HCT can induce a profound and prolonged γδ T-cell depletion. Furthermore, we report an inverse correlation of the recovery of $V\delta2^+$ T cells with increase in EBV viral load following Haplo-HCT using PTCy and low-dose ATG. This result is in line with the previous observations reported after Haplo-HCT using the GIAC protocol.[22] Manipulation of PBSC grafts, based on $V\delta2^+$ T-cell sorting and *ex vivo* culture with bisphosphonates,[21] followed by a delayed administration of autologous $V\delta2^+$ T cells could be a new cellular therapy to improve the prophylaxis of increase in EBV viral load in the Haplo-HCT with PTCy setting.

METHODS

Patients

This retrospective single-centre study included a cohort of 106 patients who underwent Allo-HCT for haematological malignancies between April 2013 and December 2016 at the Saint-Antoine University Hospital (AP-HP, Paris, France).

© 2020 The Authors. *Clinical & Translational Immunology* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Australian and New Zealand Society for Immunology, Inc.

All patients who received Allo-HCT with low dose of ATG and a granulocyte colony-stimulating factor mobilised PBSC graft from a matched related or unrelated donor (control group) or an haploidentical donor with PTCy (PTCy group) and with at least one frozen peripheral blood sample available at day + 30 for IR analysis were included. A group of 10 healthy donors [HD group, Etablissement Français du Sang (EFS, Paris Saint-Antoine-Crozatier, Paris, France)] was established to serve as baseline reference [median age 45 (range, 32–61) years, 70% were male]. In addition, a second independent cohort of 28 Allo-HCT patients was used to prospectively analyse early T-cell proliferation in fresh samples. Written informed consent was obtained from each patient. This study was approved by the hospital's institutional review board and the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Ile de France X, reference 29-2016).

Transplantation procedure

All patients received the preparative regimen as in-patients in private rooms, and remained hospitalised until haematopoietic and clinical recovery. They all received granulocyte colony-stimulating factor mobilised PBSC as grafts and *in vivo* T-cell depletion with low-dose ATG [thymoglobulin (Sanofi, France) 5 mg kg^{-1} median dose (range, 2.5–6)]. In addition, patients with an haploidentical donors received standard PTCy (50 mg kg^{-1} day^{-1}) at D3 and D5. Patients with refractory disease received a sequential conditioning regimen based on thiotepa 5–10 mg kg^{-1}, etoposide 400 mg m^{-2} and cyclophosphamide 1600 mg m^{-2} between days (D) -15 and -9, followed by, after a 3-day rest, reduced intensity conditioning (RIC) with fludarabine 150 mg m^{-2} and intravenous busulfan 6.4 mg kg^{-1} on D-6 to D-1,[34] while other patients received a RIC or a reduced toxicity conditioning (RTC) regimen based on 150 mg m^{-2} fludarabine, 6.4–9.6 mg kg^{-1} day^{-1} busulfan with or without 5 mg kg^{-1} thiotepa. Post-transplantation immunosuppression consisted of cyclosporine A (CsA) alone for matched sibling donors, CsA and mycophenolate mofetil (MMF) for matched unrelated donor and haploidentical donors, or CsA and a short course of methotrexate (MTX) for patients with a major ABO mismatch incompatibility. CsA was administered intravenously at a 3 mg kg^{-1} day^{-1} dosage starting on D-2 or D-3, and changed to twice daily oral dosing as soon as tolerated.[35,36] MMF was administered at a fixed oral dose of 2 g day^{-1} starting from D5 without adjustment. MTX was administered at 15 mg m^{-2} on D1 and 10 mg m^{-2} on D3 and D6. In the absence of GvHD, MMF and CsA were tapered over 4 weeks starting from D60 and D90, respectively. Supportive care was the same for all patients during the whole study period. Empiric broad-spectrum antibiotics were administered if a patient developed a temperature ≥ 38.3°C, or ≥ 38°C for 1 h, or showed any sign of infection. Anti-infectious prophylaxis consisted of acyclovir while trimethoprim–sulfamethoxazole or atovaquone was started after neutrophil recovery for one year and pursued beyond if $CD4^+$ T cells remained below 0.2×10^9 cells L^{-1}. Cytomegalovirus (CMV), Epstein–Barr virus (EBV), human herpesvirus 6 (HHV6) and *Toxoplasma gondii* were routinely screened by quantitative polymerase chain reaction (PCR) until at least D100. For CMV reactivation, preemptive ganciclovir or foscavir was initiated when CMV was above 1000 international units mL^{-1}. For the increase in EBV viral load in blood, preemptive rituximab was given when EBV was above 5000 international units mL^{-1}. Acute GvHD (aGvHD) was diagnosed and graded according to the revised Glucksberg criteria,[37] and chronic GvHD (cGvHD) was diagnosed and graded according to the Seattle standard criteria.[38]

Flow cytometry

Peripheral blood samples were collected at D20, D30, D90, D180 and D360 following Allo-HCT. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using a Lymphocyte Separation Medium (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France) by density gradient centrifugation, and an aliquot was cryopreserved for storage. After thawing, PBMCs were stained with the following antibody panel: anti-TCR Vβ11 (FITC), anti-CD4 (PE), anti-TCR γδ (PECy5.5), anti-CD56 (AA700), anti-CD3 (AA750), anti-TCR Vδ2 (PB) and anti-CD8 (KRO) (Beckman Coulter, Villepinte, France); anti-CD161 (PE/Dazzle 594), anti-TCR Vα24 (PC7) and anti-TCR Vα7.2 (APC) (BioLegend, Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France); and anti-CD45 (BV605) and anti-CD16 (BV786) (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). For the analysis of proliferation, fresh PBMCs from the PBSC graft and from Allo-HCT recipients (at D3, D7 and D10 after Allo-HCT) were isolated as above and stained with the following antibody panel: anti-CD4 (PE), anti-TCR γδ (PECy5.5), anti-CD56 (AA700), anti-CD3 (AA750), anti-TCR Vδ2 (PB) and anti-CD8 (KRO) (Beckman Coulter); anti-CD161 (PE Vio770) (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany); anti-TCR Vα7.2 (APC) (BioLegend); anti-CD45 (BV605) (BD Biosciences) followed by Ki67 analysis, after permeabilisation and incubation with anti-Ki67 (FITC) (BD Biosciences). Data were acquired on a Cytoflex flow cytometer (Beckman Coulter) and analysed using Kaluza Analysis v2.1 software (Beckman Coulter). To calculate absolute values of cells per microlitre of blood, the number of lymphocytes on routine clinical blood counts from the same day was collected from the patient charts. Based on these parameters, we calculated the proportions of cells in the blood of the patients for each cell population analysed by flow cytometry. Gating strategies used to identify innate-like lymphoid cells are described in Supplementary figure 1.

Statistical analysis

Differences between categorical and continuous variables were carried out using the Fisher and the Mann–Whitney tests, respectively. The cumulative incidence of aGvHD, cGvHD, viral reactivations, relapse and non-relapse mortality (NRM) was estimated, and groups were compared using Gray's test. Relapse was defined as the competitive risk for NRM, and NRM was defined as the competing risk for relapse. Progression-free survival (PFS) was calculated from the date of Allo-HCT until the time to relapse or progression. OS was calculated from the date of Haplo-HCT until the time of death or the last observation if a patient remained alive. Refined GvHD-free and progression-free survival (GPFS) was defined as a combination of survival with no evidence of relapse/progression, grade III–IV aGvHD and extensive cGvHD.[39] Probabilities of PFS, GPFS and OS were estimated

© 2020 The Authors. *Clinical & Translational Immunology* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Australian and New Zealand Society for Immunology, Inc.

using the Kaplan–Meier method, and groups were compared using the log-rank test. The cut-off values of cell concentrations at D30 after Allo-HCT were assessed by constructing ROC curves and then calculating the area under the curve (AUC) for each one in order to identify the best cut-off value on the whole cohort. Cox proportional hazard models were used to compare incidences of increase in EBV viral load and included relevant variables differing between the groups ($P \leq 0.10$). For these analyses, only serial samples collected before aGvHD and relapse were considered. All tests were 2-sided. The type I error rate was fixed at 0.05. Statistical analyses were performed with SPSS 24.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and R 3.4.0 [R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.].

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the clinical teams who provided care for the study patients, and the Tumorotheque of Saint-Antoine Hospital.

CONFLICT OF INTEREST

Mohamad Mohty reports grants and/or lecture honoraria from Janssen, Sanofi, MaaT Pharma, JAZZ pharmaceutical, Celgene, Amgen, BMS, Takeda, Pfizer and Roche, all outside the submitted work. Florent Malard reports lecture honoraria from Therakos/Mallinckrodt, Biocodex, Janssen, Keocyt, Sanofi, JAZZ pharmaceutical and Astellas, all outside the submitted work. Rémy DULERY reports lecture honoraria from Keocyt, Sanofi and Novartis, all outside the submitted work. The other authors declare no competing financial interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Nicolas Stocker: Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing-original draft. **Béatrice Gaugler:** Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Methodology; Supervision; Validation; Writing-review & editing. **Myriam Labopin:** Formal analysis; Writing-review & editing. **Agathe Farge:** Investigation; Writing-review & editing. **Yishan Ye:** Investigation; Writing-review & editing. **Laure Ricard:** Investigation; Writing-review & editing. **Eolia Brissot:** Investigation; Writing-review & editing. **Remy Dulery:** Investigation; Writing-review & editing. **Simona Sestili:** Investigation; Writing-review & editing. **Giorgia Battipaglia:** Investigation; Writing-review & editing. **Clémence Médiavilla:** Investigation; Writing-review & editing. **Annalisa Paviglianiti:** Investigation; Writing-review & editing. **Anne Banet:** Investigation; Writing-review & editing. **Zoe Van De Wyngaert:** Investigation; Writing-review & editing. **Tounes Ledraa:** Investigation; Writing-review & editing. **Mohamad Mohty:** Conceptualization; Funding acquisition; Methodology; Project administration; Resources; Validation; Writing-review & editing. **Florent Malard:** Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Methodology; Supervision; Validation; Writing-original draft; Writing-review & editing.

REFERENCES

1. Kanakry CG, Fuchs EJ, Luznik L. Modern approaches to HLA-haploidentical blood or marrow transplantation. *Nat Rev Clin Oncol* 2016; **13**: 10–24.
2. Lorentino F, Labopin M, Fleischhauer K *et al*. The impact of HLA matching on outcomes of unmanipulated haploidentical HSCT is modulated by GVHD prophylaxis. *Blood Adv* 2017; **1**: 669–680.
3. Ruggeri A, Sun Y, Labopin M *et al*. Post-transplant cyclophosphamide versus anti-thymocyte globulin as graft- versus-host disease prophylaxis in haploidentical transplant. *Haematologica* 2017; **102**: 401–410.
4. Law AD, Salas MQ, Lam W *et al*. Reduced-intensity conditioning and dual T lymphocyte suppression with antithymocyte globulin and post-transplant cyclophosphamide as graft-versus-host disease prophylaxis in haploidentical hematopoietic stem cell transplants for hematological malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018; **24**: 2259–2264.
5. Dreger P, Sureda A, Ahn KW *et al*. PTCy-based haploidentical vs matched related or unrelated donor reduced-intensity conditioning transplant for DLBCL. *Blood Adv* 2019; **3**: 360–369.
6. Ahmed S, Kanakry JA, Ahn KW *et al*. Lower graft-versus-host disease and relapse risk in post-transplant cyclophosphamide-based haploidentical versus matched sibling donor reduced-intensity conditioning transplant for hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019; **25**: 1859–1868.
7. Passweg JR, Baldomero H, Bader P *et al*. Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. *Bone Marrow Transplant* 2015; **50**: 476–482.
8. Wachsmuth LP, Patterson MT, Eckhaus MA, Venzon DJ, Gress RE, Kanakry CG. Post-transplantation cyclophosphamide prevents graft-versus-host disease by inducing alloreactive T cell dysfunction and suppression. *J Clin Investig* 2019; **129**: 2357–2373.
9. Mohty R, Brissot E, Battipaglia G *et al*. Infectious complications after post-transplantation cyclophosphamide and anti-thymocyte globulin-based haploidentical stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2019; **187**: e64–e68.
10. Crocchiolo R, Bramanti S, Vai A *et al*. Infections after T-replete haploidentical transplantation and high-dose cyclophosphamide as graft-versus-host disease prophylaxis. *Transpl Infect Dis* 2015; **17**: 242–249.
11. Slade M, Goldsmith S, Romee R *et al*. Epidemiology of infections following haploidentical peripheral blood hematopoietic cell transplantation. *Transpl Infect Dis* 2017; **19**: e12629.
12. Tischer J, Engel N, Fritsch S *et al*. Virus infection in HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: incidence in the context of immune recovery in two different transplantation settings. *Ann Hematol* 2015; **94**: 1677–1688.
13. De Paoli P, Gennari D, Martelli P, Cavarzerani V, Comoretto R, Santini G. γδ T cell receptor-bearing lymphocytes during Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis* 1990; **161**: 1013–1016.

© 2020 The Authors. *Clinical & Translational Immunology* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Australian and New Zealand Society for Immunology, Inc.

14. Xiang Z, Liu Y, Zheng J *et al*. Targeted activation of human Vγ9Vδ2-T cells controls Epstein-Barr virus-induced B cell lymphoproliferative disease. *Cancer Cell* 2014; **26**: 565–576.
15. Urban EM, Chapoval AI, Pauza CD. Repertoire development and the control of cytotoxic/effector function in human γδ T cells. *Clin Dev Immunol* 2010; **2010**: 732893.
16. Ravens S, Schultze-Florey C, Raha S *et al*. Human γδ T cells are quickly reconstituted after stem-cell transplantation and show adaptive clonal expansion in response to viral infection. *Nat Immunol* 2017; **18**: 393–401.
17. Bosch M, Khan FM, Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2012; **19**: 324–335.
18. Silva-Santos B, Mensurado S, Coffelt SB. γδ T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer. *Nat Rev Cancer* 2019; **19**: 392–404.
19. Willcox CR, Davey MS, Willcox BE. Development and selection of the human Vγ9Vδ2$^+$ T-cell repertoire. *Front Immunol* 2018; **9**: 1501.
20. Farnault L, Gertner-Dardenne J, Gondois-Rey F *et al*. Clinical evidence implicating γδ T cells in EBV control following cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2013; **48**: 1478–1479.
21. Bian Z, Liu J, Xu LP *et al*. Association of Epstein-Barr virus reactivation with the recovery of CD4/CD8 double-negative T lymphocytes after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2017; **52**: 264–269.
22. Liu J, Bian Z, Wang X *et al*. Inverse correlation of Vδ2$^+$ T-cell recovery with EBV reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2018; **180**: 276–285.
23. Armand P, Kim HT, Logan BR *et al*. Validation and refinement of the Disease Risk Index for allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2014; **123**: 3664–3671.
24. Ando T, Tachibana T, Tanaka M *et al*. Impact of graft sources on immune reconstitution and survival outcomes following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Adv* 2020; **4**: 408–419.
25. Bejanyan N, Brunstein CG, Cao Q *et al*. Delayed immune reconstitution after allogeneic transplantation increases the risks of mortality and chronic GVHD. *Blood Adv* 2018; **2**: 909–922.
26. Mehta RS, Rezvani K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence* 2016; **7**: 901–916.
27. Kanakry CG, Ganguly S, Zahurak M *et al*. Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide. *Sci Transl Med* 2013; **5**: 211ra157.
28. Roberto A, Castagna L, Zanon V *et al*. Role of naive-derived T memory stem cells in T-cell reconstitution following allogeneic transplantation. *Blood* 2015; **125**: 2855–2864.
29. Kanakry CG, Coffey DG, Towlerton AM *et al*. Origin and evolution of the T cell repertoire after posttransplantation cyclophosphamide. *JCI Insight* 2016; **1**: e86252.
30. Retiere C, Willem C, Guillaume T *et al*. Impact on early outcomes and immune reconstitution of high-dose post-transplant cyclophosphamide vs anti-thymocyte globulin after reduced intensity conditioning peripheral blood stem cell allogeneic transplantation. *Oncotarget* 2018; **9**: 11451–11464.
31. Malard F, Labopin M, Chevallier P *et al*. Larger number of invariant natural killer T cells in PBSC allografts correlates with improved GVHD-free and progression-free survival. *Blood* 2016; **127**: 1828–1835.
32. Arruda LCM, Gaballa A, Uhlin M. Impact of γδ T cells on clinical outcome of hematopoietic stem cell transplantation: systematic review and meta-analysis. *Blood Adv* 2019; **3**: 3436–3448.
33. Nielsen MM, Witherden DA, Havran WL. γδ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. *Nat Rev Immunol* 2017; **17**: 733–745.
34. Dulery R, Menard AL, Chantepie S *et al*. Sequential conditioning with thiotepa in T cell- replete hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of refractory hematologic malignancies: comparison with matched related, haplo-mismatched, and unrelated donors. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018; **24**: 1013–1021.
35. Malard F, Szydlo RM, Brissot E *et al*. Impact of cyclosporine-A concentration on the incidence of severe acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; **16**: 28–34.
36. Stocker N, Dulery R, Battipaglia G *et al*. Impact of cyclosporine A concentration on acute graft-vs-host disease incidence after haploidentical hematopoietic cell transplantation. *Eur J Haematol* 2019; **103**: 10–17.
37. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P *et al*. 1994 consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; **15**: 825–828.
38. 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**: 204–217.
39. Ruggeri A, Labopin M, Ciceri F, Mohty M, Nagler A. Definition of GvHD-free, relapse-free survival for registry-based studies: an ALWP-EBMT analysis on patients with AML in remission. *Bone Marrow Transplant* 2016; **51**: 610–611.

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ARTICLE 2 : IMPACT DU TRAITEMENT PREEMPTIF PAR RITUXIMAB SUR LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE DANS LE CONTEXTE DE REACTIVATION EBV APRES ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES

1. Résultats principaux

Cette étude rétrospective, conduite sur une cohorte de 219 patients allogreffés de CSH périphériques mobilisées par G-CSF à l'hôpital Saint-Antoine entre Janvier 2009 et Aout 2017 a comparé la reconstitution immunitaire des patients recevant un traitement préemptif par rituximab (posologie hebdomadaire de 375 mg/m^2 jusqu'à négativation de la charge virale) dès obtention de deux charges virales EBV consécutives positives, comparée à celle des patients allogreffés ne présentant pas d'augmentation de la charge virale EBV. Cent sept patients ayant reçu du rituximab furent ainsi comparés à 112 patients n'ayant pas développé de virémie à EBV (groupe contrôle).

Le délai médian de réactivation de l'EBV était de 49 jours (14-561) et le nombre médian d'administration de rituximab était de 3 (1-8). Cinq patients ont développé une lymphoprolifération associée à l'EBV (dont un décès). Vingt-et-un patients (17%) ont développé une neutropénie (polynucléaires neutrophiles < 1,0 G /L) induite par le rituximab. Le délai médian d'apparition des neutropénies était de 54 jours (28-196) et cinq patients présentaient une complication infectieuse liée à une neutropénie sévère.

Soixante-neuf patients ayant reçu du rituximab purent être appariés avec 69 patients contrôles selon la source de CSH, le type de donneur, le type de conditionnement, l'âge à l'allo-CSH et la survie après l'allo-CSH. En tenant compte de l'existence éventuelle d'une maladie du greffon contre l'hôte, de l'administration de lymphocytes du donneur, d'une rechute ou d'une supplémentation par immunoglobulines polyvalentes, un déficit significatif en lymphocytes B CD19$^+$ était observé à J90, J180 et J360 tandis qu'un déficit quantitatif en immunoglobulines totales était retrouvé à J180 et J360 chez les patients ayant reçu du rituximab. Cinquante-six

patients (67%) du groupe rituximab recevaient une supplémentation intraveineuse en immunoglobulines contre 28 patients (41%) (P = 0,003).

Une évaluation de l'homéostasie des lymphocytes B, réalisée sur des sous-groupes de patients (16 patients traités par rituximab contre 13 patients contrôles), révélait des proportions significativement augmentées de lymphocytes B transitionnels et $CD24^+$ $CD38^+$ à J360 après Allo-CSH (respectivement, P = 0,007 and P = 0,004) dans le groupe rituximab en comparaison au groupe contrôle. En revanche, les populations de lymphocytes B naifs, B mémoires et B pré-centre germinal atteignaient des proportions similaires dans les deux groupes.

A 2 ans de l'administration du rituximab, les incidences cumulées d'infections étaient similaires entre les groupes (23% dans le groupe rituximab contre 17% dans le groupe contrôle ; P : 0,59), avec des probabilités comparables d'infection virale (11% contre 10%, respectivement ; P = 0,63). En termes de GvHD, il existait une tendance pour une diminution de l'incidence cumulée de GvHD chronique dans le groupe rituximab en comparaison au groupe contrôle (30% contre 49%, respectivement ; P = 0,059), sans impact significatif sur l'incidence de GvHD chronique extensive (11% contre 12%, respectivement ; P = 1,0). A 2 ans de l'administration du rituximab, les taux de rechute, de survie sans progression et de survie globale n'étaient pas significativement différents entre les groupes (26% contre 17%, P = 0,70 ; 55% contre 76%, P = 0,71, et 59% contre 82%, P = 0.23, respectivement).

Nous concluons que le traitement préemptif par rituximab, malgré l'induction d'un retard à la reconstitution des lymphocytes B et un risque élevé de neutropénies liées au rituximab, peut être considéré comme un traitement intéressant, étant donné l'absence d'impact négatif sur le devenir clinique après Allo-CSH et la faible incidence de lymphoprolifération liée à l'EBV.

2. Article

Pre-Emptive Rituximab Treatment for Epstein-Barr Virus Reactivation after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation is a Worthwhile Strategy in High-Risk Recipients: A Comparative Study for Immune Recovery and Clinical Outcomes.

Nicolas Stocker [1], Myriam Labopin [2,3], Inès Boussen [1], Olivier Paccoud [4], Agnès Bonnin [2], Florent Malard [1,2], Corinne Amiel [5], Joël Gozlan [6], Giorgia Battipaglia [1,2], Rémy Duléry [2], Federica Giannotti [2], Annalisa Ruggeri [2], Béatrice Gaugler [1,2], Mohamad Mohty [1,2,3] and Eolia Brissot [1,2,3].

[1] Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), F-75012 Paris, France

[2] AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'hématologie clinique et thérapie cellulaire, F-75012, Paris, France

[3] Acute Leukemia Working Party, Paris Study office, European Society for Blood and Marrow Transplantation, Paris, France

[4] Sorbonne Université, Service des maladies infectieuses, AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, F-75012 Paris, France

[5] AP-HP, Service de virologie, Hôpital Tenon, F-75020 Paris, France

[6] Sorbonne Université, Service de virologie, AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, F-75012 Paris, France

Published in Bone Marrow Transplantation

2019 Sep 27. doi: 10.1038/s41409-019-0699-6.

Bone Marrow Transplantation
https://doi.org/10.1038/s41409-019-0699-6

ARTICLE

Pre-emptive rituximab treatment for Epstein–Barr virus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is a worthwhile strategy in high-risk recipients: a comparative study for immune recovery and clinical outcomes

Nicolas Stocker[1] · Myriam Labopin[2,3] · Inès Boussen[1] · Olivier Paccoud[4] · Agnès Bonnin[2] · Florent Malard[1,2] · Corinne Amiel[5] · Joël Gozlan[6] · Giorgia Battipaglia[1,2] · Rémy Duléry[2] · Federica Giannotti[2] · Annalisa Ruggeri[2] · Béatrice Gaugler[1,2] · Mohamad Mohty[1,2,3] · Eolia Brissot[1,2,3]

Received: 1 July 2019 / Revised: 3 August 2019 / Accepted: 10 August 2019
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2019

Abstract

This retrospective study evaluated the impact of a pre-emptive rituximab (RTX) strategy for Epstein–Barr virus (EBV) reactivation on immune recovery and outcomes of 219 high-risk recipients undergoing allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) for hematological malignancies or bone marrow failure. One-hundred and seven patients received pre-emptive RTX for EBV reactivation (RTX group) and 112 did not (control group). The median onset time of EBV reactivation was 49 days (range, 14–561), including five patients who developed post-transplant lymphoproliferative disorder (EBV-PTLD). RTX and control groups were pair-matched to assess the impact of RTX on all endpoints. In RTX patients, CD19 + B cells were significantly decreased until 1-year post-transplant, so were immunoglobulin levels. Twenty-one patients (17%) developed RTX-related neutropenia. There was, in the RTX group, a trend towards a lower cumulative incidence of chronic GvHD ($P = 0.059$). Overall survival, progression-free survival, non-relapse mortality, relapse incidence, and incidence of overall infections at 2 years following allo-SCT were comparable in the two groups. We conclude that pre-emptive RTX, despite inducing a delayed B-cell reconstitution and a high risk of RTX-related neutropenia, may be considered as a worthwhile treatment, given the absence of negative impact on post allo-SCT outcomes and a low incidence of EBV-PTLD.

Introduction

Epstein–Barr Virus (EBV) reactivation and EBV-associated post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) are a heterogeneous group of diseases that may occur in the setting of allogenic transplantation of both hematopoietic stem cells (allo-SCT) and solid organs [1–3]. Recipients of allo-SCT are particularly at risk of developing PTLD, which are an uncommon but potentially life-threatening complication associated with transplantation. In contrast to the setting of solid-organ transplantation (SOT), PTLD after allo-SCT are with a few exceptions almost exclusively EBV-related [1].

EBV is a latent γ-Herpes virus with B lymphocyte-specific tropism that infects >90% of healthy individuals. In transplant recipients, EBV reactivation is associated with a wide spectrum of clinical disorders ranging from isolated fever to PTLD, which arise as a consequence of the

Supplementary information The online version of this article (https://doi.org/10.1038/s41409-019-0699-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Eolia Brissot
eolia.brissot@aphp.fr

1 Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), 75012 Paris, France

2 AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Hématologie Clinique Et Thérapie Cellulaire, 75012 Paris, France

3 Acute Leukemia Working Party, Paris Study Office, European Society for Blood and Marrow Transplantation, Paris, France

4 Sorbonne Université, Service Des Maladies Infectieuses, AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, 75012 Paris, France

5 AP-HP, Service de Virologie, Hôpital Tenon, 75020 Paris, France

6 Sorbonne Université, Service de Virologie, AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, 75012 Paris, France

Published online: 27 September 2019

uncontrolled neoplastic proliferation of lymphoid or plasmacytic cells infected with EBV, secondary to the loss or suppression of physiological cytotoxic T-cell surveillance [4, 5]. PTLD after allo-SCT typically occurs within the first 6 months after transplantation, usually before recovery of an EBV-specific cytotoxic T-lymphocyte response. Risk factors for EBV-associated PTLD after allo-SCT include T-cell depletion, EBV serology donor/recipient mismatch, cord-blood transplantation, HLA mismatch, severe acute or chronic graft-versus-host disease (GvHD) requiring intensive immunosuppressive therapy, high or rising EBV viral load, and second allo-SCT [6]. Historically, PTLD after allo-SCT is associated with significant mortality and morbidity [7–9]. The use of routine monitoring of EBV-DNAemia using quantitative PCR to identify patients at high risk of lymphoproliferative disease, and the pre-emptive treatment of EBV reactivations with the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab (RTX) have led to considerable improvements in outcomes [2, 6] and prevention of PTLD [10–14].

However, since CD20 expression is not confined to malignant cells, normal B cells may also be bystanders of the cellular effects of RTX, which can be of concern in already immunocompromised patients, especially with regard to long-term risks of infection. Although RTX therapy is dramatically effective in this setting, studies evaluating immune recovery, tolerance and late clinical outcomes are needed. This single-center retrospective study therefore aimed to evaluate the impact of pre-emptive RTX therapy for EBV reactivation after allo-SCT in terms of immune recovery, incidence of infectious complications, and overall clinical outcomes.

Patients and methods

Patients

Two-hundred and nineteen patients who underwent allo-SCT for hematological malignancies or bone marrow failure in a single institution (University Hospital of Saint-Antoine, Paris, France) between January 2009 and August 2017 were included in this retrospective study. We excluded all patients who received allo-SCT using unrelated cord-blood cells. One-hundred and seven patients received RTX treatment for EBV reactivation after allo-SCT, and 112 did not develop EBV viremia and therefore did not receive RTX after transplant. Written informed consent was obtained from each patient and donor. The study was performed according to institutional guidelines. Patients participated in investigational protocols approved by the Institutional Review Board and the local ethics committee.

EBV monitoring and treatment

Based on European Conference on Infections in Leukemia (ECIL) recommendations [6], all patients were assessed weekly for EBV reactivation during the first 6 months after allo-SCT. EBV-DNAemia was monitored in peripheral blood samples using real-time quantitative PCR to quantify EBV viral loads, and patients were routinely monitored for clinical features attributable to EBV. EBV reactivation was defined as two consecutive EBV-DNAemia in whole blood above 5.000 UI/ml. EBV-associated PTLD was defined as either biopsy-proven post-transplantation lymphoma (proven PTLD), or EBV reactivation along with evidence, on a computerized tomography scan, of nodal or soft-tissue abnormalities consistent with PTLD (probable PTLD). Patients diagnosed with EBV reactivation received weekly anti-CD20 monoclonal antibody RTX at a dose of 375 mg/m^2, until clearance of EBV-DNAemia.

GvHD and infections prophylaxis and treatment

All patients received in-vivo T-cell depletion with anti-thymoglobulin as part of their conditioning regimen and were considered at high-risk for EBV reactivation. GvHD prophylaxis for all patients consisted of either cyclosporine A alone (CsA), CsA and mycophenolate mofetil (MMF), or CsA and a short course of methotrexate (MTX). In the haploidentical subgroup, all patients received standard post-transplant cyclophosphamide. Acute (aGvHD) and chronic GvHD (cGvHD) were diagnosed and graded according to the Seattle standard criteria.

All patients received antiviral prophylaxis with intravenous acyclovir or oral valacyclovir from the start of conditioning. *Pneumocystis jirovecii* prophylaxis with trimethoprim-sulfamethoxazole, as well as amoxicillin or penicillin for prevention of encapsulated bacterial infections were initiated following engraftment. All blood products were filtered, irradiated and prevention of CMV disease consisted in pre-emptive administration of antiviral therapy at first evidence of positive CMV viral loads in peripheral blood samples.

Flow cytometry

Peripheral blood samples were collected in EDTA tubes before transplant and at days 90, 180, and 360 following allo-SCT. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using a Lymphocyte Separation Medium (MP Biomedicals) by density gradient centrifugation and an aliquot was cryopreserved for storage. After thawing, PBMCs were stained with the following antibody panels: T, B, and NK cell panel, anti-CD56 (AA700), anti-CD3 (AA750), anti-CD8 (KRO) and anti-CD19 (BV786)

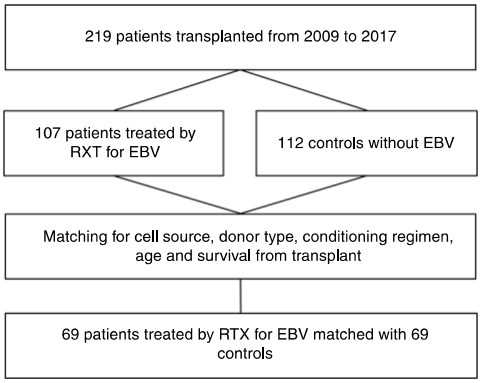

Fig. 1 Flow diagram of the study. Matching of patients treated by RTX for EBV reactivation and controls. EBV, Epstein–Barr Virus; RTX, rituximab

(Beckman Coulter, Villepinte, France), anti-CD45 (BV605) and anti-CD4 (BV650) (Biolegend, Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France); B-cell subpopulations panel, anti-IgD FITC (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France); anti-CD27 (PE), anti-CD19 (PC7) and anti-CD45 (BV605) (Biolegend), anti-CD24 (ECD) and anti-CD38 (PECy5.5) (Beckman Coulter). Data were acquired on a Cytoflex flow cytometer (Beckman Coulter) and analyzed using Kaluza Analysis v2.1 software (Beckman Coulter). To calculate absolute values of cells per microliter of blood, the numbers of lymphocytes on routine clinical blood counts from the same day were collected from the patient charts. Based on these parameters, we calculated the proportions of cells in the blood of the patients for each cell type analyzed by flow cytometry. Gating strategies used to identify lymphoid and B-cell populations are described in Supplementary Figs. S1 and S2.

Endpoints and statistical methods

The primary endpoint was the reconstitution of the following immunological parameters: T cells, B cells, NK cells, immunoglobulins (Ig) levels, and neutrophil counts. Secondary endpoints were incidences of infection (bacterial, viral, and, fungal), cGvHD, extensive cGvHD, relapse incidence (RI), non-relapse mortality (NRM), progression-free survival (PFS), and overall survival (OS). PFS was defined as survival with no evidence of relapse or progression. NRM was defined as death without evidence of relapse or progression. Cumulative incidence was used to estimate the endpoints of infections, RI, and cGVHD, to accommodate for competing risks. To study cGVHD, we considered relapse and death to be competing events. Probabilities of PFS and OS were calculated using the Kaplan–Meier method. Univariate analyses were done using the Gray's test for cumulative incidence functions and the log rank test for PFS and OS. Outcomes were compared using the Cox proportional hazard model. A matched-pair analysis was used to assess the impact of RTX on all endpoints, for which a subset of patients from all 219 allografted patients was selected by matching each RTX recipient with the best matched control patient, if possible. Matching factors were age at allo-SCT, donor type, conditioning regimen, and stem cell sources. With these matching criteria, 69 RTX recipients were matched with 69 control patients (Fig. 1). For the assessment of immunological reconstitution after the first infusion of RTX, only serial samples collected before aGvHD, extensive cGvHD, donor lymphocyte infusion, and relapse were considered for all analyses. To account for the association within matching groups, we stratified the comparison on matched pairs and included variables differing between the two groups with a P-value < 0.10. All tests were two-sided. The type I error rate was fixed at 0.05. Statistical analyses were performed with SPSS 24.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and R 3.4.0 (R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.)

Results

Patient characteristics

Characteristics of the entire population are summarized in Table 1. The median age of recipients was 55 (range, 18–76) years with 60% of male patients. Diagnoses were myeloid malignancies (67%), lymphoid malignancies (31%), or severe aplastic anemias (2%). According to their disease features, patients were considered as standard risk (58%) or high-risk (42%). Peripheral blood was the main source of stem cells with 194 (89%) patients allografted with PBSC grafts. Donors were matched-related (32%), matched-unrelated (47%), or haploidentical (21%) for the remaining patients, respectively. One-hundred and ten patients (50%) underwent reduced-intensity conditioning regimen containing fludarabine and busulfan with or without thiotepa while the remaining 109 patients (50%) received myeloablative conditioning regimen. Median follow-up among surviving patients was 25 months (range, 2–104) (Table 1).

EBV reactivation and pre-emptive RTX treatment

Characteristics of EBV reactivation and pre-emptive RTX therapy are summarized in Table 2. The median delay from allo-SCT to EBV reactivation was 49 days (range, 14–561), and the median number of RTX infusions was 3 (range, 1–8). Ninety-five percent of patients ($n = 102$) experienced EBV viral load clearance and five developed PTLD despite

Table 1 Characteristics of patients in the overall population

Characteristic (%)	Population ($n = 219$)
Patient age, median (range)	55 (17–76)
Patient gender	
Male	131 (60)
Female	88 (40)
Diagnosis[a]	
Myeloid malignancies	146 (67)
Lymphoid malignancies	68 (31)
Severe aplastic anemia	5 (2)
Disease status[b]	
Standard risk	127 (58)
High risk	92 (42)
Stem cell source	
BM	25 (11)
PBSC	194 (89)
Donor type	
MRD	71 (32)
MUD	102 (47)
HAPLO	46 (21)
Conditioning regimen category	
MAC	109 (50)
RIC/RTC	110 (50)
GvHD prophylaxis	
CsA-MMF	167 (76)
CsA-MTX	24 (11)
CsA alone	28 (13)
Pre-emptive RTX treatment for EBV reactivation	107 (49)
Median follow-up, months (range)	25 (2–104)

BM bone marrow, *CsA* cyclosporine A, *GvHD* graft-vs-host disease, *HAPLO* haploidentical donor, *MMF* mycophenolate mofetil, *MRD* matched-related donor, *MUD* matched unrelated donor, *MTX* methotrexate, *PBSC* peripheral blood stem cell, *RTX* rituximab

[a]Myeloid malignancies included 87 acute myeloid leukemias, 24 myelodysplastic syndromes (MDS), 27 myeloproliferative syndromes (MPS), 7 MDS/MPS, and 1 acute myeloid dendritic cell leukemia; lymphoid malignancies: 40 acute lymphoblastic leukemias (ALL), 16 non-Hodgkin's lymphomas (NHL), 7 Hodgkin's disease, 1 chronic lymphocytic leukemias (CLL), 2 multiple myelomas (MM), 1 plasma cell leukemia, and one histiocytic sarcoma

[b]Patients in complete remission, chronic phase or untreated were considered as standard risk, all others were considered as high risk

pre-emptive RTX (including one case of PTLD-attributable mortality). Of note, 21 patients (17%) developed acute neutropenia, defined as an absolute neutrophil count $<1.0 \times 10^9$ cells/L without any other apparent cause than RTX treatment. This occurred 4 weeks to 2 years following RTX treatment [15, 16], with a median time to onset of 54 days (28–196). Five patients experienced severe acute neutropenia-related infections.

Table 2 EBV reactivation and pre-emptive RTX treatment in the overall population

Characteristics (%)	$n = 107$
EBV reactivation onset (days) after transplantation median (range)	49 (14–561)
RTX treatment, median (range)	3 (1–8)
Post-transplantation lymphoproliferative disease (%)	5 (5)
RTX-related neutropenia (%)	21 (17)
Severe late neutropenia-related infection (%)	5 (19)

EBV Epstein–Barr virus, *RTX* rituximab

Table 3 Pair-matched groups characteristics

Characteristics	Controls ($n = 69$)	RTX ($n = 69$)	*P*-value
Patient age, median (range)	55 (19–71)	55 (19–70)	1
Patient gender			
Male	43 (62)	41 (59)	0.86
Female	26 (38)	28 (41)	
Stem cell source			
BMSC	4 (6)	4 (6)	1
PBSC	65 (94)	65 (94)	
Conditioning regimen category			
MAC	37 (54)	37 (54)	1
RIC/RTC	32 (46)	32 (46)	
Donor type			
MRD	24 (35)	24 (35)	1
MUD	36 (52)	36 (52)	
HAPLO	9 (13)	9 (13)	
GvHD prophylaxis			
CsA-MMF	51 (74)	50 (72)	0.69
CsA-MTX	7 (10)	10 (15)	
CsA alone	11 (16)	9 (13)	
Disease status[a]			
Standard risk	46 (67)	35 (51)	0.06
High risk	23 (33)	34 (49)	
Previous grade II–IV aGvHD			
No	55 (80)	60 (87)	0.25
Yes	14 (20)	9 (13)	
Donor lymphocyte infusion			
No	65 (94)	61 (88)	0.23
Yes	4 (6)	8 (12)	

BMSC bone marrow stem cell, *aGvHD* acute graft-vs-host disease, *HAPLO* haploidentical donor, *MAC* myeloablative conditioning, *MSD* matched sibling donor, *MMF* mycophenolate mofetil, *MUD* matched unrelated donor, *PBSC* peripheral blood stem cell, *RTX* rituximab, *RIC* reduced-intensity conditioning, *RTC* reduced-toxicity conditioning

[a]Patients in complete remission, chronic phase, or untreated were considered as standard risk, all others were considered as high risk

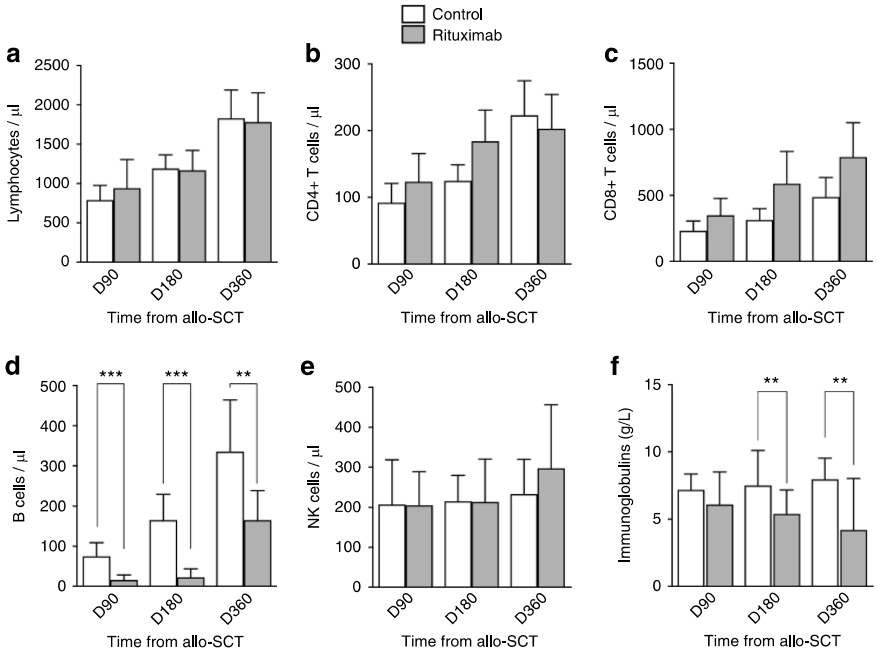

Fig. 2 Lymphocyte subsets and immunoglobulin recovery after allo-SCT. Lymphocyte subpopulations (total, CD4 + T cells, CD8 + T cells, B cells, NK cells) and immunoglobulins were quantified at 90, 180, and 360 days after allo-SCT. Bars displaying the mean and 95% confidence intervals (error bars) of patients from the control group ($n = 40$) and from the RTX group ($n = 39$) are shown. P-values < 0.05 are represented by *, P-values < 0.01 by **, and P-values < 0.001 by ***. allo-SCT, allogeneic stem cell transplantation; RTX, rituximab

Immune recovery of pair-matched groups

Characteristics of pair-matched groups are detailed in Table 3. Forty patients from the control group and 39 from the RTX group were included in the immunological analysis. Recovery of lymphocyte subsets and immunoglobulins of RTX patients and controls is illustrated in Fig. 2. While the recoveries of total lymphocytes, CD4 + T cells, CD8 + T cells, and natural killer cells were similar between the groups, CD19 + B cells were significantly decreased at D90, D180, and D360 in the RTX group compared to the control group (respectively, $P = 0.0007$, $P < 0.0001$, and $P = 0.006$, Fig. 2d). Considering the significant B-cell depletion expected after RTX therapy, a phenotypic analysis of B-cell subpopulations was performed on subgroups (16 RTX patients and 13 controls, respectively) to evaluate B-cell homeostasis. Transitional B-cell and CD24 + CD38 + B-cell proportions were significantly increased in the RTX group compared to the control group at D360 after allo-SCT (respectively, $P = 0.007$ and $P = 0.004$) (Fig. 3). Finally, naive B cells, memory B cells, plasmablasts, and pre-germinal center B cells reached similar proportions between RTX and control groups (Fig. 3). Considering regulatory T cells analysis, no difference was found between the two groups at D90, D180, and D360.

Forty-six RTX patients (67%) received intravenous immunoglobulins administration compared with only 28 controls (41%) ($P = 0.003$, Table 2). After adjustment for IV-Ig infusions, Ig levels remained significantly lower at D180 and D360 after allo-SCT in the RTX group (respectively, $P = 0.001$ and $P = 0.005$, Fig. 2f).

Clinical outcomes

Clinical outcome characteristics of the pair-matched groups are summarized in Table 4.

At 2 years after time to RTX infusion, there was no statistical difference in the incidence of overall infections between RTX patients and controls (23% versus 17%, respectively; $P = 0.59$) with similar probabilities of viral infection (11% versus 10%, respectively; $P = 0.63$). In terms of GvHD, there was a trend for a lower cumulative incidence of cGvHD in the RTX group compared to the control group (30.0% versus 49.0%, respectively; $P = 0.059$), with no significant impact on the incidence of extensive cGvHD (11% versus 12%, respectively; $P = 1.0$).

At 2 years of follow-up after time to RTX infusion, the rates of RI, PFS, and OS were not statistically different between the RTX and the control groups (26% versus 17%, $P = 0.70$; 55% versus 76%, $P = 0.71$, and 59% and 82%, $P = 0.23$, respectively).

Discussion

This study aimed to assess the impact of pre-emptive RTX treatment for EBV viremia on parameters of immune recovery and on clinical outcomes after allo-SCT. The use of weekly monitoring of EBV viral loads during the first months of allo-SCT [6] and the systematic use of pre-emptive RTX in patients experiencing at least two viral loads ≥1000 copies/10^5 cells, as described by Blaes et al. [17], have shown promising results in controlling viral

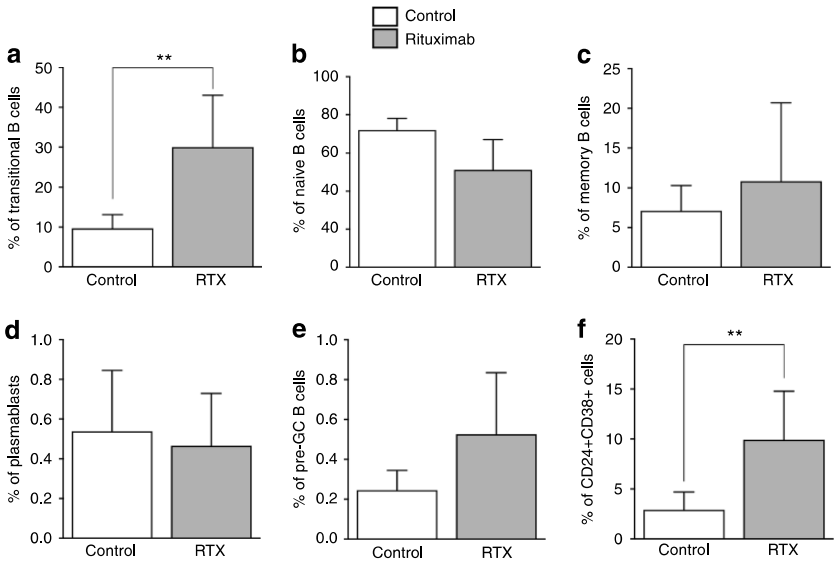

Fig. 3 B-cell subpopulations at D360 after allo-SCT. B-cell subpopulations proportions (transitional, naive, memory, plasmablast, pre-germinal center, and regulator) were quantified at 360 days after allo-SCT. Bars displaying the mean and 95% confidence intervals (error bars) of patients from the control group ($n = 13$) and RTX group ($n = 16$) are shown. *P*-values < 0.05 are represented by *, *P*-values < 0.01 by **, and *P*-values < 0.001 by ***. allo-SCT, allogeneic stem cell transplantation; RTX, rituximab

Table 4 Clinical outcome

Characteristics	Controls ($n = 69$)	RTX ($n = 69$)	*P*-value
Ig replacement after time to RTX (%)	28 (41)	46 (67)	**0.003**
Overall infection rate at M24, % (95% CI)	17 (9–26)	23 (13–34)	0.59
Viral infection rate at M24, % (95% CI)	11 (5–19)	10 (5–19)	0.63
cGvHD incidence at M24, % (95% CI)	49 (34–62)	30 (19–41)	0.059
Extensive	12 (5–22)	11 (5–20)	1
Relapse incidence at M24, % (95% CI)	17 (9–29)	26 (16–37)	0.70
Progression-free survival at M24, % (95% CI)	76 (65–87)	55 (43–68)	0.71
Overall survival at M24, % (95% CI)	82 (72–93)	59 (47–72)	0.23

CI confidence interval, *cGvHD* chronic graft-versus-host disease, *Ig* immunoglobulins, *RTX* rituximab

Bold denotes statistically significant

proliferation, and have led to a drastic reduction in EBV-related PTLD and mortality after allo-SCT [2, 7, 10, 12, 18].

Of note, the efficacy of RTX has primarily been reported in the setting of pre-emptive therapy, and only to a lesser extent once EBV-related PTLD is fully established. In our reported series, pre-emptive RTX therapy was effective in obtaining a sustained control of EBV viral load, which was observed in 95% of cases, in accordance with previously published studies. Indeed, a low incidence of EBV-PTLD (only five cases) among these 219 high-risk patients, which confirms the effective strategy of viral load of EBV-DNAemia monitoring and of pre-emptive RTX treatment in the post-transplant setting.

One should bear in mind that CD20 expression is not confined to malignant cells and that RTX is not an innocuous treatment. Indeed, B lymphopoiesis is also targeted, and neutropenia can occur after repetitive use of RTX [19]. This is illustrated in our study, where 17% of patients developed neutropenia related to RTX. We assessed the recovery of Ig, T cells, natural killer cells, and B cells after pre-emptive RTX therapy in order to clarify the potential immune deficiency and risk of infectious complications. As expected, RTX treatment was rapidly correlated to a decrease in CD19 + lymphocytes and induced delayed B-cell recovery. More precisely, patients who received RTX presented persisting CD19 + B-cell lymphopenia at least 1 year after the first administration.

After allo-SCT, the proportion of total B cells typically reach normal levels by 3 months, but the absolute numbers may take up to 6–12 months to normalize, which is further delayed in patients with GvHD [20–22]. Moreover, although the number of total B cells may reach levels comparable to adult controls, most of the reconstituting B cells in the first year after allo-SCT are comprised primarily of transitional and naive subsets, while the recovery of memory B cells occurs much later [23, 24]. In our study, phenotypical analyses at 1 year following allo-SCT revealed that a CD19 + B lymphocyte contingent was reconstituted as previously described [25, 26]. Moreover, the significantly increased proportion of transitional B cells at D360 in RTX

patients compared to controls emphasizes the delay in B-cell reconstitution after use of RTX. Studies defined an interleukin-10 producing B-cell subset, with inhibitory functions on T-cell proliferation and proinflammatory cytokine production [27], which can minimize damage caused by aGvHD and reduce the risk of cGvHD development [28–30]. These regulatory B cells were observed on both the IgM memory and transitional B-cell subsets in healthy donors and are deficient in cGvHD patients [31]. In our study, transitional B-cells and CD24 + CD38 + B-cells proportions were increased at D360 following allo-SCT in RTX patients, but the number of patients was small and the ability to produce interleukin-10 could not be assessed. As expected, the RTX-induced B-cell lymphopenia led to frequent hypogammaglobulinemia. These data are of importance when considering the delay required before initiating revaccination protocols in allografted patients.

We also assessed the impact of RTX on GvHD and clinical outcomes. B cells playing a major pathogenic role on the incidence of cGvHD [32], pre-emptive administration of RTX could reduce the rate of this late complication [33–35]. Interestingly, we found a trend towards a decreased incidence of cGvHD in RTX patients, which correlated with the dramatic and persistent decrease of B cells. It has been demonstrated in cGVHD that B cells exhibit BCR hyper-responsiveness [36, 37]. After activation, pathogenic B cells expand and are strongly affected by soluble factors in the microenvironment such as IL-4, IL-17, IL-21, and BAFF [38, 39]. However, RTX treatment did not reduce the incidence of extensive cGvHD in our study.

Opportunistic infections after RTX have been regularly reported after solid-organ transplantation, hematological malignancies or autoimmune diseases [40]. Petropoulou et al. [19] evaluated the risk of infection in patients undergoing allo-SCT, and reported an increased incidence of infection in patients receiving pre-emptive RTX for EBV reactivation. In contrast to this previous study, we did not observe statistical difference in the incidence of overall infections in patients receiving RTX and controls. One explanation could be that, in the one hand, RTX does not impact significantly T cells homeostasis and NK cells; and in the other hand, that the proportion of patients receiving Ig replacement was significantly higher in patients receiving RTX, due to hypogammaglobulinemia, which could have exerted some confounding effect with regard to the global incidence of infections in RTX patients.

It has been well established that T cells represent the main actors in the graft-versus-leukemia effect (GVL). However, AML-specific antibodies have recently been reported and may contribute to antitumor responses [41], implicating B-cell homeostasis in the GVL effect. However, we found no significant increase of the risk of relapse in RTX patients, which correlated with the long-lasting B-lymphocyte decrease and its associated hypogammaglobulinemia. In terms of outcome, RTX did not negatively impact the PFS and OS rates at 2 years following RTX treatment.

Our case series is limited by its small number of cases, its retrospective and single-center design, but it brings up three interesting questions regarding pre-emptive treatment. As expected, we found that pre-emptive RTX treatment in the setting of EBV reactivation after allo-SCT induces a delayed B-cell reconstitution but observed that this impaired immune reconstitution did not lead to higher risk of infectious diseases in our series, one possible explanation being that IV Ig substitution could avoid hypogammaglobulinemia-related infectious diseases until B cells homeostasis reconstitution. A decreased incidence of cGVHD was observed without reaching statistical significance. Considering the importance of B cells in cGVHD pathophysiology, it could be of great interest to study the effect of pre-emptive RTX on the impact of cGVHD in a larger cohort. Finally, allogeneic transplant physicians should be aware of the important incidence of acute and late RTX-related neutropenia.

Acknowledgements We acknowledge the Association for Training, Education and Research in Hematology, Immunology, and Transplantation for the generous and continuous support to the research work. This work was supported by a grant from IRGHET (International Research Group on HEmatopoietic cells Transplantation). We also thank the clinical teams who provided care for the study patients, the members of the tumor bank at Saint-Antoine Hospital and the members of the study team at the Center de Recherche Saint-Antoine for their dedication to this study.

Author contributions All authors listed on the manuscript have contributed substantially to this work: NS, ML, and EB designed the study, NS and AB collected the data, NS, FM, GB, RD, FG, AR, MM, and EB recruited the patients, ML performed the statistical analysis and NS, IB, and BG contributed the flow cytometry data. NS prepared the manuscript and figures for publication. All authors analyzed the data, reviewed the manuscript, and agreed to its submission for publication.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Curtis RE, Travis LB, Rowlings PA, Socie G, Kingma DW, Banks PM, et al. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. Blood. 1999;94:2208–16.
2. Patriarca F, Medeot M, Isola M, Battista ML, Sperotto A, Pipan C, et al. Prognostic factors and outcome of Epstein-Barr virus DNAemia in high-risk recipients of allogeneic stem cell

transplantation treated with preemptive rituximab. Transpl Infect Dis. 2013;15:259–67. https://doi.org/10.1111/tid.12061.
3. Ocheni S, Kroeger N, Zabelina T, Sobottka I, Ayuk F, Wolschke C, et al. EBV reactivation and post transplant lymphoproliferative disorders following allogeneic SCT. Bone Marrow Transpl. 2008;42:181–6. https://doi.org/10.1038/bmt.2008.150.
4. Orazi A, Hromas RA, Neiman RS, Greiner TC, Lee CH, Rubin L, et al. Posttransplantation lymphoproliferative disorders in bone marrow transplant recipients are aggressive diseases with a high incidence of adverse histologic and immunobiologic features. Am J Clin Pathol. 1997;107:419–29.
5. Paya CV, Fung JJ, Nalesnik MA, Kieff E, Green M, Gores G, et al. Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD Task Force and The Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting. Transplantation. 1999;68:1517–25.
6. Styczynski J, van der Velden W, Fox CP, Engelhard D, de la Camara R, Cordonnier C, et al. Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines. Haematologica. 2016;101:803–11. https://doi.org/10.3324/haematol.2016.144428.
7. Styczynski J, Gil L, Tridello G, Ljungman P, Donnelly JP, van der Velden W, et al. Response to rituximab-based therapy and risk factor analysis in Epstein Barr Virus-related lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplant in children and adults: a study from the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Clin Infect Dis. 2013;57:794–802. https://doi.org/10.1093/cid/cit391.
8. Heslop HE. How I treat EBV lymphoproliferation. Blood. 2009;114:4002–8. https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-143545. e-pub ahead of print 2009/09/03.
9. Xuan L, Jiang X, Sun J, Zhang Y, Huang F, Fan Z, et al. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Transplantation. 2013;96:560–6. https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31829d38af.
10. Styczynski J, Einsele H, Gil L, Ljungman P. Outcome of treatment of Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in hematopoietic stem cell recipients: a comprehensive review of reported cases. Transpl Infect Dis. 2009;11:383–92. https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2009.00411.x.
11. Sanz J, Arango M, Senent L, Jarque I, Montesinos P, Sempere A, et al. EBV-associated post-transplant lymphoproliferative disorder after umbilical cord blood transplantation in adults with hematological diseases. Bone Marrow Transpl. 2014;49:397–402. https://doi.org/10.1038/bmt.2013.190.
12. Worth A, Conyers R, Cohen J, Jagani M, Chiesa R, Rao K, et al. Pre-emptive rituximab based on viraemia and T cell reconstitution: a highly effective strategy for the prevention of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease following stem cell transplantation. Br J Haematol. 2011;155:377–85. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08855.x.
13. Garcia-Cadenas I, Castillo N, Martino R, Barba P, Esquirol A, Novelli S, et al. Impact of Epstein Barr virus-related complications after high-risk allo-SCT in the era of pre-emptive rituximab. Bone Marrow Transpl. 2015;50:579–84. https://doi.org/10.1038/bmt.2014.298.
14. D'Aveni M, Aissi-Rothe L, Venard V, Salmon A, Falenga A, Decot V, et al. The clinical value of concomitant Epstein Barr virus (EBV)-DNA load and specific immune reconstitution monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Transpl Immunol. 2011;24:224–32. https://doi.org/10.1016/j.trim.2011.03.002.
15. Nitta E, Izutsu K, Sato T, Ota Y, Takeuchi K, Kamijo A, et al. A high incidence of late-onset neutropenia following rituximab-containing chemotherapy as a primary treatment of CD20-positive B-cell lymphoma: a single-institution study. Ann Oncol. 2007;18:364–9. https://doi.org/10.1093/annonc/mdl393. e-pub ahead of print 2006/11/03.
16. Lai GG, Lim ST, Tao M, Chan A, Li H, Quek R. Late-onset neutropenia following RCHOP chemotherapy in diffuse large B-cell lymphoma. Am J Hematol. 2009;84:414–7. https://doi.org/10.1002/ajh.21420. e-pub ahead of print 2009/05/06.
17. Blaes AH, Cao Q, Wagner JE, Young JA, Weisdorf DJ, Brunstein CG. Monitoring and preemptive rituximab therapy for Epstein-Barr virus reactivation after antithymocyte globulin containing nonmyeloablative conditioning for umbilical cord blood transplantation. Biol Blood Marrow Transpl. 2010;16:287–91. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.10.008.
18. Coppoletta S, Tedone E, Galano B, Soracco M, Raiola AM, Lamparelli T, et al. Rituximab treatment for Epstein-Barr virus DNAemia after alternative-donor hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transpl. 2011;17:901–7. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.10.003.
19. Petropoulou AD, Porcher R, Peffault de Latour R, Xhaard A, Weisdorf D, Ribaud P, et al. Increased infection rate after preemptive rituximab treatment for Epstein-Barr virus reactivation after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. Transplantation. 2012;94:879–83. https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182664042. e-pub ahead of print 2012/09/25.
20. Storek J, Dawson MA, Storer B, Stevens-Ayers T, Maloney DG, Marr KA, et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. Blood. 2001;97:3380–9. e-pub ahead of print 2001/05/23.
21. Storek J, Ferrara S, Ku N, Giorgi JV, Champlin RE, Saxon A. B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? Bone Marrow Transpl. 1993;12:387–98. e-pub ahead of print 1993/10/01.
22. Small TN, Keever CA, Weiner-Fedus S, Heller G, O'Reilly RJ, Flomenberg N. B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny. Blood. 1990;76:1647–56. e-pub ahead of print 1990/10/15.
23. Burns DM, Tierney R, Shannon-Lowe C, Croudace J, Inman C, Abbotts B, et al. Memory B-cell reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is an EBV-associated transformation event. Blood. 2015;126:2665–75. https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-665000. e-pub ahead of print 2015/10/10.
24. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, Green A, Perdrix A, Boyer O, et al. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. Clin Immunol. 2008;127:14–25. https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.11.013. e-pub ahead of print 2008/01/15.
25. Storek J, Wells D, Dawson MA, Storer B, Maloney DG. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Blood. 2001;98:489–91. e-pub ahead of print 2001/07/04.
26. Bosch M, Khan FM, Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. Curr Opin Hematol. 2012;19:324–35. https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328353bc7d. e-pub ahead of print 2012/04/21.
27. Kalampokis I, Yoshizaki A, Tedder TF. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. Arthritis Res Ther. 2013;15(Suppl 1):S1. https://doi.org/10.1186/ar3907. e-pub ahead of print 2013/04/10.
28. de Masson A, Socie G, Bagot M, Bensussan A, Bouaziz JD. Deficient regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. Oncoimmunology. 2015;4:e1016707 https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1016707. e-pub ahead of print 2015/07/04.

29. de Masson A, Bouaziz JD, Le Buanec H, Robin M, O'Meara A, Parquet N, et al. CD24(hi)CD27(+) and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. Blood. 2015; 125:1830–9. https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-599159. e-pub ahead of print 2015/01/22.
30. Le Huu D, Matsushita T, Jin G, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, et al. Donor-derived regulatory B cells are important for suppression of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. Blood. 2013;121:3274–83. https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-465658. e-pub ahead of print 2013/02/21.
31. Khoder A, Sarvaria A, Alsuliman A, Chew C, Sekine T, Cooper N, et al. Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. Blood. 2014;124:2034–45. https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-571125. e-pub ahead of print 2014/07/24.
32. Zeiser R, Sarantopoulos S, Blazar BR. B-cell targeting in chronic graft-versus-host disease. Blood. 2018;131:1399–405. https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-784017. e-pub ahead of print 2018/02/14.
33. Johnston HF, Xu Y, Racine JJ, Cassady K, Ni X, Wu T, et al. Administration of anti-CD20 mAb is highly effective in preventing but ineffective in treating chronic graft-versus-host disease while preserving strong graft-versus-leukemia effects. Biol Blood Marrow Transpl. 2014;20:1089–103. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.04.028. e-pub ahead of print 2014/05/07.
34. Malard F, Labopin M, Yakoub-Agha I, Chantepie S, Guillaume T, Blaise D, et al. Rituximab-based first-line treatment of cGVHD after allogeneic SCT: results of a phase 2 study. Blood. 2017;130:2186–95. https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-786137. e-pub ahead of print 2017/09/03.
35. Cutler C, Miklos D, Kim HT, Treister N, Woo SB, Bienfang D, et al. Rituximab for steroid-refractory chronic graft-versus-host disease. Blood. 2006;108:756–62. https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-0233. e-pub ahead of print 2006/03/23.
36. Flynn R, Allen JL, Luznik L, MacDonald KP, Paz K, Alexander KA, et al. Targeting Syk-activated B cells in murine and human chronic graft-versus-host disease. Blood. 2015;125:4085–94. https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-595470. e-pub ahead of print 2015/04/09.
37. Dubovsky JA, Flynn R, Du J, Harrington BK, Zhong Y, Kaffenberger B, et al. Ibrutinib treatment ameliorates murine chronic graft-versus-host disease. J Clin Invest. 2014;124:4867–76. https://doi.org/10.1172/JCI75328. e-pub ahead of print 2014/10/02.
38. Forcade E, Paz K, Flynn R, Griesenauer B, Amet T, Li W, et al. An activated Th17-prone T cell subset involved in chronic graft-versus-host disease sensitive to pharmacological inhibition. JCI Insight. 2017;2. https://doi.org/10.1172/jci.insight.92111. e-pub ahead of print 2017/06/15.
39. Young JS, Wu T, Chen Y, Zhao D, Liu H, Yi T, et al. Donor B cells in transplants augment clonal expansion and survival of pathogenic CD4+ T cells that mediate autoimmune-like chronic graft-versus-host disease. J Immunol. 2012;189:222–33. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200677. e-pub ahead of print 2012/06/01.
40. Mikulska M, Lanini S, Gudiol C, Drgona L, Ippolito G, Fernandez-Ruiz M, et al. ESCMID Study Group for Infections in Compromised Hosts (ESGICH) Consensus Document on the safety of targeted and biological therapies: an infectious diseases perspective (Agents targeting lymphoid cells surface antigens [I]: CD19, CD20 and CD52). Clin Microbiol Infect. 2018;24(Suppl 2):S71–82. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.02.003. e-pub ahead of print 2018/02/16.
41. Gillissen MA, Kedde M, Jong G, Moiset G, Yasuda E, Levie SE, et al. AML-specific cytotoxic antibodies in patients with durable graft-versus-leukemia responses. Blood. 2018;131:131–43. https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-768762. e-pub ahead of print 2017/10/25.

DISCUSSION

La qualité de la reconstitution immunitaire est essentielle au contrôle antitumoral, au contrôle des complications infectieuses et donc à la survie des patients après Allo-CSH [19]. Ainsi, le retard à la reconstitution de l'immunité après Allo-CSH s'associe à une augmentation significative de l'incidences de rechute [307], d'infections [308] et donc de NRM [307,309]

Dans le contexte de l'Allo-CSH avec PTCy, les études de la reconstitution immunitaire se sont principalement concentrées sur les lymphocytes T α/β [310-312]. Chez l'homme, Kanakry *et al.* ont rapporté une reconstitution normale des lymphocytes T $CD4^+$, $CD8^+$ et $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ après Allo-CSH avec utilisation de greffons de moelle osseuse et d'une prophylaxie de la GvHD par PTCy seul [310]. D'autre part, il a été démontré que la séropositivité au CMV pouvait influencer la reconstitution des lymphocytes T et la diversité des récepteurs T α/β dans ce contexte [312]. Les données sont en revanche plus rares concernant les lymphocytes T γ/δ. Retiere *et al.* ont récemment rapporté que l'utilisation du PTCy s'associait à une diminution des lymphocytes T γ/δ tôt après l'Allo-CSH en comparaison à l'ATG (et inversement pour les lymphocytes T α/β) [313].

Notre première étude apporte donc un regard nouveau sur la reconstitution des lymphocytes T γ/δ et son impact sur l'augmentation de la charge virale EBV après Haplo-CSH avec utilisation de greffons de CSP et d'une prophylaxie de la GvHD par PTCy. L'administration conjointe de PTCy et d'ATG à faible dose engendrait une lymphopénie précoce et profonde : à J20, toutes les populations de lymphocytes étudiées étaient significativement diminuées par rapport aux patients recevant de l'ATG seul. Ensuite, les lymphocytes T α/β $CD4^+$ et $CD8^+$ augmentaient progressivement et, à J30, atteignaient des taux similaires à ceux des patients recevant de l'ATG seul, comme précédemment décrit [313]. En revanche, les lymphocytes T γ/δ et $V\delta2^+$ avaient une reconstitution lente et significativement retardée chez les patients recevant du PTCy, avec un

nombre médian de lymphocytes T Vδ2$^+$ significativement plus faible jusqu'à un an après Haplo-CSH.

Étant donné l'impact du PTCy sur les fonctions et la viabilité des lymphocytes T alloréactifs en prolifération [314], nous avons évalué l'effet du PTCy sur la prolifération des différentes populations lymphocytaires T afin d'éclaircir le mécanisme du déficit observé en lymphocytes T γ/δ. De manière intéressante, les proportions de lymphocytes T CD8$^+$, γ/δ et Vδ2$^+$ en prolifération à J3 après Allo-CSH (soit avant administration du PTCy) étaient élevées et comparables à celles des patients recevant de l'ATG seul. Après administration du PTCy, nous avons observé l'impact délétère du PTCy sur la prolifération de ces lymphocytes ; qui n'était pas affectée dans le groupe sans PTCy. Néanmoins, alors que les lymphocytes T CD8$^+$ atteignaient rapidement un nombre médian comparable, le nombre de lymphocytes T γ/δ restait significativement inférieur (jusqu'à un an pour les lymphocytes T Vδ2$^+$) après Haplo-CSH.

Il a été décrit que l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), mécanisme principal de résistance au cyclophosphamide, permettait aux lymphocytes T régulateurs de résister à l'effet du PTCy [310]. Nous avons donc évalué si l'impact délétère du PTCy sur les lymphocytes T CD8$^+$, γ/δ et Vδ2$^+$ pouvait être lié à une faible expression de l'ALDH au sein de ces cellules, mais nous n'avons pas observé de différence d'expression entre les cellules des greffons. Nous avons donc émis l'hypothèse que la différence de taille du pool des lymphocytes T CD8$^+$ et γ/δ dans les greffons de CSP pouvait expliquer la différence de reconstitution immunitaire. En effet, nous avions précédemment montré que les greffons de PBSC contenaient plus de 10 fois moins de cellules T γ/δ que de lymphocytes T CD8$^+$ [315].

Une méta-analyse a récemment rapporté que des valeurs élevées de lymphocytes T γ/δ après Allo-CSH étaient associées à des incidences inférieures de rechute, d'infections et une augmentation de la survie sans maladie et de la survie globale [316]. Pourtant, malgré un retard significatif de reconstitution des lymphocytes T γ/δ chez les patients recevant une Haplo-CSH

avec du PTCy et de l'ATG, nous n'avons observé aucune différence dans l'incidence des rechutes, la survie globale et la survie sans-progression entre les groupes ; ce qui suggère que les lymphocytes T γ/δ ne sont pas cruciaux pour le contrôle de la maladie dans ce contexte.

En revanche, comme précédemment décrit [317], l'incidence des augmentations de la charge virale EBV était significativement supérieure chez les patients recevant une Haplo-CSH avec de l'ATG à faible dose et du PTCy en comparaison aux patients avec un donneur HLA-compatible et recevant uniquement de l'ATG à faible dose (61% contre 34% ; P = 0,02). De plus, en analyse multivariée, l'impact du PTCy était effacé par le faible nombre de lymphocytes T γ/δ à J30, qui restait le seul paramètre associé à une incidence élevée d'augmentation de la charge virale EBV [HR, 0,34 (0,15-0,76), P = 0,009]. Ce résultat est en accord avec les observations précédentes qui décrivaient une corrélation entre la récupération des lymphocytes T $V\delta2^+$ (ou CD4/CD8 double-négatif) et la survenue d'une augmentation de la charge virale EBV dans le cadre de l'Haplo-CSH avec ATG à haute dose (protocole GIAC) [23,24].

La manipulation des greffons de PBSC (fondée sur un tri des lymphocytes T $V\delta2^+$, une culture *ex vivo* sous bisphosphonates [23], puis une administration retardée de ces lymphocytes T $V\delta2^+$ autologues) pourrait ainsi être une thérapie cellulaire prometteuse en prophylaxie de l'augmentation de la charge virale EBV dans le contexte de l'Haplo-CSH avec PTCy.

En parallèle, nous avons voulu évaluer l'impact d'un traitement préemptif par rituximab de l'augmentation de la charge virale EBV sur la reconstitution immunitaire et les évènements cliniques après Allo-CSH.

En effet, la surveillance hebdomadaire des charges virales sanguines d'EBV pendant les premiers mois post-Allo-CSH [14] et l'utilisation systématique de rituximab préemptif dès obtention d'au moins deux charges virales ≥ 1000 copies / 10^5 cellules (décrit par Blaes *et al.* [286]), ont permis un contrôle prometteur de la prolifération virale et une réduction drastique de l'incidence des lymphoproliférations (PTLD) liées à l'EBV ; et *in fine* de la mortalité après

Allo-CSH [262,283-285,287]. Dans notre série, le traitement préemptif par rituximab a permis d'obtenir un contrôle prolongé de la charge virale EBV dans 95% des cas, conformément aux données de la littérature, tandis que le faible nombre de PTLD liés à l'EBV (5 cas) dans notre population à haut risque confirme l'efficacité du monitoring de la charge virale EBV et du traitement préemptif par rituximab dans ce contexte.

L'expression du CD20 n'étant pas limitée aux seules cellules malignes, le rituximab cible la lymphopoïèse B et une neutropénie peut également survenir après l'administration répétée de cet anticorps [318]. Ainsi, 17% des patients ont développé une neutropénie liée au rituximab dans notre étude. Nous avons évalué la reconstitution des lymphocytes T, des lymphocytes NK, des lymphocytes B et des immunoglobulines sous traitement préventif par rituximab afin de mieux identifier le déficit immunitaire induit et le risque associé de complications infectieuses.
De manière prévisible, le traitement était corrélé à une diminution rapide des lymphocytes $CD19^+$ et induisait une récupération retardée des lymphocytes B (persistance d'une lymphopénie B $CD19^+$ au moins un an après la première administration de rituximab).

Les analyses phénotypiques réalisées à un an après la greffe ont révélé qu'un contingent de lymphocytes B $CD19^+$ se reconstituait comme décrit dans la littérature [19,129]. Ainsi, après Allo-CSH, la proportion de lymphocytes B totaux atteint généralement des valeurs physiologiques après 3 mois, mais les valeurs absolues peuvent nécessiter 6 à 12 mois pour se normaliser ; voire plus chez les patients atteints de GvHD [151,165,319]. De plus, bien que le nombre de lymphocytes B totaux puisse atteindre des niveaux comparables à ceux des témoins adultes, la plupart des lymphocytes B reconstitués la première année après Allo-CSH sont principalement des populations transitionnelles et naïves, tandis que la récupération des lymphocytes B mémoires est plus tardive [147,320]. Après traitement par rituximab, une augmentation significative de la proportion de formes transitionnelles à J360 soulignait le retard de reconstitution des populations lymphocytaires B.

Certaines études ont décrit une population de lymphocytes B régulatrice, sécrétrice d'interleukine-10, capable d'inhiber la prolifération lymphocytaire T et la production de cytokines proinflammatoires [321]. Cette population pourrait minimiser les dommages de la GvHD aiguë et réduire le risque de développer une GvHD chronique [96,97,322]. Ces lymphocytes B aux fonctions régulatrices ont été observés dans les populations de lymphocytes B mémoires IgM et de lymphocytes B transitionnels chez les donneurs sains et sont déficients chez les patients atteints de GvHD chronique [95]. Dans notre étude, les proportions de lymphocytes B transitionnels et de lymphocytes B $CD24^{+}CD38^{+}$ étaient augmentées à J360 après Allo-CSH chez les patients ayant reçu du rituximab. Malheureusement, le nombre de patients était faible et nous n'avons pas pu évaluer la capacité de ces cellules à produire de l'interleukine-10.
De manière attendue, la lymphopénie B induite par le rituximab engendrait des hypogammaglobulinémies fréquentes, à prendre en considération au moment d'entreprendre les protocoles de re-vaccination des patients allogreffés.

Nous avons également évalué l'impact du rituximab sur l'incidence de la GvHD et les autres évènements cliniques post-greffe. Les lymphocytes B jouant un rôle important dans la pathogénèse de la GvHD chronique [323], l'administration préemptive du rituximab pourrait réduire l'incidence de cette complication tardive [324-326]. De manière intéressante, nous avons observé une tendance à la diminution de l'incidence de GvHD chronique après rituximab, en lien avec la diminution spectaculaire et persistante des lymphocytes B. Lors de la GvHD chronique, il a été démontré que les lymphocytes B présentaient un BCR hyper-réactif [327,328]. Ainsi, après leur activation, les lymphocytes B pathogènes se développent et sont fortement affectés par les facteurs solubles du microenvironnement tels que l'IL-4, l'IL-17, l'IL-21 et le BAFF [329,330]. Cependant, nous n'avons pas observé de réduction de l'incidence de la forme extensive de la GvHD chronique après rituximab dans notre étude.

Des infections opportunistes sont régulièrement rapportées après rituximab dans le contexte de transplantations d'organes solides, d'hémopathies malignes ou de maladies auto-immunes [331].

Petropoulou *et al.* avaient évalué le risque d'infection chez les patients allogreffés et rapporté une augmentation du risque infectieux après traitement préemptif par rituximab pour une augmentation de la charge virale EBV [318]. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les incidences d'infections des patients traités par rituximab et des témoins. Cependant, la proportion de patients recevant une supplémentation intraveineuse par immunoglobulines polyvalentes était significativement supérieure chez les patients recevant du rituximab (en lien avec l'hypogammaglobulinémie fréquente), ce qui pourrait influencer l'incidence des infections.

S'il est bien établi que les lymphocytes T sont les principaux acteurs de l'effet GvL, des anticorps spécifiques ont récemment été décrits dans le contexte des leucémies aiguës myéloïdes et contribuerait à la réponse antitumorale, en impliquant l'homéostasie lymphocytaire B, dans l'effet GvL [332]. Cependant, aucune augmentation significative du risque de rechute n'était observée chez les patients traités par rituximab, en dépit de la diminution durable des taux de lymphocytes B et des hypogammaglobulinémies associées. En sus, le traitement préemptif n'impactait pas négativement la survie des patients, en comparaison aux patients témoins.

Nous avons donc observé un retard de reconstitution des lymphocytes B et une incidence non négligeable de neutropénie aigue et tardive après traitement préventif par rituximab suite à l'augmentation de la charge virale EBV chez les patients allogreffés. En revanche, ces altérations n'entraînaient pas d'augmentation du risque de complications infectieuses et n'impactaient pas négativement la survie des patients.

La neutropénie est un effet indésirable classique et attendu, survenant chez 3 à 27% des patients à distance d'un traitement par rituximab [333]. En accord avec ces données, nous avons observé des populations neutrophiles circulantes significativement plus faibles à J90 et J180 après traitement par rituximab, en comparaison aux patients contrôles.

Ces résultats nous ont conduit à étudier les corrélations biologiques entre la reconstitution de la lignée granuleuse et celle des lymphocytes B chez ces patients ainsi que le rôle de la cytokine CXCL12/SDF1 dans ce contexte. Cette cytokine joue en effet un rôle majeur dans la circulation sanguine des neutrophiles depuis leur site de maturation médullaire, mais également dans la différenciation précoce des progéniteurs lymphocytaires B [334-336].

Nos résultats préliminaires, montrant des taux importants de CXCL12 en périphérie, suggèrent une production abondante par le microenvironnement médullaire des patients allo-CSH, dans les premiers mois après l'allogreffe d'une part ; et que les neutropénies observées après traitement préemptif par rituximab pourraient être une conséquence directe d'une perturbation de l'homéostasie CXCL12 d'une part, mais également une conséquence d'une utilisation prioritaire de cette cytokine au profit de la reconstitution lymphocytaire B.

Au total, ces travaux de recherche sur la reconstitution immunitaire révèlent des effets immunomodulateurs méconnus de différentes stratégies thérapeutiques après Allo-CSH.
En effet, si les résultats du PTCy en prophylaxie de la GvHD aigüe après Haplo-CSH et de l'administration préemptive de rituximab après infection EBV d'autre part sont indiscutables ; une meilleure connaissance des effets directs sur les effecteurs immunitaires reste nécessaire pour en limiter la toxicité et en optimiser les usages.

REFERENCES

1. Kanakry CG, Fuchs EJ, Luznik L. Modern approaches to HLA-haploidentical blood or marrow transplantation. Nat Rev Clin Oncol 2016;13:132.

2. Lorentino F, Labopin M, Fleischhauer K, et al. The impact of HLA matching on outcomes of unmanipulated haploidentical HSCT is modulated by GVHD prophylaxis. Blood Adv 2017;1:669-80.

3. Ruggeri A, Sun Y, Labopin M, et al. Post-transplant cyclophosphamide versus anti-thymocyte globulin as graft- versus-host disease prophylaxis in haploidentical transplant. Haematologica 2017;102:401-10.

4. Law AD, Salas MQ, Lam W, et al. Reduced-Intensity Conditioning and Dual T Lymphocyte Suppression with Antithymocyte Globulin and Post-Transplant Cyclophosphamide as Graft-versus-Host Disease Prophylaxis in Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplants for Hematological Malignancies. Biol Blood Marrow Transplant 2018;24:2259-64.

5. Dreger P, Sureda A, Ahn KW, et al. PTCy-based haploidentical vs matched related or unrelated donor reduced-intensity conditioning transplant for DLBCL. Blood Adv 2019;3:360-9.

6. Ahmed S, Kanakry JA, Ahn KW, et al. Lower Graft-versus-Host Disease and Relapse Risk in Post-Transplant Cyclophosphamide-Based Haploidentical versus Matched Sibling Donor Reduced-Intensity Conditioning Transplant for Hodgkin Lymphoma. Biol Blood Marrow Transplant 2019.

7. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, et al. Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. Bone Marrow Transplant 2015;50:476-82.

8. Wachsmuth LP, Patterson MT, Eckhaus MA, Venzon DJ, Gress RE, Kanakry CG. Post-transplantation cyclophosphamide prevents graft-versus-host disease by inducing alloreactive T cell dysfunction and suppression. J Clin Invest 2019;130:2357-73.

9. Mohty R, Brissot E, Battipaglia G, et al. Infectious complications after post-transplantation cyclophosphamide and anti-thymocyte globulin-based haploidentical stem cell transplantation. Br J Haematol 2019.

10. Crocchiolo R, Bramanti S, Vai A, et al. Infections after T-replete haploidentical transplantation and high-dose cyclophosphamide as graft-versus-host disease prophylaxis. Transpl Infect Dis 2015;17:242-9.

11. Slade M, Goldsmith S, Romee R, et al. Epidemiology of infections following haploidentical peripheral blood hematopoietic cell transplantation. Transpl Infect Dis 2017;19.

12. Tischer J, Engel N, Fritsch S, et al. Virus infection in HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: incidence in the context of immune recovery in two different transplantation settings. Ann Hematol 2015;94:1677-88.

13. Xuan L, Jiang X, Sun J, et al. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Transplantation 2013;96:560-6.

14. Styczynski J, van der Velden W, Fox CP, et al. Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines. Haematologica 2016;101:803-11.

15. De Paoli P, Gennari D, Martelli P, Cavarzerani V, Comoretto R, Santini G. Gamma delta T cell receptor-bearing lymphocytes during Epstein-Barr virus infection. J Infect Dis 1990;161:1013-6.

16. Xiang Z, Liu Y, Zheng J, et al. Targeted activation of human Vgamma9Vdelta2-T cells controls epstein-barr virus-induced B cell lymphoproliferative disease. Cancer Cell 2014;26:565-76.

17. Urban EM, Chapoval AI, Pauza CD. Repertoire development and the control of cytotoxic/effector function in human gammadelta T cells. Clin Dev Immunol 2010;2010:732893.

18. Ravens S, Schultze-Florey C, Raha S, et al. Human gammadelta T cells are quickly reconstituted after stem-cell transplantation and show adaptive clonal expansion in response to viral infection. Nat Immunol 2017;18:393-401.

19. Bosch M, Khan FM, Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. Curr Opin Hematol 2012;19:324-35.

20. Silva-Santos B, Mensurado S, Coffelt SB. gammadelta T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer. Nat Rev Cancer 2019.

21. Willcox CR, Davey MS, Willcox BE. Development and Selection of the Human Vgamma9Vdelta2(+) T-Cell Repertoire. Front Immunol 2018;9:1501.

22. Farnault L, Gertner-Dardenne J, Gondois-Rey F, et al. Clinical evidence implicating gamma-delta T cells in EBV control following cord blood transplantation. Bone Marrow Transplant 2013;48:1478-9.

23. Bian Z, Liu J, Xu LP, et al. Association of Epstein-Barr virus reactivation with the recovery of CD4/CD8 double-negative T lymphocytes after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant 2017;52:264-9.

24. Liu J, Bian Z, Wang X, et al. Inverse correlation of Vdelta2(+) T-cell recovery with EBV reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. Br J Haematol 2018;180:276-85.

25. Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, et al. The EBMT activity survey on hematopoietic-cell transplantation and cellular therapy 2018: CAR-T's come into focus. Bone Marrow Transplant 2020;55:1604-13.

26. Jacobson LO, Marks EK, et al. The role of the spleen in radiation injury. Proc Soc Exp Biol Med 1949;70:740-2.

27. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Eldredge JH. Recovery from radiation injury. Science 1951;113:510-11.

28. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Robson MJ, Bethard WF, Gaston EO. The role of the spleen in radiation injury and recovery. J Lab Clin Med 1950;35:746-70.

29. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. J Natl Cancer Inst 1951;12:197-201.

30. Nowell PC, Cole LJ, Habermeyer JG, Roan PL. Growth and continued function of rat marrow cells in x-radiated mice. Cancer Res 1956;16:258-61.

31. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. Nature 1956;177:452-4.

32. Mathe G, Jammet H, Pendic B, et al. [Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation]. Rev Fr Etud Clin Biol 1959;4:226-38.

33. Thomas ED, Ferrebee JW. Irradiation and marrow transplantation: studies in Cooperstown. Lancet 1960;1:1289-90.

34. Beilby JO, Cade IS, Jelliffe AM, Parkin DM, Stewart JW. Prolonged survival of a bone-marrow graft resulting in a blood-group chimera. Br Med J 1960;1:96-9.

35. Ferrebee JW, Thomas ED. Present status of bone marrow transplantation. Pediatr Clin North Am 1962;9:851-3.

36. Thomas ED, Ferrebee JW. Transplanation of marrow and whole organs: experiences and comments. Can Med Assoc J 1962;86:435-44.

37. Little MT, Storb R. History of haematopoietic stem-cell transplantation. Nat Rev Cancer 2002;2:231-8.

38. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. Harvey Lect 1966;62:21-78.

39. Sackstein R. A revision of Billingham's tenets: the central role of lymphocyte migration in acute graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant 2006;12:2-8.

40. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies]. Acta Haematol 1958;20:156-66.

41. Storb R, Epstein RB, Graham TC, Thomas ED. Methotrexate regimens for control of graft-versus-host disease in dogs with allogeneic marrow grafts. Transplantation 1970;9:240-6.

42. Deeg HJ, Storb R, Weiden PL, et al. Cyclosporin A and methotrexate in canine marrow transplantation: engraftment, graft-versus-host disease, and induction of intolerance. Transplantation 1982;34:30-5.

43. Sullivan KM, Weiden PL, Storb R, et al. Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. Blood 1989;73:1720-8.

44. Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED, Seattle Marrow Transplant T. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. N Engl J Med 1981;304:1529-33.

45. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. N Engl J Med 1979;300:1068-73.

46. 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;321:1174-8.

47. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, et al. Use of haploidentical stem cell transplantation continues to increase: the 2015 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report. Bone Marrow Transplant 2017;52:811-7.

48. Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. N Engl J Med 2007;357:1472-5.

49. Barnes DW, Loutit JF. Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II. Br J Haematol 1957;3:241-52.

50. 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;2:626-7.

51. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. Blood 1990;76:2462-5.

52. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. Blood 1995;86:2041-50.

53. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. Blood 1990;75:555-62.

54. Riddell SR, Berger C, Murata M, Randolph S, Warren EH. The graft versus leukemia response after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood Rev 2003;17:153-62.

55. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. Nat Rev Cancer 2004;4:371-80.

56. Miklos DB, Kim HT, Miller KH, et al. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. Blood 2005;105:2973-8.

57. Ljungman P, Bregni M, Brune M, et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. Bone Marrow Transplant 2010;45:219-34.

58. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. N Engl J Med 2000;343:702-9.

59. Klein J, Sato A. The HLA system. Second of two parts. N Engl J Med 2000;343:782-6.

60. Andersson BS, de Lima M, Thall PF, et al. Once daily i.v. busulfan and fludarabine (i.v. Bu-Flu) compares favorably with i.v. busulfan and cyclophosphamide (i.v. BuCy2) as pretransplant conditioning therapy in AML/MDS. Biol Blood Marrow Transplant 2008;14:672-84.

61. Alatrash G, de Lima M, Hamerschlak N, et al. Myeloablative reduced-toxicity i.v. busulfan-fludarabine and allogeneic hematopoietic stem cell transplant for patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome in the sixth through eighth decades of life. Biol Blood Marrow Transplant 2011;17:1490-6.

62. Rambaldi A, Grassi A, Masciulli A, et al. Busulfan plus cyclophosphamide versus busulfan plus fludarabine as a preparative regimen for allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation in patients with acute myeloid leukaemia: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol 2015;16:1525-36.

63. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. Biol Blood Marrow Transplant 2005;11:945-56.

64. Akpek G, Lee SJ, Flowers ME, et al. Performance of a new clinical grading system for chronic graft-versus-host disease: a multicenter study. Blood 2003;102:802-9.

65. Akpek G, Zahurak ML, Piantadosi S, et al. Development of a prognostic model for grading chronic graft-versus-host disease. Blood 2001;97:1219-26.

66. Reddy P, Ferrara JL. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. Blood Rev 2003;17:187-94.

67. Socie G, Schmoor C, Bethge WA, et al. Chronic graft-versus-host disease: long-term results from a randomized trial on graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin ATG-Fresenius. Blood 2011;117:6375-82.

68. Carpenter PA. How I conduct a comprehensive chronic graft-versus-host disease assessment. Blood 2011;118:2679-87.

69. Arora M, Nagaraj S, Witte J, et al. New classification of chronic GVHD: added clarity from the consensus diagnoses. Bone Marrow Transplant 2009;43:149-53.

70. Lee SJ, Vogelsang G, Flowers ME. Chronic graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant 2003;9:215-33.

71. 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;69:204-17.

72. Lee SJ. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. Blood 2017;129:30-7.

73. Arora M, Klein JP, Weisdorf DJ, et al. Chronic GVHD risk score: a Center for International Blood and Marrow Transplant Research analysis. Blood 2011;117:6714-20.

74. Grube M, Holler E, Weber D, Holler B, Herr W, Wolff D. Risk Factors and Outcome of Chronic Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation-Results from a Single-Center Observational Study. Biol Blood Marrow Transplant 2016;22:1781-91.

75. Lazaryan A, Weisdorf DJ, DeFor T, et al. Risk Factors for Acute and Chronic Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation with Umbilical Cord Blood and Matched Sibling Donors. Biol Blood Marrow Transplant 2016;22:134-40.

76. Pavletic S, Vogelsand GB. Treatment of high-risk chronic GVHD. Biol Blood Marrow Transplant 2008;14:1436-7.

77. Randolph SS, Gooley TA, Warren EH, Appelbaum FR, Riddell SR. Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. Blood 2004;103:347-52.

78. Remberger M, Kumlien G, Aschan J, et al. Risk factors for moderate-to-severe chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2002;8:674-82.

79. Kollman C, Howe CW, Anasetti C, et al. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. Blood 2001;98:2043-51.

80. Atkinson K, Horowitz MM, Gale RP, et al. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. Blood 1990;75:2459-64.

81. Mohty M, Kuentz M, Michallet M, et al. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation: long-term results of a randomized study. Blood 2002;100:3128-34.

82. Finke J, Schmoor C, Bethge WA, et al. Long-term outcomes after standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-human-T-lymphocyte immunoglobulin in haemopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: final results of a randomised controlled trial. Lancet Haematol 2017;4:e293-e301.

83. Mohty M, Apperley JF. Long-term physiological side effects after allogeneic bone marrow transplantation. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2010;2010:229-36.

84. Syrjala KL, Langer SL, Abrams JR, et al. Recovery and long-term function after hematopoietic cell transplantation for leukemia or lymphoma. JAMA 2004;291:2335-43.

85. 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;10:855-64.

86. 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 2006;12:560-5.

87. Mohty M, Bacigalupo A, Saliba F, Zuckermann A, Morelon E, Lebranchu Y. New directions for rabbit antithymocyte globulin (Thymoglobulin((R))) in solid organ transplants, stem cell transplants and autoimmunity. Drugs 2014;74:1605-34.

88. Rubio MT, Labopin M, Blaise D, et al. The impact of graft-versus-host disease prophylaxis in reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplant in acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Haematologica 2015;100:683-9.

89. Socie G, Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. Blood 2014;124:374-84.

90. Kuzmina Z, Krenn K, Petkov V, et al. CD19(+)CD21(low) B cells and patients at risk for NIH-defined chronic graft-versus-host disease with bronchiolitis obliterans syndrome. Blood 2013;121:1886-95.

91. Saadoun D, Terrier B, Bannock J, et al. Expansion of autoreactive unresponsive CD21-/low B cells in Sjogren's syndrome-associated lymphoproliferation. Arthritis Rheum 2013;65:1085-96.

92. Moins-Teisserenc H, Busson M, Herda A, et al. CD19+CD5+ B cells and B1-like cells following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2013;19:988-91.

93. Allen JL, Tata PV, Fore MS, et al. Increased BCR responsiveness in B cells from patients with chronic GVHD. Blood 2014;123:2108-15.

94. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, et al. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. Blood 2009;113:3865-74.

95. Khoder A, Sarvaria A, Alsuliman A, et al. Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. Blood 2014;124:2034-45.

96. de Masson A, Bouaziz JD, Le Buanec H, et al. CD24(hi)CD27(+) and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. Blood 2015;125:1830-9.

97. de Masson A, Socie G, Bagot M, Bensussan A, Bouaziz JD. Deficient regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. Oncoimmunology 2015;4:e1016707.

98. Arai S, Sahaf B, Narasimhan B, et al. Prophylactic rituximab after allogeneic transplantation decreases B-cell alloimmunity with low chronic GVHD incidence. Blood 2012;119:6145-54.

99. Flowers ME, Martin PJ. How we treat chronic graft-versus-host disease. Blood 2015;125:606-15.

100. Akpek G, Lee SM, Anders V, Vogelsang GB. A high-dose pulse steroid regimen for controlling active chronic graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant 2001;7:495-502.

101. Calore E, Marson P, Pillon M, et al. Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease in Childhood with Extracorporeal Photochemotherapy/Photopheresis: The Padova Experience. Biol Blood Marrow Transplant 2015;21:1963-72.

102. Messina C, Locatelli F, Lanino E, et al. Extracorporeal photochemotherapy for paediatric patients with graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. Br J Haematol 2003;122:118-27.

103. Baird K, Wayne AS. Extracorporeal photo-apheresis for the treatment of steroid-resistant graft versus host disease. Transfus Apher Sci 2009;41:209-16.

104. Reddy P. Extracorporeal photo-chemotherapy for graft-versus-host disease. Haematologica 2005;90:1013B.

105. Martin PJ, Storer BE, Rowley SD, et al. Evaluation of mycophenolate mofetil for initial treatment of chronic graft-versus-host disease. Blood 2009;113:5074-82.

106. Solomon SR, Sizemore CA, Ridgeway M, et al. Corticosteroid-Free Primary Treatment of Chronic Extensive Graft-versus-Host Disease Incorporating Rituximab. Biol Blood Marrow Transplant 2015;21:1576-82.

107. Kharfan-Dabaja MA, Cutler CS. Rituximab for prevention and treatment of graft-versus-host disease. Int J Hematol 2011;93:578-85.

108. Olivieri J, Coluzzi S, Attolico I, Olivieri A. Tirosin kinase inhibitors in chronic graft versus host disease: from bench to bedside. ScientificWorldJournal 2011;11:1908-31.

109. Storek J. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation - its relation to the contents of the graft. Expert Opin Biol Ther 2008;8:583-97.

110. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. Blood 2010;115:3861-8.

111. Danby R, Rocha V. Improving engraftment and immune reconstitution in umbilical cord blood transplantation. Front Immunol 2014;5:68.

112. Martin PS, Li S, Nikiforow S, et al. Infused total nucleated cell dose is a better predictor of transplant outcomes than CD34+ cell number in reduced-intensity mobilized peripheral blood allogeneic hematopoietic cell transplantation. Haematologica 2016;101:499-505.

113. Remberger M, Torlen J, Ringden O, et al. Effect of Total Nucleated and CD34(+) Cell Dose on Outcome after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2015;21:889-93.

114. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. Biol Blood Marrow Transplant 2009;15:1143-238.

115. Fry TJ, Mackall CL. Immune reconstitution following hematopoietic progenitor cell transplantation: challenges for the future. Bone Marrow Transplant 2005;35 Suppl 1:S53-7.

116. Huttunen P, Taskinen M, Siitonen S, Saarinen-Pihkala UM. Impact of very early CD4(+) /CD8(+) T cell counts on the occurrence of acute graft-versus-host disease and NK cell counts on outcome after pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Pediatr Blood Cancer 2015;62:522-8.

117. Heining C, Spyridonidis A, Bernhardt E, et al. Lymphocyte reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective study including 148 patients. Bone Marrow Transplant 2007;39:613-22.

118. Toubert A, Glauzy S, Douay C, Clave E. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again. Tissue Antigens 2012;79:83-9.

119. Clave E, Busson M, Douay C, et al. Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood 2009;113:6477-84.

120. Luo XH, Chang YJ, Huang XJ. Improving cytomegalovirus-specific T cell reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. J Immunol Res 2014;2014:631951.

121. Hakim FT, Memon SA, Cepeda R, et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. J Clin Invest 2005;115:930-9.

122. Mackall C, Fry T, Gress R, et al. Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery. Bone Marrow Transplant 2009;44:457-62.

123. Fujimaki K, Maruta A, Yoshida M, et al. Immune reconstitution assessed during five years after allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 2001;27:1275-81.

124. Le RQ, Melenhorst JJ, Battiwalla M, et al. Evolution of the donor T-cell repertoire in recipients in the second decade after allogeneic stem cell transplantation. Blood 2011;117:5250-6.

125. Bolotin E, Smogorzewska M, Smith S, Widmer M, Weinberg K. Enhancement of thymopoiesis after bone marrow transplant by in vivo interleukin-7. Blood 1996;88:1887-94.

126. Guimond M, Fry TJ, Mackall CL. Cytokine signals in T-cell homeostasis. J Immunother 2005;28:289-94.

127. van Heijst JW, Ceberio I, Lipuma LB, et al. Quantitative assessment of T cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation. Nat Med 2013;19:372-7.

128. Yew PY, Alachkar H, Yamaguchi R, et al. Quantitative characterization of T-cell repertoire in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. Bone Marrow Transplant 2015;50:1227-34.

129. Storek J, Wells D, Dawson MA, Storer B, Maloney DG. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Blood 2001;98:489-91.

130. Storek J, Geddes M, Khan F, et al. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. Semin Immunopathol 2008;30:425-37.

131. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. Eur J Immunol 2013;43:2797-809.

132. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. Nat Rev Immunol 2003;3:867-78.

133. Smith CJ, Quinn M, Snyder CM. CMV-Specific CD8 T Cell Differentiation and Localization: Implications for Adoptive Therapies. Front Immunol 2016;7:352.

134. Edinger M, Hoffmann P. Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences. Curr Opin Immunol 2011;23:679-84.

135. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. Nat Med 2003;9:1144-50.

136. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. Blood 2011;117:1061-70.

137. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. Blood 2011;117:3921-8.

138. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. Nat Immunol 2005;6:331-7.

139. Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. Nat Immunol 2009;10:689-95.

140. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. Cell 2008;133:775-87.

141. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 2003;299:1057-61.

142. Cobbold SP, Castejon R, Adams E, et al. Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. J Immunol 2004;172:6003-10.

143. Baron U, Floess S, Wieczorek G, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. Eur J Immunol 2007;37:2378-89.

144. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. Nature 2010;463:808-12.

145. Park BG, Park CJ, Jang S, et al. Reconstitution of lymphocyte subpopulations after hematopoietic stem cell transplantation: comparison of hematologic malignancies and donor types in event-free patients. Leuk Res 2015;39:1334-41.

146. Williams KM, Gress RE. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. Best Pract Res Clin Haematol 2008;21:579-96.

147. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, et al. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. Clin Immunol 2008;127:14-25.

148. Suryani S, Fulcher DA, Santner-Nanan B, et al. Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. Blood 2010;115:519-29.

149. Corre E, Carmagnat M, Busson M, et al. Long-term immune deficiency after allogeneic stem cell transplantation: B-cell deficiency is associated with late infections. Haematologica 2010;95:1025-9.

150. Storek J, Saxon A. Reconstitution of B cell immunity following bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1992;9:395-408.

151. Storek J, Ferrara S, Ku N, Giorgi JV, Champlin RE, Saxon A. B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? Bone Marrow Transplant 1993;12:387-98.

152. Lee J, Kuchen S, Fischer R, Chang S, Lipsky PE. Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population. J Immunol 2009;182:4116-26.

153. Glas AM, van Montfort EH, Storek J, et al. B-cell-autonomous somatic mutation deficit following bone marrow transplant. Blood 2000;96:1064-9.

154. Omazic B, Lundkvist I, Mattsson J, Permert J, Nasman-Bjork I. Memory B lymphocytes determine repertoire oligoclonality early after haematopoietic stem cell transplantation. Clin Exp Immunol 2003;134:159-66.

155. Small TN, Robinson WH, Miklos DB. B cells and transplantation: an educational resource. Biol Blood Marrow Transplant 2009;15:104-13.

156. Bemark M, Holmqvist J, Abrahamsson J, Mellgren K. Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation - revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes. Clin Exp Immunol 2012;167:15-25.

157. Aucouturier P, Barra A, Intrator L, et al. Long lasting IgG subclass and antibacterial polysaccharide antibody deficiency after allogeneic bone marrow transplantation. Blood 1987;70:779-85.

158. Nasman-Bjork I, Lundkvist I. Oligoclonal dominance of immunoglobulin VH3 rearrangements following allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1998;21:1223-30.

159. Roll P, Muhammad K, Stuhler G, Grigoleit U, Einsele H, Tony HP. Effect of ATG-F on B-cell reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. Eur J Haematol 2015;95:514-23.

160. Fuji S, Kim SW, Yano S, et al. A prospective multicenter study of unrelated bone marrow transplants using a reduced-intensity conditioning regimen with low-dose ATG-F. Bone Marrow Transplant 2016;51:451-3.

161. Petersen SL, Ryder LP, Bjork P, et al. A comparison of T-, B- and NK-cell reconstitution following conventional or nonmyeloablative conditioning and transplantation with bone marrow or peripheral blood stem cells from human leucocyte antigen identical sibling donors. Bone Marrow Transplant 2003;32:65-72.

162. Greinix HT, Pohlreich D, Kouba M, et al. Elevated numbers of immature/transitional CD21- B lymphocytes and deficiency of memory CD27+ B cells identify patients with active chronic graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant 2008;14:208-19.

163. Greinix HT, Kuzmina Z, Weigl R, et al. CD19+CD21low B cells and CD4+CD45RA+CD31+ T cells correlate with first diagnosis of chronic graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant 2015;21:250-8.

164. Storek J, Witherspoon RP, Maloney DG, Chauncey TR, Storb R. Improved reconstitution of CD4 T cells and B cells but worsened reconstitution of serum IgG levels after allogeneic transplantation of blood stem cells instead of marrow. Blood 1997;89:3891-3.

165. Storek J, Dawson MA, Storer B, et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. Blood 2001;97:3380-9.

166. D'Orsogna LJ, Wright MP, Krueger RG, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients have defects of both switched and igm memory B cells. Biol Blood Marrow Transplant 2009;15:795-803.

167. Auletta JJ, Lazarus HM. Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. Bone Marrow Transplant 2005;35:835-57.

168. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. Nat Rev Immunol 2012;12:443-58.

169. Ferrara JL, Cooke KR, Teshima T. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. Int J Hematol 2003;78:181-7.

170. Li Q, Zhai Z, Xu X, et al. Decrease of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. Leuk Res 2010;34:1158-68.

171. Szyska M, Na IK. Bone Marrow GvHD after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Front Immunol 2016;7:118.

172. Shono Y, Ueha S, Wang Y, et al. Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. Blood 2010;115:5401-11.

173. Muller AM, Linderman JA, Florek M, Miklos D, Shizuru JA. Allogeneic T cells impair engraftment and hematopoiesis after stem cell transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107:14721-6.

174. Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, et al. Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant 2010;16:1309-14.

175. McCarthy AL, Malik Peiris JS, Taylor CE, et al. Increase in severity of graft versus host disease by cytomegalovirus. J Clin Pathol 1992;45:542-4.

176. Hakki M, Riddell SR, Storek J, et al. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. Blood 2003;102:3060-7.

177. Ozdemir E, St John LS, Gillespie G, et al. Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific CD8+ T cells. Blood 2002;100:3690-7.

178. Marek A, Stern M, Chalandon Y, et al. The impact of T-cell depletion techniques on the outcome after haploidentical hematopoietic SCT. Bone Marrow Transplant 2014;49:55-61.

179. Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MT, et al. Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. Lancet Oncol 2009;10:489-500.

180. Weissinger EM, Borchers S, Silvani A, et al. Long term follow up of patients after allogeneic stem cell transplantation and transfusion of HSV-TK transduced T-cells. Front Pharmacol 2015;6:76.

181. Na IK, Wittenbecher F, Dziubianau M, et al. Rabbit antithymocyte globulin (thymoglobulin) impairs the thymic output of both conventional and regulatory CD4+ T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients. Haematologica 2013;98:23-30.

182. Juliusson G, Theorin N, Karlsson K, Frodin U, Malm C. Subcutaneous alemtuzumab vs ATG in adjusted conditioning for allogeneic transplantation: influence of Campath dose on lymphoid recovery, mixed chimerism and survival. Bone Marrow Transplant 2006;37:503-10.

183. Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M, et al. Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. Blood 2001;97:1232-40.

184. Jansen J, Hanks S, Thompson JM, Dugan MJ, Akard LP. Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. J Cell Mol Med 2005;9:37-50.

185. Mohty M, Mohty AM, Blaise D, et al. Cytomegalovirus-specific immune recovery following allogeneic HLA-identical sibling transplantation with reduced-intensity preparative regimen. Bone Marrow Transplant 2004;33:839-46.

186. Cdc IDSoA, the American Society of B, Marrow T. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. Recommendations of CDC, the Infectious Disease Society of America, and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. Cytotherapy 2001;3:41-54.

187. Moss P, Rickinson A. Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. Nat Rev Immunol 2005;5:9-20.

188. Chatzidimitriou D, Gavriilaki E, Sakellari I, Diza E. Hematopoietic cell transplantation and emerging viral infections. J Med Virol 2010;82:528-38.

189. Chien YH, Iwashima M, Kaplan KB, Elliott JF, Davis MM. A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. Nature 1987;327:677-82.

190. Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday AC, Eisen HN, Tonegawa S. A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. Nature 1984;312:36-40.

191. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. Nat Rev Cancer 2004;4:11-22.

192. Girardi M. Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. J Invest Dermatol 2006;126:25-31.

193. Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. Nat Rev Immunol 2002;2:336-45.

194. Allison TJ, Winter CC, Fournie JJ, Bonneville M, Garboczi DN. Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. Nature 2001;411:820-4.

195. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. Nat Rev Immunol 2010;10:467-78.

196. Lafont V, Sanchez F, Laprevotte E, et al. Plasticity of gammadelta T Cells: Impact on the Anti-Tumor Response. Front Immunol 2014;5:622.

197. Luoma AM, Castro CD, Mayassi T, et al. Crystal structure of Vdelta1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human gammadelta T cells. Immunity 2013;39:1032-42.

198. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. Nat Rev Immunol 2013;13:88-100.

199. Matis LA, Fry AM, Cron RQ, Cotterman MM, Dick RF, Bluestone JA. Structure and specificity of a class II MHC alloreactive gamma delta T cell receptor heterodimer. Science 1989;245:746-9.

200. Willcox CR, Pitard V, Netzer S, et al. Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. Nat Immunol 2012;13:872-9.

201. Dar AA, Patil RS, Chiplunkar SV. Insights into the Relationship between Toll Like Receptors and Gamma Delta T Cell Responses. Front Immunol 2014;5:366.

202. Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P, Kabelitz D, Steinle A, Herrmann T. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. J Immunol 2005;175:2144-51.

203. Kato Y, Tanaka Y, Tanaka H, Yamashita S, Minato N. Requirement of species-specific interactions for the activation of human gamma delta T cells by pamidronate. J Immunol 2003;170:3608-13.

204. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, et al. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. Science 2001;294:605-9.

205. Qin HD, Huang D, Weng XD, Xu F. Upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and NADPH oxidases are involved in restenosis after balloon injury. J Cell Physiol 2009;221:387-93.

206. Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, et al. Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. J Infect Dis 2001;184:1082-5.

207. Li B, Bassiri H, Rossman MD, et al. Involvement of the Fas/Fas ligand pathway in activation-induced cell death of mycobacteria-reactive human gamma delta T cells: a mechanism for the loss of gamma delta T cells in patients with pulmonary tuberculosis. J Immunol 1998;161:1558-67.

208. Wu YL, Ding YP, Tanaka Y, et al. gammadelta T cells and their potential for immunotherapy. Int J Biol Sci 2014;10:119-35.

209. Sharp LL, Jameson JM, Cauvi G, Havran WL. Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1. Nat Immunol 2005;6:73-9.

210. Vermijlen D, Ellis P, Langford C, et al. Distinct cytokine-driven responses of activated blood gammadelta T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy. J Immunol 2007;178:4304-14.

211. Eberl M, Hintz M, Reichenberg A, Kollas AK, Wiesner J, Jomaa H. Microbial isoprenoid biosynthesis and human gammadelta T cell activation. FEBS Lett 2003;544:4-10.

212. Dunne MR, Mangan BA, Madrigal-Estebas L, Doherty DG. Preferential Th1 cytokine profile of phosphoantigen-stimulated human Vgamma9Vdelta2 T cells. Mediators Inflamm 2010;2010:704941.

213. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jeno P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. J Exp Med 2003;197:163-8.

214. Uchida R, Ashihara E, Sato K, et al. Gamma delta T cells kill myeloma cells by sensing mevalonate metabolites and ICAM-1 molecules on cell surface. Biochem Biophys Res Commun 2007;354:613-8.

215. Dhar S, Chiplunkar SV. Lysis of aminobisphosphonate-sensitized MCF-7 breast tumor cells by Vgamma9Vdelta2 T cells. Cancer Immun 2010;10:10.

216. Mattarollo SR, Kenna T, Nieda M, Nicol AJ. Chemotherapy and zoledronate sensitize solid tumour cells to Vgamma9Vdelta2 T cell cytotoxicity. Cancer Immunol Immunother 2007;56:1285-97.

217. Das H, Groh V, Kuijl C, et al. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. Immunity 2001;15:83-93.

218. Deniger DC, Maiti SN, Mi T, et al. Activating and propagating polyclonal gamma delta T cells with broad specificity for malignancies. Clin Cancer Res 2014;20:5708-19.

219. Lanca T, Correia DV, Moita CF, et al. The MHC class Ib protein ULBP1 is a nonredundant determinant of leukemia/lymphoma susceptibility to gammadelta T-cell cytotoxicity. Blood 2010;115:2407-11.

220. Toutirais O, Cabillic F, Le Friec G, et al. DNAX accessory molecule-1 (CD226) promotes human hepatocellular carcinoma cell lysis by Vgamma9Vdelta2 T cells. Eur J Immunol 2009;39:1361-8.

221. Gertner-Dardenne J, Bonnafous C, Bezombes C, et al. Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies. Blood 2009;113:4875-84.

222. Capietto AH, Martinet L, Fournie JJ. Stimulated gammadelta T cells increase the in vivo efficacy of trastuzumab in HER-2+ breast cancer. J Immunol 2011;187:1031-8.

223. Tokuyama H, Hagi T, Mattarollo SR, et al. V gamma 9 V delta 2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs--rituximab and trastuzumab. Int J Cancer 2008;122:2526-34.

224. Yuasa T, Sato K, Ashihara E, et al. Intravesical administration of gammadelta T cells successfully prevents the growth of bladder cancer in the murine model. Cancer Immunol Immunother 2009;58:493-502.

225. Kabelitz D, Wesch D, Pitters E, Zoller M. Characterization of tumor reactivity of human V gamma 9V delta 2 gamma delta T cells in vitro and in SCID mice in vivo. J Immunol 2004;173:6767-76.

226. Benzaid I, Monkkonen H, Stresing V, et al. High phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors promote Vgamma9Vdelta2 T-cell chemotaxis and cytotoxicity in vivo. Cancer Res 2011;71:4562-72.

227. Benzaid I, Monkkonen H, Bonnelye E, Monkkonen J, Clezardin P. In vivo phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors trigger Vgamma9Vdelta2 T-cell antitumor cytotoxicity through ICAM-1 engagement. Clin Cancer Res 2012;18:6249-59.

228. Fournie JJ, Sicard H, Poupot M, et al. What lessons can be learned from gammadelta T cell-based cancer immunotherapy trials? Cell Mol Immunol 2013;10:35-41.

229. Castella B, Vitale C, Coscia M, Massaia M. Vgamma9Vdelta2 T cell-based immunotherapy in hematological malignancies: from bench to bedside. Cell Mol Life Sci 2011;68:2419-32.

230. Poccia F, Agrati C, Martini F, Capobianchi MR, Wallace M, Malkovsky M. Antiviral reactivities of gammadelta T cells. Microbes Infect 2005;7:518-28.

231. Poccia F, Agrati C, Martini F, Mejia G, Wallace M, Malkovsky M. Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated non-cytolytic antiviral mechanisms and their potential for cell-based therapy. Immunol Lett 2005;100:14-20.

232. Poccia F, Agrati C, Castilletti C, et al. Anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus immune responses: the role played by V gamma 9V delta 2 T cells. J Infect Dis 2006;193:1244-9.

233. De Paoli P, Gennari D, Martelli P, et al. A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection. Clin Exp Immunol 1991;83:187-91.

234. Poccia F, Boullier S, Lecoeur H, et al. Peripheral V gamma 9/V delta 2 T cell deletion and anergy to nonpeptidic mycobacterial antigens in asymptomatic HIV-1-infected persons. J Immunol 1996;157:449-61.

235. Harris LD, Klatt NR, Vinton C, et al. Mechanisms underlying gammadelta T-cell subset perturbations in SIV-infected Asian rhesus macaques. Blood 2010;116:4148-57.

236. Fausther-Bovendo H, Wauquier N, Cherfils-Vicini J, Cremer I, Debre P, Vieillard V. NKG2C is a major triggering receptor involved in the V[delta]1 T cell-mediated cytotoxicity against HIV-infected CD4 T cells. AIDS 2008;22:217-26.

237. Hudspeth K, Fogli M, Correia DV, et al. Engagement of NKp30 on Vdelta1 T cells induces the production of CCL3, CCL4, and CCL5 and suppresses HIV-1 replication. Blood 2012;119:4013-6.

238. Sindhu ST, Ahmad R, Morisset R, Ahmad A, Menezes J. Peripheral blood cytotoxic gammadelta T lymphocytes from patients with human immunodeficiency virus type 1 infection and AIDS lyse uninfected CD4+ T cells, and their cytocidal potential correlates with viral load. J Virol 2003;77:1848-55.

239. Hermier F, Comby E, Delaunay A, et al. Decreased blood TcR gamma delta+ lymphocytes in AIDS and p24-antigenemic HIV-1-infected patients. Clin Immunol Immunopathol 1993;69:248-50.

240. Par G, Rukavina D, Podack ER, et al. Decrease in CD3-negative-CD8dim(+) and Vdelta2/Vgamma9 TcR+ peripheral blood lymphocyte counts, low perforin expression and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection. J Hepatol 2002;37:514-22.

241. Agrati C, Alonzi T, De Santis R, et al. Activation of Vgamma9Vdelta2 T cells by non-peptidic antigens induces the inhibition of subgenomic HCV replication. Int Immunol 2006;18:11-8.

242. Li H, Xiang Z, Feng T, et al. Human Vgamma9Vdelta2-T cells efficiently kill influenza virus-infected lung alveolar epithelial cells. Cell Mol Immunol 2013;10:159-64.

243. Qin G, Liu Y, Zheng J, et al. Type 1 responses of human Vgamma9Vdelta2 T cells to influenza A viruses. J Virol 2011;85:10109-16.

244. Tu W, Zheng J, Liu Y, et al. The aminobisphosphonate pamidronate controls influenza pathogenesis by expanding a gammadelta T cell population in humanized mice. J Exp Med 2011;208:1511-22.

245. Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African children. Br J Surg 1958;46:218-23.

246. Sun Q, Burton RL, Lucas KG. Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4(+) cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus-specific T-cell cultures. Blood 2002;99:3302-9.

247. Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-ytpe virus to infectious mononucleosis. Proc Natl Acad Sci U S A 1968;59:94-101.

248. Henle W, Henle G, Ho HC, et al. Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms, and control groups. J Natl Cancer Inst 1970;44:225-31.

249. Henle W, Henle G. Evidence for a relation of Epstein-Barr virus to Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. Bibl Haematol 1970:706-13.

250. Baer R, Bankier AT, Biggin MD, et al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. Nature 1984;310:207-11.

251. Macsween KF, Crawford DH. Epstein-Barr virus-recent advances. Lancet Infect Dis 2003;3:131-40.

252. Orazi A, Hromas RA, Neiman RS, et al. Posttransplantation lymphoproliferative disorders in bone marrow transplant recipients are aggressive diseases with a high incidence of adverse histologic and immunobiologic features. Am J Clin Pathol 1997;107:419-29.

253. Paya CV, Fung JJ, Nalesnik MA, et al. Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD Task Force and The Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting. Transplantation 1999;68:1517-25.

254. Hochberg D, Souza T, Catalina M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Thorley-Lawson DA. Acute infection with Epstein-Barr virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells. J Virol 2004;78:5194-204.

255. Chang Y, Tung CH, Huang YT, Lu J, Chen JY, Tsai CH. Requirement for cell-to-cell contact in Epstein-Barr virus infection of nasopharyngeal carcinoma cells and keratinocytes. J Virol 1999;73:8857-66.

256. Pegtel DM, Middeldorp J, Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers. J Virol 2004;78:12613-24.

257. Shannon-Lowe CD, Neuhierl B, Baldwin G, Rickinson AB, Delecluse HJ. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:7065-70.

258. Hadinoto V, Shapiro M, Sun CC, Thorley-Lawson DA. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. PLoS Pathog 2009;5:e1000496.

259. Speck P, Longnecker R. Infection of breast epithelial cells with Epstein-Barr virus via cell-to-cell contact. J Natl Cancer Inst 2000;92:1849-51.

260. Tugizov SM, Berline JW, Palefsky JM. Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. Nat Med 2003;9:307-14.

261. Ocheni S, Kroeger N, Zabelina T, et al. EBV reactivation and post transplant lymphoproliferative disorders following allogeneic SCT. Bone Marrow Transplant 2008;42:181-6.

262. Worth A, Conyers R, Cohen J, et al. Pre-emptive rituximab based on viraemia and T cell reconstitution: a highly effective strategy for the prevention of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease following stem cell transplantation. Br J Haematol 2011;155:377-85.

263. Garcia-Cadenas I, Castillo N, Martino R, et al. Impact of Epstein Barr virus-related complications after high-risk allo-SCT in the era of pre-emptive rituximab. Bone Marrow Transplant 2015;50:579-84.

264. Cesaro S, Pegoraro A, Tridello G, et al. A prospective study on modulation of immunosuppression for Epstein-Barr virus reactivation in pediatric patients who underwent unrelated hematopoietic stem-cell transplantation. Transplantation 2010;89:1533-40.

265. Comoli P, Basso S, Zecca M, et al. Preemptive therapy of EBV-related lymphoproliferative disease after pediatric haploidentical stem cell transplantation. Am J Transplant 2007;7:1648-55.

266. Kanakry JA, Kasamon YL, Bolanos-Meade J, et al. Absence of post-transplantation lymphoproliferative disorder after allogeneic blood or marrow transplantation using post-transplantation cyclophosphamide as graft-versus-host disease prophylaxis. Biol Blood Marrow Transplant 2013;19:1514-7.

267. Sanz J, Arango M, Senent L, et al. EBV-associated post-transplant lymphoproliferative disorder after umbilical cord blood transplantation in adults with hematological diseases. Bone Marrow Transplant 2014;49:397-402.

268. Dumas PY, Ruggeri A, Robin M, et al. Incidence and risk factors of EBV reactivation after unrelated cord blood transplantation: a Eurocord and Societe Francaise de Greffe de Moelle-Therapie Cellulaire collaborative study. Bone Marrow Transplant 2013;48:253-6.

269. Peric Z, Cahu X, Chevallier P, et al. Features of EBV reactivation after reduced intensity conditioning unrelated umbilical cord blood transplantation. Bone Marrow Transplant 2012;47:251-7.

270. Carpenter B, Haque T, Dimopoulou M, et al. Incidence and dynamics of Epstein-Barr virus reactivation after alemtuzumab-based conditioning for allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. Transplantation 2010;90:564-70.

271. Curtis RE, Travis LB, Rowlings PA, et al. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. Blood 1999;94:2208-16.

272. van Esser JW, Niesters HG, van der Holt B, et al. Prevention of Epstein-Barr virus-lymphoproliferative disease by molecular monitoring and preemptive rituximab in high-risk patients after allogeneic stem cell transplantation. Blood 2002;99:4364-9.

273. van der Velden WJ, Mori T, Stevens WB, et al. Reduced PTLD-related mortality in patients experiencing EBV infection following allo-SCT after the introduction of a protocol incorporating pre-emptive rituximab. Bone Marrow Transplant 2013;48:1465-71.

274. Ahmad I, Cau NV, Kwan J, et al. Preemptive management of Epstein-Barr virus reactivation after hematopoietic stem-cell transplantation. Transplantation 2009;87:1240-5.

275. Bai X, Rogers BB, Harkins PC, et al. Predictive value of quantitative PCR-based viral burden analysis for eight human herpesviruses in pediatric solid organ transplant patients. J Mol Diagn 2000;2:191-201.

276. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. Nat Rev Cancer 2004;4:757-68.

277. Rea D, Fourcade C, Leblond V, et al. Patterns of Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in Epstein-Barr virus B cell lymphoproliferative disorders after organ transplantation. Transplantation 1994;58:317-24.

278. Swerdlow SH. Classification of the posttransplant lymphoproliferative disorders: from the past to the present. Semin Diagn Pathol 1997;14:2-7.

279. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. Blood 2011;117:5019-32.

280. Mautner J, Bornkamm GW. The role of virus-specific CD4+ T cells in the control of Epstein-Barr virus infection. Eur J Cell Biol 2012;91:31-5.

281. Brunstein CG, Weisdorf DJ, DeFor T, et al. Marked increased risk of Epstein-Barr virus-related complications with the addition of antithymocyte globulin to a nonmyeloablative conditioning prior to unrelated umbilical cord blood transplantation. Blood 2006;108:2874-80.

282. Cohen JM, Sebire NJ, Harvey J, et al. Successful treatment of lymphoproliferative disease complicating primary immunodeficiency/immunodysregulatory disorders with reduced-intensity allogeneic stem-cell transplantation. Blood 2007;110:2209-14.

283. Patriarca F, Medeot M, Isola M, et al. Prognostic factors and outcome of Epstein-Barr virus DNAemia in high-risk recipients of allogeneic stem cell transplantation treated with preemptive rituximab. Transpl Infect Dis 2013;15:259-67.

284. Styczynski J, Gil L, Tridello G, et al. Response to rituximab-based therapy and risk factor analysis in Epstein Barr Virus-related lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplant in children and adults: a study from the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Clin Infect Dis 2013;57:794-802.

285. Styczynski J, Einsele H, Gil L, Ljungman P. Outcome of treatment of Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in hematopoietic stem cell recipients: a comprehensive review of reported cases. Transpl Infect Dis 2009;11:383-92.

286. Blaes AH, Cao Q, Wagner JE, Young JA, Weisdorf DJ, Brunstein CG. Monitoring and preemptive rituximab therapy for Epstein-Barr virus reactivation after antithymocyte globulin containing nonmyeloablative conditioning for umbilical cord blood transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2010;16:287-91.

287. Coppoletta S, Tedone E, Galano B, et al. Rituximab treatment for Epstein-Barr virus DNAemia after alternative-donor hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2011;17:901-7.

288. D'Aveni M, Aissi-Rothe L, Venard V, et al. The clinical value of concomitant Epstein Barr virus (EBV)-DNA load and specific immune reconstitution monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Transpl Immunol 2011;24:224-32.

289. Muramatsu H, Takahashi Y, Shimoyama Y, et al. CD20-negative Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disease refractory to rituximab in a patient with severe aplastic anemia. Int J Hematol 2011;93:779-81.

290. Bordon V, Padalko E, Benoit Y, Dhooge C, Laureys G. Incidence, kinetics, and risk factors of Epstein-Barr virus viremia in pediatric patients after allogeneic stem cell transplantation. Pediatr Transplant 2012;16:144-50.

291. Kuriyama T, Kawano N, Yamashita K, Ueda A. Successful treatment of Rituximab-resistant Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disorder using R-CHOP. J Clin Exp Hematop 2014;54:149-53.

292. Meyer SC, Medinger M, Halter JP, et al. Heterogeneity in clinical course of EBV-associated lymphoproliferative disorder after allogeneic stem cell transplantation. Hematology 2014;19:280-5.

293. Han SB, Bae EY, Lee JW, et al. Features of Epstein-Barr virus reactivation after allogeneic hematopoietic cell transplantation in Korean children living in an area of high seroprevalence against Epstein-Barr virus. Int J Hematol 2014;100:188-99.

294. Helgestad J, Rosthoj S, Pedersen MH, et al. Very late relapse of PTLD 10 yr after allogeneic HSCT and nine yr after stopping immunosuppressive therapy. Pediatr Transplant 2014;18:E35-9.

295. Weber T, Wickenhauser C, Monecke A, et al. Treatment of rare co-occurrence of Epstein-Barr virus-driven post-transplant lymphoproliferative disorder and hemophagocytic lymphohistiocytosis after allogeneic stem cell transplantation. Transpl Infect Dis 2014;16:988-92.

296. Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, et al. Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. Blood 2010;115:925-35.

297. Barker JN, Doubrovina E, Sauter C, et al. Successful treatment of EBV-associated posttransplantation lymphoma after cord blood transplantation using third-party EBV-specific cytotoxic T lymphocytes. Blood 2010;116:5045-9.

298. Moosmann A, Bigalke I, Tischer J, et al. Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. Blood 2010;115:2960-70.

299. 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;119:2644-56.

300. Leen AM, Bollard CM, Mendizabal AM, et al. Multicenter study of banked third-party virus-specific T cells to treat severe viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. Blood 2013;121:5113-23.

301. Vickers MA, Wilkie GM, Robinson N, et al. Establishment and operation of a Good Manufacturing Practice-compliant allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic cell bank for the treatment of EBV-associated lymphoproliferative disease. Br J Haematol 2014;167:402-10.

302. Fujishima N, Hirokawa M, Fujishima M, et al. Skewed T cell receptor repertoire of Vdelta1(+) gammadelta T lymphocytes after human allogeneic haematopoietic stem cell transplantation and the potential role for Epstein-Barr virus-infected B cells in clonal restriction. Clin Exp Immunol 2007;149:70-9.

303. Luznik L, Bolanos-Meade J, Zahurak M, et al. High-dose cyclophosphamide as single-agent, short-course prophylaxis of graft-versus-host disease. Blood 2010;115:3224-30.

304. Luznik L, O'Donnell PV, Fuchs EJ. Post-transplantation cyclophosphamide for tolerance induction in HLA-haploidentical bone marrow transplantation. Semin Oncol 2012;39:683-93.

305. 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 2008;14:641-50.

306. Baker M, Wang H, Rowley SD, et al. Comparative Outcomes after Haploidentical or Unrelated Donor Bone Marrow or Blood Stem Cell Transplantation in Adult Patients with Hematological Malignancies. Biol Blood Marrow Transplant 2016;22:2047-55.

307. Ando T, Tachibana T, Tanaka M, et al. Impact of graft sources on immune reconstitution and survival outcomes following allogeneic stem cell transplantation. Blood advances 2020;4:408-19.

308. Mehta RS, Rezvani K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. Virulence 2016;7:901-16.

309. Bejanyan N, Brunstein CG, Cao Q, et al. Delayed immune reconstitution after allogeneic transplantation increases the risks of mortality and chronic GVHD. Blood advances 2018;2:909-22.

310. Kanakry CG, Ganguly S, Zahurak M, et al. Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide. Science translational medicine 2013;5:211ra157.

311. Roberto A, Castagna L, Zanon V, et al. Role of naive-derived T memory stem cells in T-cell reconstitution following allogeneic transplantation. Blood 2015;125:2855-64.

312. Kanakry CG, Coffey DG, Towlerton AM, et al. Origin and evolution of the T cell repertoire after posttransplantation cyclophosphamide. JCI Insight 2016;1.

313. Retiere C, Willem C, Guillaume T, et al. Impact on early outcomes and immune reconstitution of high-dose post-transplant cyclophosphamide vs anti-thymocyte globulin after reduced intensity conditioning peripheral blood stem cell allogeneic transplantation. Oncotarget 2018;9:11451-64.

314. Wachsmuth LP, Patterson MT, Eckhaus MA, Venzon DJ, Gress RE, Kanakry CG. Post-transplantation cyclophosphamide prevents graft-versus-host disease by inducing alloreactive T cell dysfunction and suppression. The Journal of clinical investigation 2019;129:2357-73.

315. Malard F, Labopin M, Chevallier P, et al. Larger number of invariant natural killer T cells in PBSC allografts correlates with improved GVHD-free and progression-free survival. Blood 2016;127:1828-35.

316. Arruda LCM, Gaballa A, Uhlin M. Impact of gammadelta T cells on clinical outcome of hematopoietic stem cell transplantation: systematic review and meta-analysis. Blood Adv 2019;3:3436-48.

317. Mohty R, Brissot E, Battipaglia G, et al. Infectious complications after post-transplantation cyclophosphamide and anti-thymocyte globulin-based haploidentical stem cell transplantation. British journal of haematology 2019;187:e64-e8.

318. Petropoulou AD, Porcher R, Peffault de Latour R, et al. Increased infection rate after preemptive rituximab treatment for Epstein-Barr virus reactivation after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. Transplantation 2012;94:879-83.

319. Small TN, Keever CA, Weiner-Fedus S, Heller G, O'Reilly RJ, Flomenberg N. B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny. Blood 1990;76:1647-56.

320. Burns DM, Tierney R, Shannon-Lowe C, et al. Memory B-cell reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is an EBV-associated transformation event. Blood 2015;126:2665-75.

321. Kalampokis I, Yoshizaki A, Tedder TF. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. Arthritis Res Ther 2013;15 Suppl 1:S1.

322. Le Huu D, Matsushita T, Jin G, et al. Donor-derived regulatory B cells are important for suppression of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. Blood 2013;121:3274-83.

323. Zeiser R, Sarantopoulos S, Blazar BR. B-cell targeting in chronic graft-versus-host disease. Blood 2018;131:1399-405.

324. Johnston HF, Xu Y, Racine JJ, et al. Administration of anti-CD20 mAb is highly effective in preventing but ineffective in treating chronic graft-versus-host disease while preserving strong graft-versus-leukemia effects. Biol Blood Marrow Transplant 2014;20:1089-103.

325. Malard F, Labopin M, Yakoub-Agha I, et al. Rituximab-based first-line treatment of cGVHD after allogeneic SCT: results of a phase 2 study. Blood 2017;130:2186-95.

326. Cutler C, Miklos D, Kim HT, et al. Rituximab for steroid-refractory chronic graft-versus-host disease. Blood 2006;108:756-62.

327. Flynn R, Allen JL, Luznik L, et al. Targeting Syk-activated B cells in murine and human chronic graft-versus-host disease. Blood 2015;125:4085-94.

328. Dubovsky JA, Flynn R, Du J, et al. Ibrutinib treatment ameliorates murine chronic graft-versus-host disease. J Clin Invest 2014;124:4867-76.

329. Forcade E, Paz K, Flynn R, et al. An activated Th17-prone T cell subset involved in chronic graft-versus-host disease sensitive to pharmacological inhibition. JCI Insight 2017;2.

330. Young JS, Wu T, Chen Y, et al. Donor B cells in transplants augment clonal expansion and survival of pathogenic CD4+ T cells that mediate autoimmune-like chronic graft-versus-host disease. J Immunol 2012;189:222-33.

331. Mikulska M, Lanini S, Gudiol C, et al. ESCMID Study Group for Infections in Compromised Hosts (ESGICH) Consensus Document on the safety of targeted and biological therapies: an infectious diseases perspective (Agents targeting lymphoid cells surface antigens [I]: CD19, CD20 and CD52). Clin Microbiol Infect 2018;24 Suppl 2:S71-S82.

332. Gillissen MA, Kedde M, Jong G, et al. AML-specific cytotoxic antibodies in patients with durable graft-versus-leukemia responses. Blood 2018;131:131-43.

333. Wolach O, Bairey O, Lahav M. Late-onset neutropenia after rituximab treatment: case series and comprehensive review of the literature. Medicine (Baltimore) 2010;89:308-18.

334. Egawa T, Kawabata K, Kawamoto H, et al. The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. Immunity 2001;15:323-34.

335. Ma Q, Jones D, Springer TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. Immunity 1999;10:463-71.

336. Suratt BT, Petty JM, Young SK, et al. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. Blood 2004;104:565-71.

ANNEXES

ARTICLE 3 : DARATUMUMAB PREVENTS PROGRAMMED DEATH LIGAND-1 EXPRESSION ON ANTIGEN-PRESENTING CELLS IN DE NOVO MULTIPLE MYELOMA

Nicolas Stocker [1], Béatrice Gaugler [1,2], Laure Ricard [1], Frédéric de Vassoigne [1], Zora Marjanovic [2], Mohamad Mohty [1, 2], Florent Malard [1, 2].

[1] Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), F-75012 Paris, France

[2] AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Hématologie Clinique, F-75012, Paris, France

Published in Cancer Medicine

Cancer Med. 2020 Mar;9(6):2077-2084

Received: 5 September 2019 | Revised: 17 December 2019 | Accepted: 26 December 2019

DOI: 10.1002/cam4.2827

ORIGINAL RESEARCH

Cancer Medicine Open Access WILEY

Daratumumab prevents programmed death ligand-1 expression on antigen-presenting cells in de novo multiple myeloma

Nicolas Stocker[1] | Béatrice Gaugler[1,2] | Laure Ricard[1] | Frédéric de Vassoigne[1] | Zora Marjanovic[2] | Mohamad Mohty[1,2] | Florent Malard[1,2]

[1]INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Sorbonne Université, Paris, France

[2]AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Hématologie Clinique, Paris, France

Correspondence
Florent Malard, Service d'Hématologie Clinique, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, F-75012 Paris, France.
Email: florent.malard@inserm.fr

Abstract

Background: Daratumumab (Dara), an anti-CD38 monoclonal antibody, has an immunologic mechanism of action through targeting of CD38 expressing immune cells in patients with multiple myeloma (MM). Furthermore, it was recently shown that CD38 upregulation in tumors, is a major mechanism of acquired resistance to antiprogrammed cell death 1 (PD-1)/programmed cell death ligand 1 (PD-L1). Therefore, we decided to evaluate the immunomodulatory effects of CD38 blockade by Dara on the PD-L1 expressing immune cells.

Methods: We analyzed CD38 and PD-L1 expression on immune cells at different time points in 18 newly diagnosed MM receiving bortezomib, lenalidomide and dexamethasone, with or without Dara.

Results: We first confirmed that CD38 is widely expressed on immune cells, with the strongest expression on plasmacytoid dendritic cells (pDC). Furthermore, Dara induces a strong depletion of pDC in addition to the well-known rapid depletion of natural killer cells. Finally, we found that PD-L1 expression on antigen-presenting cells (APC) increases with MM treatment in patients that did not received Dara, while addition of Dara prevents this increase.

Conclusion: Overall, our results suggest new mechanisms of action of Dara through depletion of pDC and prevention of PD-L1 upregulation expression on APC. Our finding provides new evidences for development of therapeutic strategies targeting both CD38 and PD-L1/PD-1 pathway in patients with MM.

KEYWORDS

antigen-presenting cells, daratumumab, multiple myeloma

1 | INTRODUCTION

Targeting CD38 with the monoclonal antibody daratumumab (Dara) is a widely used treatment in the setting of relapsed or refractory multiple myeloma (MM).[1-6] Therefore, Dara is currently approved, in combination with lenalidomide or bortezomib, for treatment of patients with MM who have received at least one prior line of treatment. Dara mediates the death of CD38-expressing MM cells through a variety of immune-mediated mechanisms (antibody-dependent cell-mediated

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
© 2020 The Authors. *Cancer Medicine* published by John Wiley & Sons Ltd.

cytotoxicity, complement-dependent cytotoxicity, and antibody-dependent cellular phagocytosis) and direct apoptosis by crosslinking.[7-9] Furthermore, several studies have demonstrated that beside a direct antitumor effect, Dara probably have an immunologic mechanism of action through targeting of CD38 expressing non-MM immune cells.[10,11]

Recently, Chen et al[12] demonstrated that CD38 upregulation in tumor induces resistance to programmed cell death 1 (PD-1)/programmed cell death ligand 1 (PD-L1) blocking antibodies and coinhibition of CD38 and PD-L1 improves antitumor immune responses. This mechanism of immune resistance caused by CD38 provides an evident rationale to evaluate immunomodulatory effects of CD38 blockade by Dara on the PD-L1 expressing immune cells. Several studies have demonstrated that MM cell (either cell lines or primary cells) upregulate PD-L1, and its receptor PD-1 is found on a proportion of T cells.[13-16] Moreover, dendritic cells (DC) in MM bone marrow expressed PD-L1 and induced a suppression of PD-1-expressing T-cell and NK-cell immune functions by engaging immune checkpoints via the PD-L1/PD-1 signaling axis.[17] Herein, we aimed to assess the immunomodulatory effects of Dara on CD38 expressing immune cells in the blood of newly diagnosed MM patients receiving Dara based combination therapy.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients and healthy donors

Between June 2016 and July 2017, 18 consecutive patients with newly diagnosed untreated MM were analyzed in this single-center study. In the bortezomib-thalidomide-dexamethasone (VTD) group, all patients received 4 cycles (1 cycle = 4 weeks) of VTD, autologous stem cell transplant after high dose chemotherapy (melphalan), followed by consolidation with two cycles of VTD, no maintenance was administered. In the VTD-Dara group, patients received the same treatment with the addition of intravenous Dara (16 mg/kg) weekly during the first two cycles and then every 2 weeks. Written informed consent was obtained from each patient. The study was approved by the local institutional review board. A group of eight healthy donors (HD group,

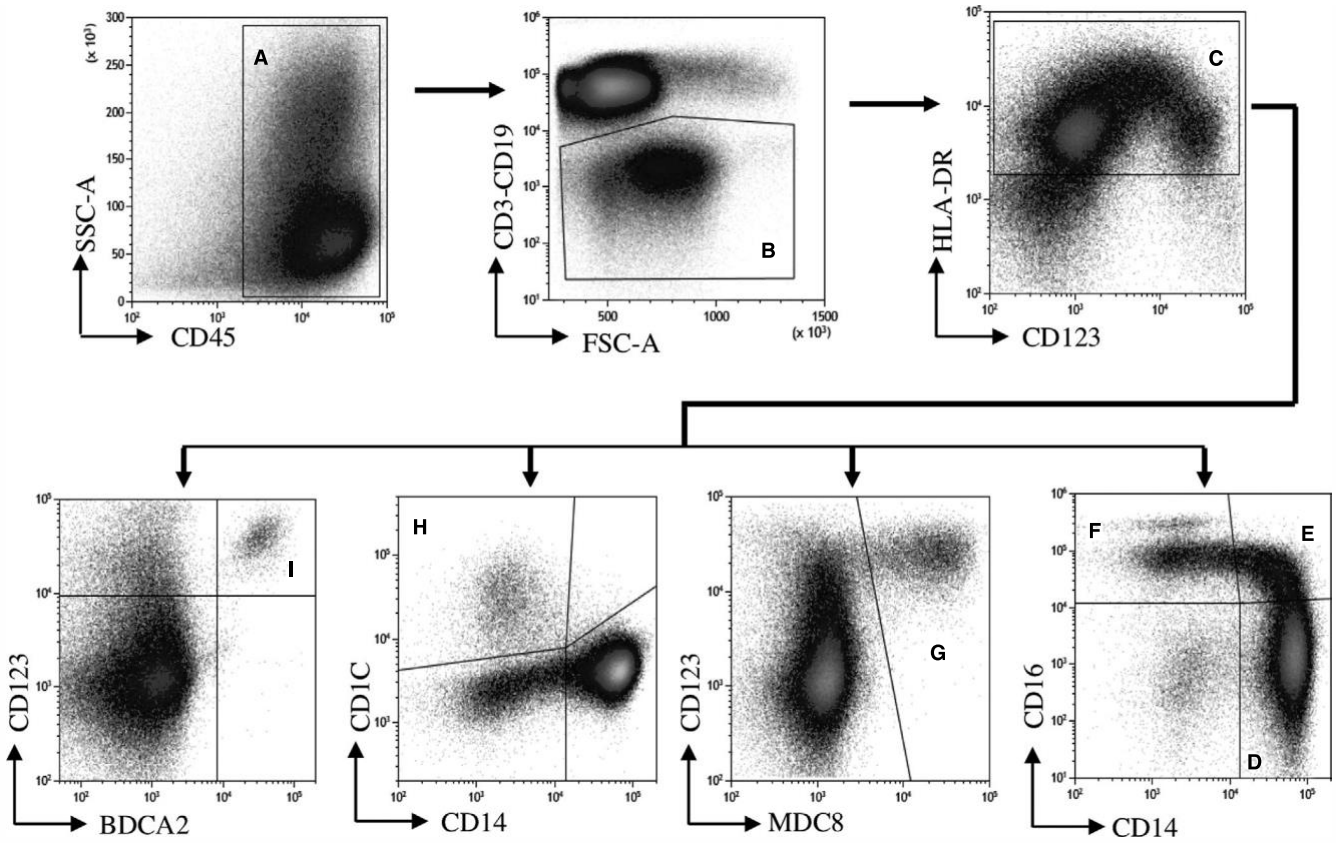

FIGURE 1 Gating strategy for analysis of dendritic cell and monocyte subpopulations. Gating was sequentially done on CD45$^+$ (A) and negativity for CD3$^+$ CD19$^+$ lineage (B). HLA-DR$^+$ cells were selected (C), and monocyte subtypes were discriminated according to the expression of CD16 and CD14 in HLA-DR$^+$ cells. Classical monocytes are CD16$^-$ CD14$^+$ (D), intermediate monocytes CD16$^+$ CD14$^+$ (E), and nonclassical monocytes CD16$^+$ CD14$^-$ (F). Slan-DC were identified in HLA-DR$^+$ cells as M-DC8$^+$ (G), myeloid DC as CD1c$^+$ (H), and plasmacytoid DC as CD123$^+$ BDCA2$^+$ (I)

Etablissement Français du Sang (EFS), Paris Saint-Antoine-Crozatier) was established to compare CD38 expression with MM patients.

2.2 | Biological samples

Peripheral blood samples were collected in EDTA tubes (BD Biosciences) at baseline (immediately before the first administration of treatment) and at 4, 8, and 12 weeks of treatment. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated with a standard gradient centrifugation procedure on a lymphocyte separation medium (Lymphosep separation media, Dutscher), and an aliquot was cryopreserved for storage.

2.3 | Phenotype analysis by flow cytometry

The phenotype of T, B, and NK cells, monocytes and DCs was determined after thawing of PBMC using the following fluorochrome-conjugated antibody panels: for myeloid cells analysis, CD1c FITC (Ozyme, Biolegend); MDC8 PE and BDCA2 PC7 (Miltenyi); CD123 ECD, CD38 PC5.5, CD56 AA700, CD3$^+$ CD19 AA750, and CD14 PB (Beckman Coulter); CD274 (PDL1) APC, CD45 BV510, HLA-DR BV605, CD86 BV650, and CD16 BV786 (BD Biosciences). For lymphoid cells analysis, CD127 FITC and CCR7 VioBlue (Miltenyi); CD45RA ECD, CD38 PC5.5, CD56 AA700, CD3 AA750, and CD8 KRO (Beckman Coulter); CD25 PC7, CD45 BV605, CD4 BV650, and CD19 BV786 (BD Biosciences). For Treg analysis, cells were permeabilized and incubated with FOXP3 PE (Beckman Coulter) and Ki67 A647 (BD Biosciences). In addition, PD-L1 expression was evaluated on each cell subset using median fluorescence intensity (MFI). Data were acquired on a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter) and analyzed using Kaluza Analysis v2.1 software (Beckman Coulter). To calculate absolute values of cells per microliter of blood, the numbers of lymphocytes on routine clinical blood counts from the same day were collected from the patient charts. Based on these parameters, we estimated what proportion of cells in the blood of the patients was represented by each cell type analyzed by flow cytometry. Gating strategies

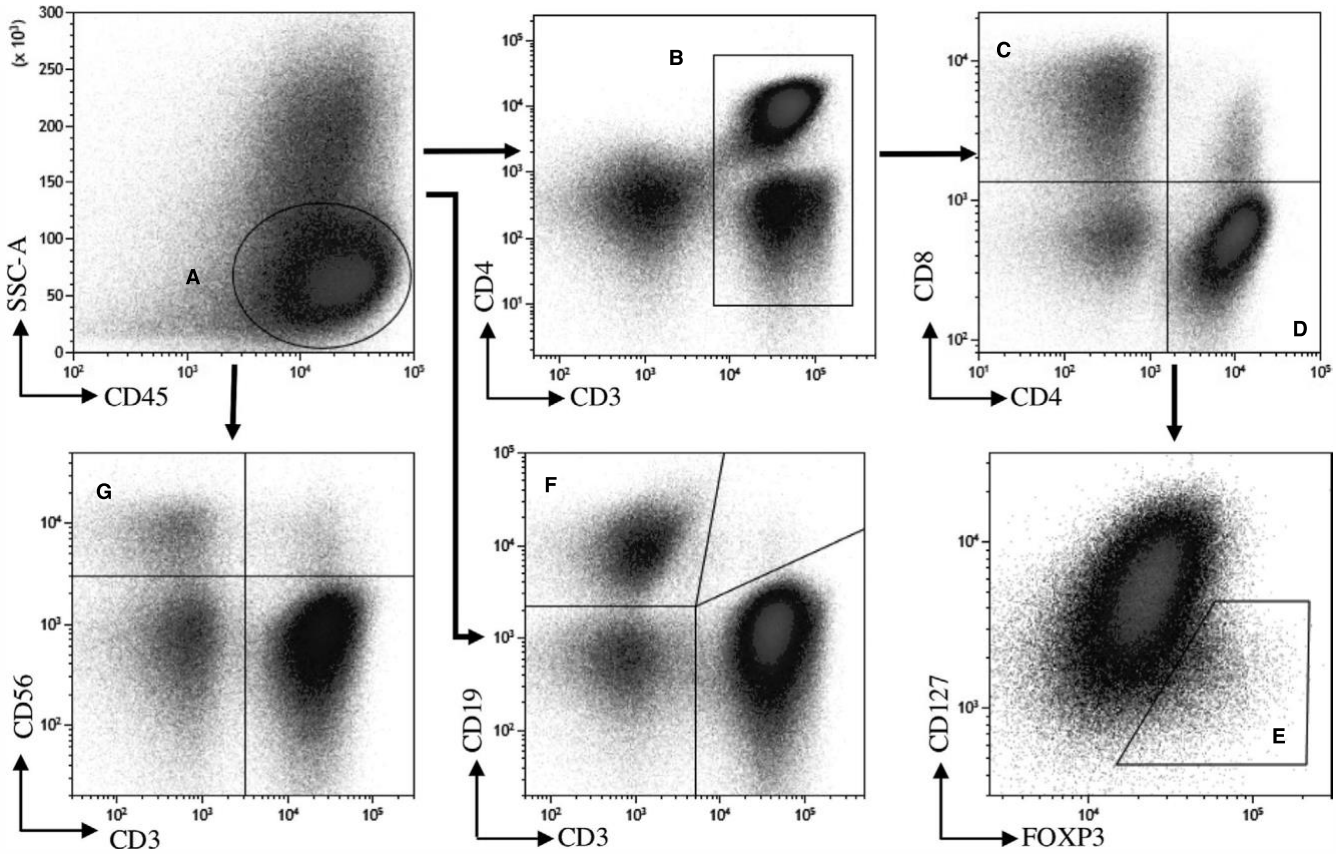

FIGURE 2 Gating strategy for analysis of lymphocyte subpopulations. Gating of lymphocytes was sequentially done on CD45$^+$ and low SSC-A (A). CD3$^+$ were selected (B), and CD4+ (D) and CD8$^+$ (C) cells were discriminated according to the expression of CD4 and CD8 in CD3$^+$ cells. Tregs cells were identified in CD4$^+$ cells as CD127$^-$ CD25$^+$ FOXP3$^+$ (E). Finally, B cells and natural killer cells were selected on CD3$^-$ cells for their positivity for CD19 (F) and CD56 (G), respectively

used to identify myeloid and lymphoid immune subpopulations are described in Figures 1 and 2. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

2.4 | Statistical analysis

Data are expressed as median and interquartile range confidence intervals, and numbers with their frequencies. All comparisons were made using the nonparametric Mann-Whitney *U* test for unpaired data. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.2 (Graphpad Software). A $P < .05$ was considered as statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | Patients

Patients characteristics are described in Table 1. Nine consecutive MM patients were included in each group. Median age of patients was 56 (range, 37-66) years in the VTD-Dara group versus 66 (range, 50-67) years in the VTD group ($P = .01$). The two groups were comparable regarding gender and cytogenetic risk. The median follow-up among surviving patients was 20 (range: 7-30) months. All patients achieved at least partial response, and only one patient in the VTD group relapsed at five months. This patient presented a specific pericarditis and cutaneous plasmacytomas associated with a refractory MM and finally deceased despite various combinations of proteasome inhibitor, immunomodulatory drugs, and Dara. No other death was reported in this cohort of patients.

3.2 | Dara induces immunomodulatory effects on CD38-expressing immune cells

We first evaluated expression of CD38 on T, B, NK cells, monocytes, and DC in PBMC of newly diagnosed MM patients and healthy donors. We found similar levels of CD38 expression on myeloid and lymphoid immune cells from HD and MM patients (data not shown). Looking at the mean fluorescent intensity of CD38 on these cellular populations, we observed that plasmacytoid dendritic cells (pDC) expressed the highest levels of CD38, followed by subsets of classical monocytes, myeloid dendritic cells (mDC), and NK cells, while Tregs, and $CD4^+$ or $CD8^+$ T cells expressed the lowest levels of CD38 (Figure 3A).

We then performed a quantitative analysis of monocytes, DC, and lymphocyte subsets at baseline and at 4, 8, and 12 weeks of treatment. As previously reported, we observed a rapid and lasting depletion of NK cells ($P = .002$) after exposure with Dara (Figure 3B). However, Dara exposure

TABLE 1 Characteristics of patients

Group	Patient ID	Gender	Age	Isotype	Cytogenetic	ISS
VTD	1	Male	67	IgG Kappa	Normal	2
VTD	2	Female	66	IgG Lambda	Normal	3
VTD	3	Male	62	IgG Kappa	Normal	3
VTD	4	Female	61	IgG Kappa	Normal	1
VTD	5	Male	70	IgA Kappa	Monosomy 13	2
VTD	6	Female	66	IgG Kappa	Normal	1
VTD	7	Female	64	IgA Lambda	Normal	1
VTD	8	Female	67	IgG Lambda	t (11,14)	3
VTD	9	Female	50	IgG Kappa	Normal	1
VTD-Dara	10	Female	54	IgG Lambda	Normal	1
VTD-Dara	11	Female	56	IgG Kappa	Normal	1
VTD-Dara	12	Female	56	IgG Lambda	Normal	1
VTD-Dara	13	Male	42	IgG Kappa	Normal	1
VTD-Dara	14	Female	56	IgG Lambda	>3 abnormalities	1
VTD-Dara	15	Male	37	Lambda light chain	Normal	1
VTD-Dara	16	Female	62	IgG Kappa	Normal	1
VTD-Dara	17	Male	66	IgG Kappa	Normal	1
VTD-Dara	18	Male	57	IgG Lambda	t (4,14), del17p	2

Abbreviations: ISS, international stagingsystem; MM, multiple myeloma; VTD, bortezomib-thalidomide-dexamethasone; VTD-Dara, bortezomib-thalidomide-dexamethasone daratumumab.

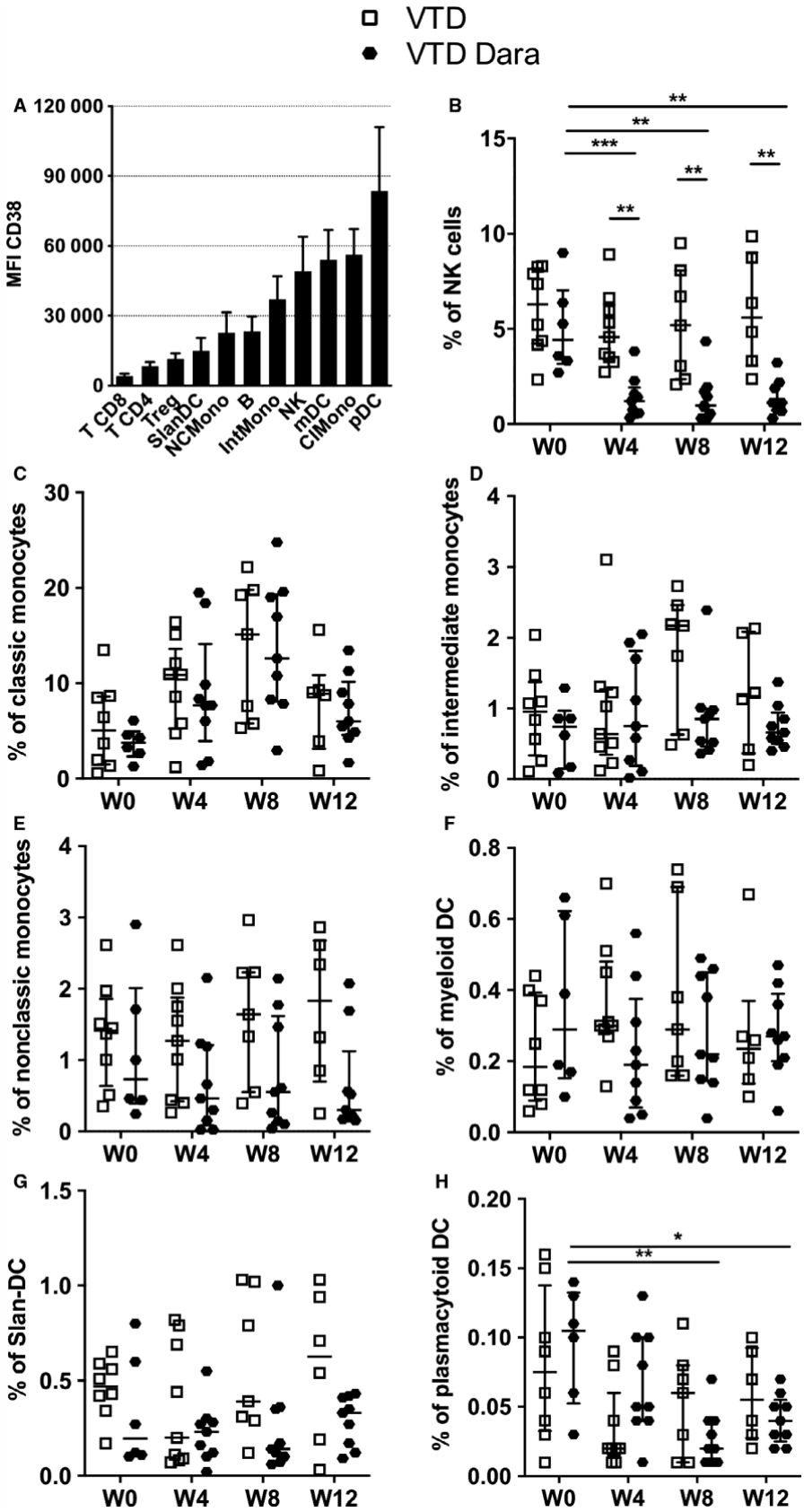

FIGURE 3 CD38 expression and effects of daratumumab on immune cell populations of multiple myeloma patients. Expression of CD38 in monocytes, dendritic cells, and lymphoid cells in healthy donors and in MM patients (A). Bars display the median CD38 MFI, and interquartile range confidence intervals (error bars) are shown. Proportions of (B) NK cells (CD3-CD56), (C) classical monocytes ($CD14^+$ $CD16^-$), (D) intermediate monocytes ($CD14^+$ $CD16^+$), (E) nonclassical monocytes ($CD14^-$ $CD16^+$), (F) myeloid dendritic cells ($CD1c^+$), (G) Slan-DC ($MDC8^+$), and (H) plasmacytoid dendritic cells ($CD123^+$ $BDCA2^+$) on MM patients' lymphocytes or PBMC under combined treatment. The median percentage of PBMC and interquartile range confidence intervals (error bars) are shown. Abbreviations: ClMono, classic monocytes; IntMono, intermediate monocytes; mDC, myeloid dendritic cells; MFI, mean fluorescent intensity; NCMono, nonclassical monocytes; NK, natural killer cells; pDC, plasmacytoid dendritic cells; Slan-DC, 6-sulfo LacNac dendritic cells

had no significant impact on monocytes, mDC, and 6-sulfo LacNAc-positive dendritic cells (Slan-DC) which expressed an intermediate level of CD38 (Figure 3C-G). Interestingly, in correlation with the strong expression of CD38 by pDC (Figure 3A), we observed a progressive and significant decrease of pDC ($P = .009$) in the VTD-Dara group (Figure 3H).

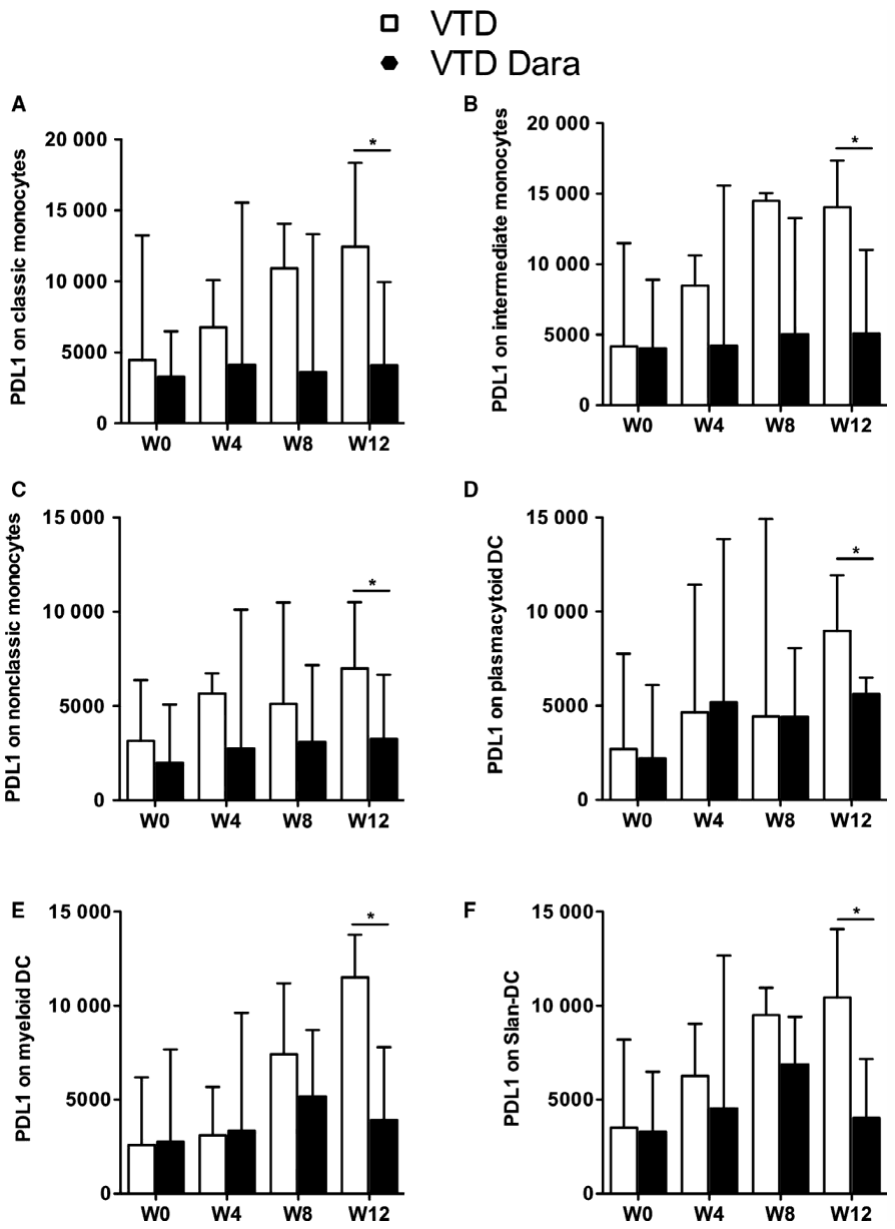

FIGURE 4 PD-L1 expression in monocytes and dendritic cells of MM patients. Expression of PD-L1 in (A) classical monocytes ($CD14^+$ $CD16^-$), (B) intermediate monocytes ($CD14^+$ $CD16^+$), (C) nonclassical monocytes ($CD14^-$ $CD16^+$), (D) plasmacytoid dendritic cells ($CD123^+$ $BDCA2^+$), (E) myeloid dendritic cells ($CD1c^+$), and (F) Slan-DC ($MDC8^+$) in MM patients at diagnosis and after four cycles of treatment. Bars display the median PD-L1 MFI, and interquartile range confidence intervals (error bars) are shown

3.3 | Dara prevents PDL1 expression on CD38-expressing antigen-presenting cells

To further understand the immunomodulatory activity of Dara, we investigated PD-L1 expression on the CD38-expressing antigen-presenting cells. While we observed a progressive increase of the PD-L1 expression in monocyte subsets for patients from the VTD group, PD-L1 expression remained stable in the VTD-Dara group. After three cycles of treatment, PD-L1 expression in monocyte subsets was significantly increased in VTD patients compared with patients in the VTD-Dara group (classical monocytes $P = .04$, intermediate monocytes $P = .04$, and nonclassical monocytes $P = .03$) (Figure 4A-C). Interestingly, we observed similar findings for DC subsets, with patients in the VTD group exhibiting significantly higher levels of PD-L1 expression compared with VTD-Dara patients, after three cycles of treatment (pDC $P = .03$, mDC $P = .01$, and Slan-DC $P = .02$) (Figure 4D-F).

4 | DISCUSSION

CD38 is a membrane molecule with receptor function involved in immune and metabolic functions.[18] Our results confirm the wide expression of CD38 on immune cells in MM patients and HD.[10] In addition to the well-known rapid depletion of NK cells, we found that Dara progressively decreased pDC which strongly expressed CD38. The absence of complete pDC depletion could be attributed to the continuous de novo pDC production. This is particularly interesting given the deleterious effect

of pDC in MM. Indeed, it has been shown that pDC confer a growth and survival advantage to MM cells.[19] More precisely, the pDC antitumor function, through the decrease of cytotoxic CD8 T-cell activation, is abolished by MM cells.[20] Therefore, the decreased number of pDC associated with the use of Dara suggests an additional mechanism of action of Dara through pDC depletion. Recently, Chen et al[12] demonstrated that CD38 upregulation in tumors induces resistance to PD-1/PD-L1 blocking antibodies and coinhibition of CD38 and PD-L1 improves antitumor immune response. Several studies have shown that PD-L1 is expressed on plasma cells but also on DC in the bone marrow, with a various intensity of PDL-1 expression among patients.[13-16,21] Furthermore, PD-L1-expressing pDC are increased and localized with PD-L1-positive MM cells in bone marrow.[19] Importantly, PD-L1 expression correlates with progression of disease, with the highest levels of expression in relapsed or relapsed/refractory MM.[14] Overall, this suggests that PD-L1 positive DC are important in the regulation of tumor-specific cytotoxic T-cell responses and contribute to attenuate antitumor immunity in MM patients. In our study, we found that while PD-L1 expression is increased on peripheral DC and monocytes during VTD treatment, combination with the anti-CD38 monoclonal antibody Dara seems to prevent this phenomenon. In fact, it has been reported that inflammation can lead to an increased expression of PD-L1 on DC, suggesting that inflammation induced by chemotherapy could be responsible for the increase PD-L1 expression observed in the control group upon treatment.[22] In contrast, in the Dara group, as DC subsets are continuously depleted by Dara, we hypothesized that the low PD-L1 expression was the reflect of the expression level on de novo produced DC. Given the important expression of Fc receptors (FcR) on DC,[23] we cannot exclude that the anti-CD38 monoclonal antibody may react simultaneously on the same cell via their binding site and also via FcR by implementing the so-called scorpion effect.[24] Nevertheless, ultimately, we observed a depletion of the DC in our patients upon Dara treatment. Overall, this suggests that targeting CD38 in MM may contribute to restore antitumor immune response mediated by DC and cytotoxic T cells, through a continuous depletion of these cell subsets, preventing PD-L1 upregulation.

Combination of anti-CD38 monoclonal antibodies and PD-1/PD-L1 blockade to improve disease response was also recently suggested by Verma et al[25] They reported that PD-1 blockade in subprimed CD8 cells induced dysfunctional PD-1^{+}CD38^{hi}CD8^{+} cells and anti-PD1 resistance that may be reverted by the use of anti-CD38 monoclonal antibodies.

Finally, despite a limited number of patients and lack of in vitro mechanistic studies, our results suggest new mechanisms of action of Dara through (a) depletion of pDC and (b) prevention of PD-L1 expression upregulation on immune cells. Our finding provides new evidences for development of therapeutic strategies targeting both CD38 and PD-L1/PD-1 pathway in patients with MM.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Association for Training, Education and Research in Hematology, Immunology and Transplantation for the generous and continuous support to the research work. The authors also thank the clinical teams who provided care for the study patients and the members of the study team at the Centre de Recherche Saint-Antoine for their dedication to this study.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing financial interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All authors listed on the manuscript have contributed substantially to this work: NS, BG, MM and FM designed the study, NS collected the data, ZM, MM and FM recruited the patients, NS, BG and LR performed experimental work, NS and FM performed the statistical analysis. NS and FM write the manuscript. All authors analyzed the data, reviewed the manuscript, and agreed to its submission for publication.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Laure Ricard https://orcid.org/0000-0003-4416-3285
Florent Malard https://orcid.org/0000-0002-3474-0002

REFERENCES

1. Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, et al. Targeting CD38 with daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2015;373(13):1207-1219.
2. Lonial S, Weiss BM, Usmani SZ, et al. Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet*. 2016;387(10027):1551-1560.
3. Plesner T, Arkenau H-T, Gimsing P, et al. Phase 1/2 study of daratumumab, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *Blood*. 2016;128(14):1821-1828.
4. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, et al. Daratumumab, bortezomib, and dexamethasone for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(8):754-766.
5. Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, et al. Daratumumab, lenalidomide, and dexamethasone for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(14):1319-1331.
6. Chari A, Suvannasankha A, Fay JW, et al. Daratumumab plus pomalidomide and dexamethasone in relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2017;130(8):974-981.
7. de Weers M, Tai Y-T, van der Veer MS, et al. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol*. 2011;186(3):1840-1848.
8. Overdijk MB, Verploegen S, Bögels M, et al. Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of the

therapeutic antibody daratumumab in lymphoma and multiple myeloma. *MAbs*. 2015;7(2):311-321.
9. Overdijk MB, Jansen JH, Nederend M, et al. The therapeutic CD38 monoclonal antibody daratumumab induces programmed cell death via Fcgamma receptor-mediated cross-linking. *J Immunol*. 2016;197(3):807-813.
10. Krejcik J, Casneuf T, Nijhof IS, et al. Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*. 2016;128(3):384-394.
11. Casneuf T, Xu XS, Adams HC, et al. Effects of daratumumab on natural killer cells and impact on clinical outcomes in relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood Adv*. 2017;1(23):2105-2114.
12. Chen L, Diao L, Yang Y, et al. CD38-mediated immunosuppression as a mechanism of tumor cell escape from PD-1/PD-L1 blockade. *Cancer Discov*. 2018.
13. Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7–H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN-{gamma} and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood*. 2007;110(1):296-304.
14. Tamura H, Ishibashi M, Yamashita T, et al. Marrow stromal cells induce B7–H1 expression on myeloma cells, generating aggressive characteristics in multiple myeloma. *Leukemia*. 2013;27(2):464-472.
15. Paiva B, Azpilikueta A, Puig N, et al. PD-L1/PD-1 presence in the tumor microenvironment and activity of PD-1 blockade in multiple myeloma. *Leukemia*. 2015;29(10):2110-2113.
16. Ray A, Das DS, Song Y, et al. Targeting PD1-PDL1 immune checkpoint in plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells, natural killer cells and multiple myeloma cells. *Leukemia*. 2015;29(6):1441-1444.
17. Sponaas A-M, Moharrami NN, Feyzi E, et al. PDL1 expression on plasma and dendritic cells in myeloma bone marrow suggests benefit of targeted anti PD1-PDL1 therapy. *PLoS ONE*. 2015;10(10):e0139867.
18. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev*. 2008;88(3):841-886.
19. Chauhan D, Singh AV, Brahmandam M, et al. Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. *Cancer Cell*. 2009;16(4):309-323.
20. Leone P, Berardi S, Frassanito MA, et al. Dendritic cells accumulate in the bone marrow of myeloma patients where they protect tumor plasma cells from CD8+ T-cell killing. *Blood*. 2015;126(12):1443-1451.
21. Jelinek T, Hajek R. PD-1/PD-L1 inhibitors in multiple myeloma: The present and the future. *Oncoimmunology*. 2016;5(12):e1254856.
22. Carenza C, Calcaterra F, Oriolo F, et al. Costimulatory molecules and immune checkpoints are differentially expressed on different subsets of dendritic cells. *Front Immunol*. 2019;10:1325.
23. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol*. 2007;96:179-204.
24. Malavasi F, Faini AC. Mechanism of action of a new anti-CD38 antibody: enhancing myeloma immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2019;25(10):2946-2948.
25. Verma V, Shrimali RK, Ahmad S, et al. PD-1 blockade in subprimed CD8 cells induces dysfunctional PD-1(+)CD38(hi) cells and anti-PD-1 resistance. *Nat Immunol*. 2019;20(9):1231-1243.

How to cite this article: Stocker N, Gaugler B, Ricard L, et al. Daratumumab prevents programmed death ligand-1 expression on antigen-presenting cells in de novo multiple myeloma. *Cancer Med*. 2020;00:1–8. https://doi.org/10.1002/cam4.2827

Résumé : La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (Allo-CSH) est à ce jour l'unique thérapie cellulaire curative pour de nombreux patients atteints d'hémopathies malignes. Le développement d'une prophylaxie de la maladie aiguë du greffon contre l'hôte (GvHD) par administration intraveineuse de cyclophosphamide après la greffe (PTCy) a permis le développement de l'utilisation des donneurs haploidentiques (Haplo-CSH). Le PTCy, induit une altération fonctionnelle des lymphocytes T alloréactifs, sans effet toxique sur les cellules souches hématopoïétiques. Nous avons mis en évidence que le PTCy était associé à un retard durable de la reconstitution lymphocytaire T γ/δ, jusqu'à 1 an après Haplo-CSH. Ce délai à la reconstitution lymphocytaire T γ/δ étant associé à un risque accru de présenter une augmentation de la charge virale EBV au décours de l'Haplo-CSH. De plus, nous avons mis en évidence que le traitement préemptif par rituximab dès l'augmentation de la charge virale EBV, induisait un retard à la reconstitution des lymphocytes B, des hypogammaglobulinémies profondes et un risque élevé de neutropénies liées au rituximab. Ces travaux de recherche sur la reconstitution immunitaire révèlent des effets immunomodulateurs méconnus de différentes stratégies thérapeutiques après Allo-CSH. En effet, si les résultats du PTCy en prophylaxie de la GvHD aiguë après Haplo-CSH et de l'administration préemptive de rituximab après infection EBV d'autre part sont indiscutables ; une meilleure connaissance des effets directs sur les effecteurs immunitaires reste nécessaire pour en limiter la toxicité et en optimiser les usages.
Mots clés : Reconstitution immunitaire, Lymphocytes T Gamma-Delta, Epstein-Barr virus, Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, Hématologie.

Abstract: Allogeneic hematopoietic cell transplantation (Allo-HCT) is to date the only curative cell therapy for many patients with hematologic malignancies. The development of acute graft-versus-host disease (GvHD) prophylaxis by intravenous administration of post-transplant cyclophosphamide (PTCy) has enabled the increasing use of haploidentical donor grafts (Haplo-HCT). PTCy, induces a functional impairment of alloreactive T cells, without toxic effects on hematopoietic stem cells. We show that PTCy has a significant and lasting impact on γ/δ T cell reconstitution, up to 1 year after Haplo-HCT. Furthermore, this delay in γ/δ T cell reconstitution directly correlates with an increased risk of developing an increase in EBV viral load after Haplo-HCT. Nevertheless, we find preemptive treatment of increase in EBV viral load with rituximab, induces a delay in the reconstitution of B cells, deep hypogammaglobulinemia and a high risk of rituximab-related neutropenia. This research work on immune reconstitution reveals unrecognized immunomodulatory effects of different therapeutic strategies after Allo-HCT. Indeed, if the results of PTCy in prophylaxis of acute GvHD after Haplo-HCT and of the preemptive administration of rituximab after EBV infection on the other hand are indisputable; better knowledge of the direct effects on immune effectors remains necessary to limit toxicity and optimize uses.
Keywords: Immune reconstitution, Gamma-Delta T Cells, Epstein-Barr virus, Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Hematology.