



HAL
open science

Etude des altérations fonctionnelles du système immunitaire des sujets immunodéprimés

William Mouton

► **To cite this version:**

William Mouton. Etude des altérations fonctionnelles du système immunitaire des sujets immunodéprimés. Immunologie. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1101 . tel-04166716

HAL Id: tel-04166716

<https://theses.hal.science/tel-04166716v1>

Submitted on 20 Jul 2023

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.



N°d'ordre NNT :
2022LYSE1101

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 341
E2M2 - Evolution écosystèmes microbiologie modélisation

Spécialité de doctorat : Micro-organismes, interactions, infections
Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 29/06/2022, par :

William Mouton

**Etude des altérations fonctionnelles du
système immunitaire des sujets
immunodéprimés**

Devant le jury composé de :

Pr MARTIN-BLONDEL Guillaume, PU-PH - Université de Toulouse
Pr DIDIERLAURENT Arnaud, Pr assistant - Université de Genève
Pr KORGANOW Anne-Sophie, PU-PH - CHRU Strasbourg
Pr ADER Florence, Université Claude Bernard Lyon 1
Dr DUFFY Darragh, Institut Pasteur Paris

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Présidente
Invité

Dr TROUILLET-ASSANT Sophie, UCBL1
Dr BRENGEL-PESCE Karen, LCR HCL-Biomérieux, Lyon

Directrice de thèse
Co-directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Aux professeurs Guillaume MARTIN-BLONDEL et Arnaud DIDIERLAURENT,

Je vous remercie de l'honneur que vous m'avez fait en acceptant d'être rapporteur de ce travail et de participer à ce jury. Vos expériences respectives sur les pathologies infectieuses et l'immunologie valorisent grandement le jugement de ce travail. Les critiques établies lors de vos rapports ont permis d'améliorer la qualité du manuscrit final. Soyez assurés de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

Au professeure Anne-Sophie KORGANOW,

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté d'être examinatrice de ce travail et de participer à mon jury. Vos connaissances sur les maladies auto-immunes et les déficits immunitaires me sont d'un grand intérêt pour le jugement de mon travail de thèse, elles offriront de nombreuses remarques et discussions qui seront également bénéfiques pour la suite de ma carrière professionnelle.

Au professeure Florence ADER,

C'est un grand plaisir pour moi de te compter parmi les membres du jury de cette thèse. Ton expertise clinique dans le domaine de la greffe de cellules souches hématopoïétiques et des maladies infectieuses valorise grandement le jugement de ce travail. Merci pour tes conseils, tes encouragements et ton point de vue clinique avisé que tu m'as accordé au cours de nos multiples échanges tout au long de mon projet de thèse. Ils m'ont permis de développer mes connaissances sur la transplantation de cellules souches et sur la réponse immunitaire des patients immunodéprimés. Je tenais également à te remercier sincèrement de la confiance que tu m'as accordé pour la gestion technique du projet FIGHT, j'espère avoir répondu aux différentes attentes et enfin je voulais te dire merci de me permettre de poursuivre ces travaux ainsi que pour nos futures collaborations qui seront je l'espère, remplies de succès scientifiques.

Au docteur Darragh Duffy,

Je vous remercie très sincèrement d'avoir accepté de participer à ma soutenance de thèse et d'apporter vos nombreuses connaissances sur la réponse immunitaire, particulièrement concernant les tests immunitaires fonctionnels. Vos différentes études ont été pour moi une grande source d'inspiration et je suis sincèrement honoré de vous compter en tant que membre de mon jury de thèse. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Au docteur Karen BRENGEL-PESCE,

Karen, merci infiniment de m'avoir donné l'opportunité de faire partie de cette équipe mixte HCL-bioMérieux. Ces trois années ont été pour moi enrichissantes à tout point de vue, travailler avec toi et les équipes d'HEH et du SUD est un bonheur au quotidien qui m'a permis de m'épanouir professionnellement. Merci pour ton management dans sa globalité, tes conseils, tes suggestions, tes petits recadrages ou coup de booste lorsque c'était nécessaire et surtout pour ta sincérité, ta bienveillance et ta gentillesse. Nos discussions au cours de nos différents points, qu'ils soient techniques ou administratifs ont toujours été d'une grande aide pour moi, et bien que le temps manquait parfois ils m'ont toujours permis de repartir de l'avant. A titre plus personnel, je dois quand même t'avouer que je t'en veux un peu de m'avoir forcé la main pour certaines réunions et vidéos à faire où je me retrouvais devant des caméras pour finir en ligne devant X personnes !! 😊 À vrai dire avec du recul, ces expériences m'ont permis de comprendre que j'en ai la capacité et cela me sera grandement bénéfique pour le futur. Merci sincèrement, avec Sophie et toi, j'ai eu beaucoup de chance d'avoir des directrices de thèse aussi bienveillantes pour mon encadrement et je vous en serai toujours reconnaissant.

Au docteur Sophie TROUILLET-ASSANT,

Sophie, Sophie, Sophie... Je ne sais même pas par où commencer et un simple merci ne suffirait clairement pas pour exprimer toute la gratitude que j'ai pour toi ! C'est un réel bonheur de travailler avec toi... Bon il faut avouer que parfois c'est plutôt éreintant mais au moins on ne s'ennuie jamais ! Comme tu le dis si bien « avec moi c'est tout ou rien » et pour le coup je pense que le courant est tout de suite bien passé entre nous, que ce soit au niveau professionnel ou personnel ! Il faut tout de même avouer que parfois il faut réussir à te suivre avec tes phrases incomplètes et tes fameux « **Tac Tac Tac** » ou autre « **Bim Bam** » et j'en passe ! Et surtout le fameux « **on est large** » dont je me souviendrais probablement à vie ! Mes plus plates excuses pour les derniers jours avant le rendu de thèse qui auront été épuisants pour nous deux, et même si j'ai pour l'instant, comme tu t'en doutes du mal à les apprécier, nos deux soirées chips/olives deviendront probablement de bons souvenirs. Pour résumer même si cela ne suffit pas, je tenais à te remercier sincèrement pour tout ce que tu as fait pour moi, depuis notre rencontre en 2014 tu m'as toujours tiré vers le haut, tu m'as poussé à reprendre mes études avec l'EPHE, puis à continuer sur la thèse malgré mon importante réticence. Tu m'as surtout permis de prendre conscience que j'en étais capable et tu m'as fait confiance dès les premiers instants. Pour faire une « bonne » thèse il faut du travail et du courage, certes, mais il faut également une bonne directrice de thèse et honnêtement je crois que je ne pouvais pas espérer mieux... C'est un plaisir de pouvoir travailler à tes côtés et j'espère que cela continuera encore de nombreuses années... enfin si tu arrives encore à me supporter !!! 😊 Merci pour tout So.

A mes collègues

Je tenais à remercier chaleureusement chacune des personnes que j'ai côtoyé et avec lesquelles j'ai pu travailler durant cette thèse. Merci pour votre aide, votre soutien, vos conseils et votre bonne humeur qui m'ont permis de m'épanouir professionnellement au cours de ces trois dernières années. A mes premières compagnonnes de bureau : **Marine** et **Audrey**, alias Tic et Tac, merci pour votre accueil au bureau, votre gentillesse débordante et votre soutien sans faille, néanmoins Marine je ne te remercie pas pour les musiques ou autre folklore pendant les fêtes de fin d'année 😊 ! **Laurence**, merci pour ta bonne humeur au quotidien et ton aide au laboratoire. **Guy**, merci infiniment pour nos nombreuses discussions stats, pour tes conseils, pour tout ce que tu as pu m'apporter au cours de mes différentes analyses et pour nos petites pauses en extérieur.

Sabrina, merci pour ton sourire au quotidien et pour tes anecdotes et histoires du midi, félicitation à la future maman. **Valérie**, merci pour toute ton aide au laboratoire et ta gentillesse, tu facilites clairement l'intégration des nouveaux arrivants au LCR et tu es toujours prête à aider peu importe la demande. Merci également pour ton soutien et ton importante aide en fin de thèse. **Sylvie**, merci pour tes conseils avisés, ton background scientifique et ton soutien, notamment à Lisbonne pendant l'ECCMID ! Bon, il faudra que l'on revoit notre Anglais pour les futures réunions avec la Chine mais ce n'est qu'un détail ! **François**, je n'ai rencontré que très peu de personnes avec autant de connaissances scientifiques et c'est toujours un plaisir de pouvoir échanger avec toi ! **Christelle**, merci pour ton aide au laboratoire pour les nombreuses manipulations d'IFA du projet FIGHT et plus particulièrement pour les fameux « Clickit ». **Kahina**, merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur au quotidien, courage pour ton EPHE, je serais là pour t'aider et te soutenir sur la fin comme tu as pu le faire pendant ma thèse et j'espère que l'on continuera de travailler ensemble encore un moment car c'est un réel plaisir de t'avoir comme collègue. **Carla**, bon courage pour ta thèse mais ne t'en fait pas tu es très bien encadrée ! Merci également pour les bons moments de rire avec tes traductions approximatives du Français ! **Bouchra**, merci pour tes petits coups de pouce au labo et pour ta gentillesse.

Un grand merci à la TEAM IFA et Truculture, **Chloé** et **Mathilde**, j'ai énormément appris à vos côtés pendant ma thèse et vous avez grandement contribué à sa réussite. **Mathilde** merci infiniment pour ta formation et ton accueil en début de thèse, tu as su vite me mettre en confiance et me confier les rênes du projet FIGHT, tu es une personne brillante et a été une collègue formidable. **Chloé**, merci pour ta bonne humeur permanente, ton aide a été précieuse pour moi, et surtout merci pour les cours de Partek et d'IPA 😊. Je vous souhaite uniquement le meilleur dans vos vies pro et perso, changez rien vous êtes au top !

Merci également à tous mes collègues du LCR à HEH qui m'ont épaulé pendant ces trois ans, mention spéciale à **Babeth** pour la cytométrie et **Marie-angélique** pour les réunions IFA. **Maxime**, un énorme merci pour ton aide au niveau de mes analyses stats au cours de mes différents projets, je te souhaite le meilleur pour ta thèse !

Jean-François et **Aurore** merci pour nos différentes discussions scientifiques toujours enrichissantes, **Aurore** également un grand merci pour ta relecture de thèse, tu as pris du temps pour moi et je t'en suis sincèrement reconnaissant !

Je tenais également à remercier l'ensemble des étudiants et stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer ou d'aider de près ou de loin pendant ma thèse. Mention spéciale pour **Alexis**, **Lucille** et **Loïc** en espérant ne pas vous avoir trop fait souffrir pendant nos quelques mois passés ensemble ;)

Anne, merci pour ton aide au cours de notre étude VaccHemInf FIGHT, pour tes conseils et tes connaissances cliniques qui ont été pour moi d'une grande aide. Cela a également été un plaisir de rédiger avec toi nos différents articles, nos réunions ont toujours été agréables et enrichissantes, bon il faut avouer que parfois elles étaient également longues et fatigantes notamment nos nombreuses demi-journées passées à éplucher les dossiers cliniques des patients et notre fameux eCRF ! Je te souhaite bon courage pour la dernière ligne droite de ta thèse et j'espère que nos futures collaborations resteront sur la même dynamique que celle des derniers mois !

Je tenais à remercier l'ensemble des membres de l'équipe **OIP** de bioMérieux pour leur accueil et leur sympathie.

Un grand merci aux membres du CBS pour leur aide au cours de mes différentes manips de thèse, **Marine V.** pour la cytométrie en flux et **Jimmy**, **Isabelle**, **Pauline** et **Jonathan** pour mes analyses sur Nanostring.

Enfin, un grand merci aux membres du CIRI notamment de l'équipe Virpath à Laennec, merci pour votre accueil au sein de votre équipe et pour votre gentillesse. Plus spécifiquement au professeur **Bruno Lina** merci de m'avoir permis de rejoindre votre structure, à **Olivier** merci pour ton aide dès le début de cette thèse et à **Manuel** et **Andres** merci pour nos différentes réunions scientifiques et notre petite soirée rédaction pour le J Exp Med 😊. Également un grand merci à **Thierry W.** au CIRI, pour son expertise, ses conseils avisés et son immense sympathie, c'est un plaisir de pouvoir travailler auprès de chercheurs comme toi.

A mes amis

Je tenais à tous vous remercier pour votre soutien et vos encouragements au cours de cette thèse. Merci pour nos différents moments/soirées qui m'ont permis de me vider l'esprit et de relâcher la pression quand c'était nécessaire. Bon, il faut avouer que parfois ça devait être dur et long pour vous de m'entendre parler de cette thèse à chaque instant, plus particulièrement sur la fin... Et encore une fois NON je ne cherche pas de vaccins ! 😊 De peur d'oublier quelqu'un je ne préfère pas citer de nom spécifiquement mais mes amis (ils se reconnaîtront), ma famille de cœur, je vous remercie très sincèrement du plus profond de mon être.

A ma famille

Dans un premier temps à ma belle-famille, **Eric, Lydie et Salomé** merci pour votre soutien sans faille et votre bienveillance permanente.

A **Nadine** et **Bruno** mes parents... merci pour tout, pour votre éducation, pour vos valeurs et surtout pour votre amour... J'espère vous rendre fière au travers ce parcours professionnel et dans ma vie de tous les jours, je vous aime. Merci à **Samantha** ma grande sœur, pour ton aide et ton soutien, tu as toujours été là pour moi dans les bons comme les mauvais moments et je t'en suis sincèrement reconnaissant. Merci pour ta relecture (désolé mais tu vas encore avoir du boulot ^^) et pour être venue me donner la main lors de « l'ultime » soirée jusqu'à deux heures du matin. Vous avoir auprès de moi avec **Olivier** et mes deux nièces **Kélya** et **Élyna** est un bonheur quotidien. Merci également aux différents membres de ma famille qui m'ont apporté encouragement et force, avec une mention spéciale pour **Claude** et **Georges** ma marraine et mon oncle en corse qui ont su susciter ma curiosité et ma soif d'apprendre depuis de nombreuses années.

Enfin je terminerais ces remerciements par la personne qui me soutient et me supporte depuis maintenant plus de 13 ans. **Gwladys**, ma chérie, merci pour tout ce que tu fais pour moi, cette thèse n'a pas dû être simple à gérer pour toi également et je suis conscient des sacrifices que tu as fait pour me permettre de réussir, je te serais éternellement reconnaissant pour ça. Merci également de m'avoir entraîné, non sans peine, à l'autre bout du monde. Finalement cette expérience à deux aura complètement changé ma vie et ma façon d'être et je n'en serais pas là sans ton abnégation et ton courage pour me pousser à avancer.

Merci de m'avoir remonté les bretelles pour avoir hésité à faire cette thèse et pour m'avoir fait comprendre que je pouvais et que je devais le faire, sans toi je pense que j'aurais laissé tomber depuis longtemps. Mon amour, tu es un pilier dans ma vie et surtout tu m'as offert ma huitième merveille du monde, notre fils **Swen** qui nous comble de bonheur au quotidien. Je vous aime de tout mon cœur.

*« Pour réussir dans le
monde, retenez bien
ces trois maximes :
voir, c'est savoir ;
vouloir, c'est
pouvoir ; oser, c'est
avoir. »*

Alfred De Musset

RESUME

En 2022, le questionnement sur les capacités du système immunitaire à répondre à une infection ou un vaccin, est au centre de l'attention de la communauté scientifique. L'immunodépression est un état d'affaiblissement des capacités du système immunitaire causé par une altération primitive ou secondaire, de tout ou partie de ses composants. Indépendamment de son origine, cette altération plus ou moins durable du système immunitaire induit une sensibilité accrue aux infections et une importante morbi-mortalité associée. La mesure de la réponse immunitaire fonctionnelle est essentielle afin de guider et optimiser la prise en charge des patients immunodéprimés. Néanmoins, les outils quantitatifs et phénotypiques traditionnels en laboratoire de routine ont montré certaines limites et ne reflètent que partiellement la complexité du système immunitaire. Les tests immunitaires après stimulation cellulaire *ex vivo* (IFA par leur acronyme anglophone de « Immune Functional Assays ») permettent, d'évaluer les interactions des différents composants du système immunitaire et d'appréhender de potentiels dysfonctionnements.

Dans ce travail, nous avons tout d'abord confirmé la reproductibilité et la robustesse d'un IFA standardisé sur sang-total chez des volontaires sains, en analysant la réponse transcriptomique post-stimulation à l'aide d'une signature de 44 gènes reliés à la réponse immunitaire. Ensuite, en utilisant cet outil dans une cohorte de patients immunodéprimés receveurs d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), nous avons mis en évidence une reconstitution immunitaire fonctionnelle incomplète à 6 mois post transplantation. De plus, 17 gènes présentant un défaut d'expression et associés à une réactivation d'un herpèsvirus ont été identifiés. Cette altération immunitaire fonctionnelle n'était pas mise en évidence par des tests quantitatifs et phénotypiques classiques. Au regard de l'impact négatif des réactivations virales à herpèsvirus chez les patients immunodéprimés, nous avons ensuite évalué au sein de la même cohorte, l'intérêt des IFA pour l'optimisation des prophylaxies vis-à-vis du virus Varicelle Zona (VZV) qui représente une cause majeure de morbidité après une allogreffe de CSH. Nous avons développé un IFA sur sang-total basé sur l'analyse après stimulation de l'expression du gène de l'IFN- γ après stimulation par le VZV. Cette analyse reflète la capacité de la réponse immunitaire à médiation cellulaire, élément clé du contrôle de l'infection virale et qui est plus spécifique que les marqueurs sérologiques, dont l'interprétation est parfois débattue. Enfin, comme l'immunité spécifique des lymphocytes T est essentielle dans le contrôle des infections virales, nous avons également développé un IFA semi-automatisé sur sang-total post-stimulation avec des peptides du SARS-CoV-2, pour évaluer la réponse immunitaire cellulaire T spécifique grâce à la mesure de la sécrétion d'IFN- γ . Ce test est standardisé et adapté à une utilisation en routine clinique.

Nos travaux suggèrent que la mise en place de tests robustes reflétant le statut immunitaire fonctionnel ou permettant la mesure de la mémoire cellulaire offre de nombreuses perspectives dans la gestion du risque infectieux des patients immunodéprimés.

Mots clés : Immunodépression ; Déficits immunitaires ; Test immunitaire fonctionnel ; Réponse de l'hôte ; Outil de monitoring de l'immunité ; Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

SUMMARY

In 2022, the ability of the immune system to respond to an antigenic, infectious, or vaccine stimulus became a central question within the scientific community. Immunosuppression is a state in which the immune system is weakened due to an alteration, either primary or secondary, of all or parts of its components. Regardless of its origin, this more or less lasting immune system alteration induces an increased sensitivity and a significant morbidity and mortality linked to infections. Measuring the functionality of the immune response is therefore essential to guide and optimize the management of immunocompromised patients. Nevertheless, quantitative and phenotypic tools traditionally used in routine laboratories have shown some limitations and only partially reflect the complexity of the immune system. *Ex vivo* stimulation tests, called Immune Functional Assays (IFA) enable to evaluate the functionality of the immune system, and can be used to assess the interactions between its various components as well as potential dysfunctions.

In this work, we first confirmed the reproducibility and robustness of a standardized whole blood IFA, by analyzing the post-stimulation transcriptomic response of healthy volunteers, using a 44-gene immune response-related signature panel. Then, using this tool in a cohort of immunocompromised patients having received an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), we highlighted an incomplete functional immune reconstitution at 6 months post-transplantation. In addition, 17 genes with an expression defect and associated with the reactivation of Herpesvirus have been identified. This functional immune alteration was not captured using traditional quantitative and phenotypic tests. Given the negative impact of Herpesvirus viral reactivation in immunocompromised patients, we then evaluated within the same cohort, the interest of IFA for prophylaxis optimization against Varicella Zoster virus (VZV) which is a leading cause of morbidity after allo-HSCT. We developed a whole blood IFA, based on the IFN- γ gene expression analysis, post VZV stimulation. This analysis reflects the capacity of the cell-mediated immune response, which is a key controller of viral infection and is more specific than serological markers, the interpretation of which is sometimes debated. As specific T-cell immunity is essential in the control of viral infections, we also designed a semi-automated whole blood IFA post SARS-CoV-2 peptide stimulation, to assess the specific T-cell immunity through the measurement of IFN- γ secretion. This test is standardized and suitable for use in clinical routine.

Our work suggests that the establishment of robust tests reflecting the functional status of the immune system or allowing the measurement of cellular memory offers many perspectives regarding the management of infectious risk in immunocompromised patients.

Key words: Immunosuppression; Immunodeficiency; Immune Functional Assay; Host response; Immune monitoring; Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation.

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT

Cette thèse a été préparée au sein du Centre International de Recherche en Infectiologie –
INSERM U1111 – CNRS UMR5308 – ENS Lyon – Université Lyon 1, équipe « VirPath -
Virologie et Pathologies humaines »

Adresse postale du laboratoire :

CIRI – INSERM U1111

Faculté de Médecine Lyon-Est

7, rue Guillaume Paradin

69372 LYON CEDEX 8 - France

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABBRÉVIATIONS	17
INTRODUCTION GENERALE	21
REVUE DE LA LITTERATURE	25
1. L'immunodépression	25
1.1. Définition	25
1.2. Historique.....	26
1.3. Les déficits immunitaires primitifs.....	28
1.3.1. Description	28
1.3.2. Classification.....	29
1.3.3. Incidence	30
1.4. Les déficits immunitaires secondaires	31
1.4.1. Description	31
1.4.2. Incidence	32
1.5. Le risque infectieux dans l'immunodépression	36
1.6. Les altérations immunitaires dans l'immunodépression.....	40
1.6.1. La reconnaissance de l'antigène	41
1.6.2. La réponse inflammatoire	44
1.6.3. La fonction phagocytaire.....	45
1.6.4. L'activité NK.....	47
1.6.5. La réponse lymphocytaire	48
2. Un cas particulier de DIS – L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	60
2.1. Les cellules souches hématopoïétiques.....	60
2.2. La greffe de CSH	62
2.2.1. Dates marquantes et évolution.....	62
2.2.2. Activité de la greffe de CSH en France	64
2.3. L'allogreffe de CSH	64
2.3.1. Les chiffres de l'allogreffe de CSH en France	65
2.3.2. Procédure de l'allogreffe de CSH.....	67
2.4. Le risque infectieux dans l'allogreffe de CSH.....	80
2.4.1. Le risque infectieux au cours des différentes phases de reconstitution post-greffe	81
3. L'immunomonitoring.....	89
3.1. Paramètres de lecture statiques.....	89
3.1.1. Dosage d'anticorps	89
3.1.2. Numération cellulaire.....	91

3.1.3.	Immunophénotypage	92
3.2.	Tests immunitaires fonctionnels.....	95
3.2.1.	L'échantillon biologique	96
3.2.2.	Stimulant	98
3.2.3.	Méthode de lecture.....	101
3.2.4.	Revue scientifique	110
PROBLEMATIQUE		123
TRAVAUX PERSONNELS		129
1.	PREMIERE PUBLICATION : Towards standardization of Immune function	129
2.	DEUXIEME PUBLICATION : Transcriptomic analysis reveals distinct profiles of functional immune reconstitution at six-months after allo-HSCT.....	139
3.	TROISIEME PUBLICATION : A cross-sectional study of varicella zoster virus (VZV) specific cell-mediated immunity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation to enhance prevention of VZV reactivation.....	187
4.	QUATRIEME PUBLICATION : Specific detection of memory T-cells in COVID-19 patients using standardized whole-blood Interferon gamma release assay	217
DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION		231
A.	Tests immunitaires fonctionnels : Optimisation et standardisation	232
a.	L'échantillon biologique	232
b.	Le stimulant.....	234
B.	L'étude de l'immunité fonctionnelle représente-t-elle une plus-value par rapport aux tests d'immunomonitoring classiques ?	237
C.	Peut-on améliorer la gestion du risque infectieux en évaluant l'immunité fonctionnelle ?	240
ANNEXE 1		245
ANNEXE 2		263
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		287

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Ac : anticorps	DIP : déficits immunitaires primitifs
ADN : acide désoxyribo nucléique	DIS : déficits immunitaires secondaires
Ag : antigène	DLI : donnor lymphocyte infusion(s)
ALC : <i>absolute lymphocyte count</i>	ELISA : <i>enzyme-linked immunoSorbent assay</i>
ATG: antithymocyte globuline	EBV : virus d'Epstein-Barr
BCR : <i>B cell receptor</i>	GCSF : <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
CAM : complexe d'attaque membranaire	GMCSF : <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
CD : cluster de différenciation	GOF : <i>gain-of-function</i>
CDC : <i>centers for disease control and prevention</i>	GvHD : <i>graft vs. host disease</i>
CEREDIH : centre de référence pour les déficits immunitaires héréditaires	GvL : <i>graft vs. leukemia</i>
CFU-GM : <i>Colony-forming Unit-Granulocyte</i>	HHV6 : virus herpès humain-6
CLR : <i>C-Type Lectin Receptors</i>	HLA : <i>human leukocyte antigen</i>
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	HMGB1 : <i>high mobility group box 1</i>
CMV : cytomégalovirus	HSP : <i>heat shock protein</i>
ConA : concanavaline A	HSV : herpès simplex virus
CPA : cellules présentatrices d'antigènes	IFA : <i>immune fonctionnal assays</i>
CRP : protéine C réactive	IFI : infection fongique invasive
CSH : cellules souches hématopoïétique	IFN- γ : interféron gamma
CVC : cathéter veineux central	Ig : immunoglobulines
DAMP : <i>danger associated molecular pattern</i>	IL : Interleukine
DC : cellules dendritiques	IRAK : <i>IL-1 receptor associated kinase</i>
DCIS : déficit immunitaire combiné sévère	IRF : <i>interferon-β response factors</i>
DCIV : déficit immunitaire commun variable	IUIS : union internationale des sociétés immunologiques
	LAM/LAL : leucémie aiguë myéloblastique / lymphoblastique

LB : lymphocyte B

LNH : lymphomes non hodgkiniens

LOF : *loss-of-function*

LPD : *lymphoproliferative disease*

LPS : lipopolysaccharides

LRR : *leucine rich repeat*

LT : lymphocyte T

MO : moelle osseuse

MyD88 : réponse primaire de différenciation myéloïde 88

NFAT : facteur nucléaire des lymphocytes T activées

NF-κB : facteur nucléaire kappa B

NFS : numération de formule sanguine

NK : *natural killer*

NLR : *nod-like receptors*

OMS : organisation mondiale de la santé

ONU : organisation des nations unies

PAMP : *pathogen associated molecular patterns*

PBMC : *peripheral blood mononuclear cell*

PCR : *polymerase chain reaction*

PHA : phytohémagglutinine

PNN: polynucléaires neutrophiles

PTLD : *post-transplantation lymphoproliferative disorder*

PRR : *pattern recognition receptors*

RLR : *RIG-I-like receptors*

SAg : superantigen

SARS-Cov-2 : *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

SCID : immunodéficiences combinées sévères

SCN : *Staphylococcus* à coagulase négative

SEA / SEB : entérotoxine staphylococcique A / B

SI : système immunitaire

SIDA : syndrome de l'immunodéficiences acquise

SIS : syndrome d'immunodéficiences sévères (SIS)

SMD : myélodysplasie

SPEA : exotoxines pyrogènes streptococciques-A

TCR : *T-cell receptor*

TGF : *transforming growth factor*

TIR : *Toll/IL-1 receptor*

TLR : *Toll-Like Receptors*

TNF-α : facteur de nécrose tumorale alpha

Treg : lymphocytes T régulateurs

TREM-1L : *triggering receptor expressed on myeloid cells 1*

TRIF : *TIR-domain containing adaptor protein inducing interferon-β*

TSST-1 : toxine du syndrome de choc toxique

UV : ultraviolets

VEGF : vascular endothelial growth factor

VIH : virus de l'immunodéficiences humaine

VRS : virus respiratoire syncytial

VZV : virus varicelle-zona

Introduction Générale

INTRODUCTION GENERALE

L'immunodépression, que l'on peut définir comme une altération des défenses immunitaires affectant tout ou partie des composants du système immunitaire, touche environ 1/10^{ème} de la population mondiale. Elle peut être causée par une multitude de facteurs qui permettent de classer les sujets atteints dans deux grandes catégories nommées Déficit immunitaire primitif (DIP) ou secondaire (DIS). Le point commun à l'ensemble des personnes immunodéprimées est le risque infectieux associé, représentant l'une des causes majeures de mortalité.

Comprendre les altérations immunitaires est donc un enjeu crucial pour adapter les prophylaxies anti-infectieuses et restaurer les composants ou voies immunitaires altérés, via l'injection d'immunoglobulines, la transplantation de cellules souches ou la thérapie génique. Ainsi, il est nécessaire d'apprécier le degré d'immunodépression à l'aide d'outils capable d'identifier les composants/compartiments défaillants.

Or, les marqueurs traditionnels tels que les numérations des sous-types lymphocytaires, habituellement utilisés pour caractériser l'immunodépression, présentent de nombreuses limites. En effet, certains déficits immunitaires, primitifs ou secondaires peuvent engendrer des défauts phénotypiques ou fonctionnels des cellules, et ce, malgré une quantité normale. Suscitant ainsi le besoin de développer des tests fiables reflétant le statut fonctionnel de la réponse immunitaire des patients immunodéprimés.

Au cours de l'introduction bibliographique de ce manuscrit, nous présenterons dans un premier temps les déficits immunitaires, en mettant l'accent sur leur définition, leur classification, leur incidence, ainsi que sur le risque infectieux et la mortalité associé. Nous détaillerons également les principales altérations immunitaires décrites dans les différentes situations d'immunodépression. Ensuite, nous aborderons spécifiquement le contexte de la greffe de cellules souches hématopoïétique (CSH). En effet, ce traitement de référence des hémopathies malignes et non-malignes, représente un modèle d'étude unique pour appréhender les altérations immunitaires.

Avant la transplantation, les receveurs de CSH subissent un « reset » du système immunitaire, caractérisé par la perte du répertoire immunitaire spécifique, puis restent immunodéprimés sur de longues périodes chiffrables en mois voire en années, avec un profil de reconstitution immunitaire graduel et individuel. La description des altérations immunitaires chez ces patients a constitué l'un des axes principaux de mon travail de thèse.

Enfin, nous terminerons notre partie bibliographique sur les différents outils permettant d'évaluer le statut immunitaire, détaillant les principales limites de ces tests dans le monitoring des patients immunodéprimés. Certaines de ces limites peuvent être comblées par l'utilisation de tests immunitaires évaluant la fonction immunitaire après une stimulation *ex vivo*, nommé IFA de l'acronyme anglophone de « Immune Functional Assays ». Nous terminerons cette partie bibliographique par une revue scientifique publiée décrivant les principaux IFA, leurs domaines d'application et leur potentiel intérêt dans le contexte des déficits immunitaires secondaires hors-VIH.

Nous présenterons ensuite les résultats de nos travaux personnels qui ont porté sur l'évaluation d'un IFA standardisé sur sang-total, basé sur l'analyse de transcrits post stimulation par du lipopolysaccharide (LPS) et de l'entérotoxine staphylococcique B (SEB). Puis nous l'utiliserons pour caractériser la reconstitution immunitaire de receveurs l'allogreffe de CSH à 6 mois post transplantation. Nous présenterons également les résultats ayant porté sur l'évaluation de la mémoire immunitaire cellulaire spécifique du VZV et du SARS-CoV-2. Enfin, nous évaluerons dans chacun de nos axes de travail la valeur ajoutée des IFA comparée aux techniques classiques d'immunomonitoring.

Nous concluons sur l'implication et les perspectives de nos travaux dans la mise en place des tests immunitaires fonctionnels pour la prise en charge des patients immunodéprimés, notamment dans la gestion du risque infectieux.

Revue de la Littérature

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. L'immunodépression

1.1. Définition

Le système immunitaire (SI) est un ensemble de mécanismes et d'interactions complexes mis en place par l'hôte pour se défendre en réponse à tout élément extérieur (non-soi) reconnu comme pouvant perturber son homéostasie. Les éléments du non-soi ou antigènes (Ag), peuvent être des bactéries, champignons, virus, parasites, un greffon ou enfin des cellules cancéreuses. Le SI met en œuvre de nombreux organes, tissus, cellules et médiateurs solubles, chacun de ces composants ayant un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie.

La réponse de l'hôte à l'Ag est composée de trois principales lignes de défenses, les barrières physiques ; la réponse immunitaire innée, rapide et non-spécifique ; et la réponse immunitaire adaptative spécifique présentant des capacités de mémoire immunitaire. Chez une personne dite saine, la mise en place de cette réponse immunitaire entraînera l'élimination du corps étranger, présent au sein de l'organisme.

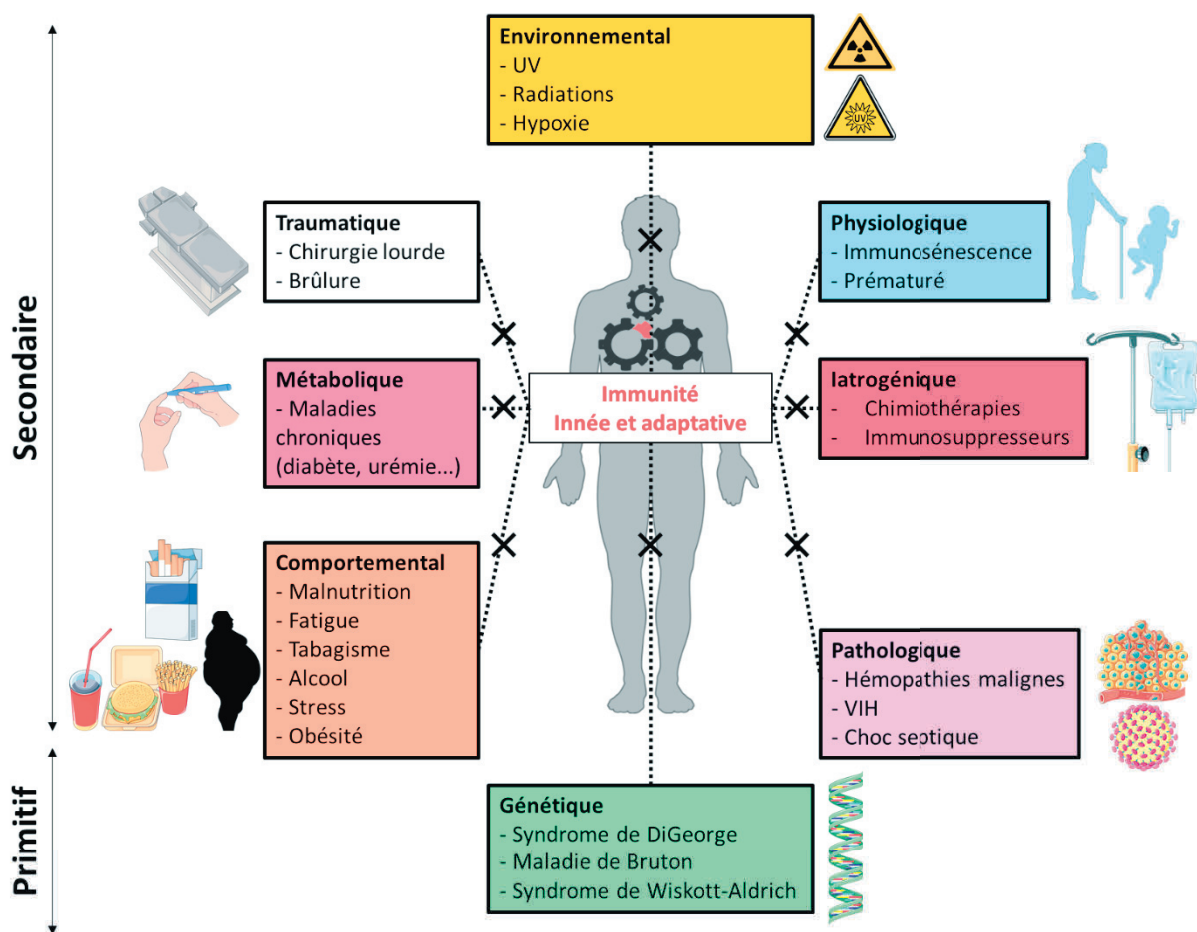
« Tous les mécanismes vitaux, quelques variés qu'ils soient, n'ont toujours qu'un but, celui de maintenir l'unité des conditions de la vie dans le milieu intérieur ». Claude Bernard, 1865

Certains individus peuvent néanmoins présenter des déficiences immunitaires, on parle alors d'immunodépression. Bien qu'il n'existe pas de définition officielle, l'immunodépression est décrite comme une altération des défenses immunitaires affectant tout ou une partie des composants du système immunitaire. Elle caractérise un état où le système immunitaire n'est plus capable de faire face aux agressions extérieures, rendant ainsi ces individus vulnérables à des conditions qui ne seraient pas préoccupantes pour des personnes en bonne santé. Indépendamment de l'origine causant l'immunodépression, cet affaiblissement des défenses immunitaires entraîne un risque infectieux particulièrement élevé chez l'ensemble des personnes immunodéprimées, faisant de ce paramètre l'un des diagnostics principaux de l'immunodépression. Les infections d'origine bactériennes, virales ou fongiques, représentent ainsi une cause majeure de morbi-mortalité chez les personnes immunodéprimées et sont généralement fréquentes, prolongées et inhabituelles ou anormalement sévères.

Les personnes immunodéprimées sont également plus à risque de développer de manière accrue des maladies auto-immunes (1–4) ou des cancers (5,6). La prise en charge de ces personnes immunodéprimées constitue alors un véritable enjeu de santé publique.

De multiples causes peuvent être à l'origine d'une immunodépression (**Figure 1**). Elles peuvent être d'origine génétique, on parle alors de déficits immunitaires primitifs (DIP); être induites par des facteurs extérieurs ou être la conséquence de maladies et de leurs traitements associés, on parle alors de déficits immunitaires secondaires (DIS).

Figure 1. Les différentes sources d'immunodépression – Source personnelle

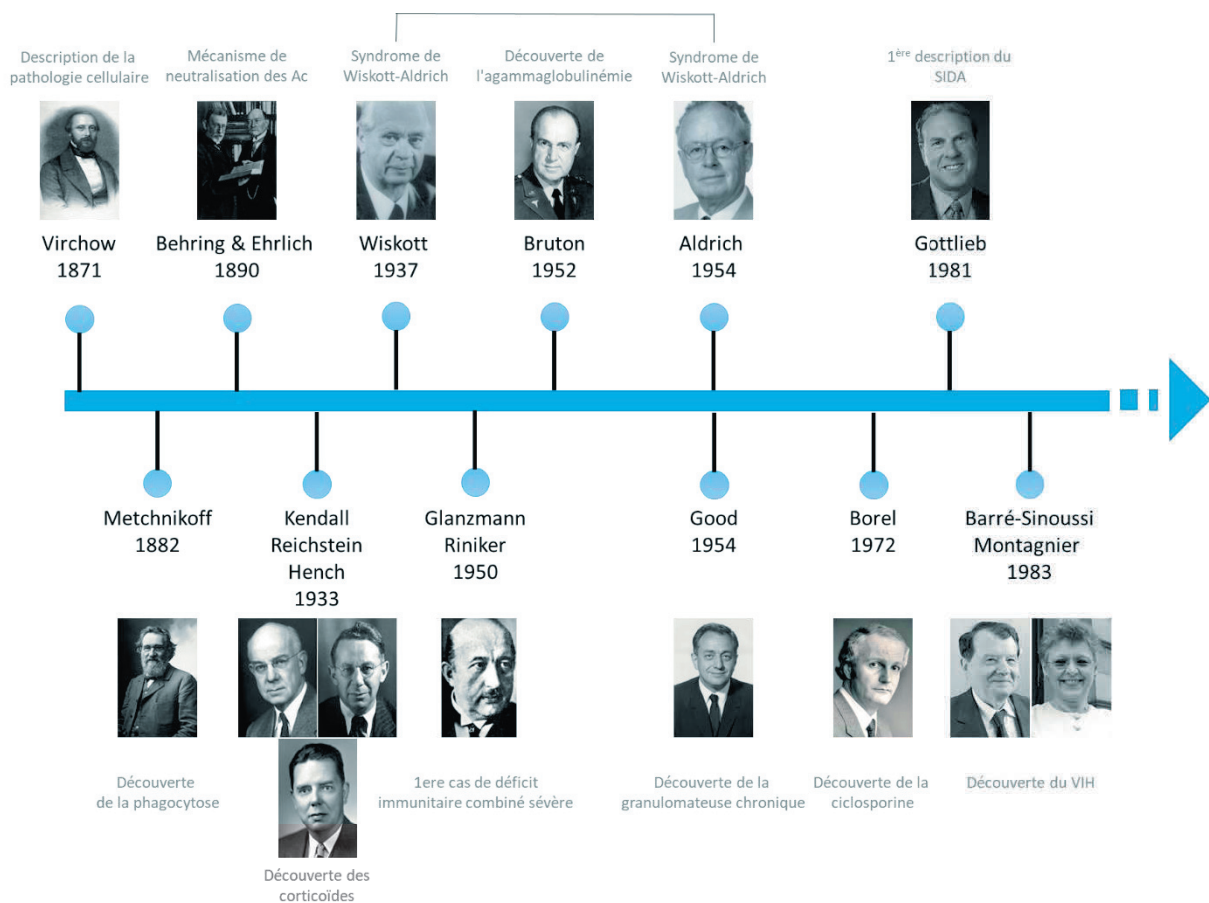


1.2. Historique

L'historique des découvertes associées à l'immunodépression est complexe étant donné le nombre important de facteurs pouvant conduire à cet état, quelques dates majeures peuvent néanmoins être soulignées (**Figure 2**). L'une des premières descriptions associables aux altérations immunitaires daterait de 1871 et serait l'œuvre de Rudolf Virchow (1821-1902).

Considéré comme le fondateur de la pathologie cellulaire, ses travaux supposaient que les maladies étaient le résultat d'un dysfonctionnement des cellules de notre corps. Dans une autre vision, Elie Metchnikoff met en évidence en 1882 le rôle critique de la phagocytose et de la destruction intracellulaire dans la défense de l'hôte (7), tandis que Behring et Ehrlich en 1890 soulignent l'activité cruciale des anticorps en contrepartie des activités toxiques des bactéries (8). Ces deux découvertes de la fin du XIXe siècle mettent en avant le rôle primordial des interactions étroites entre les facteurs de l'hôte et les agents pathogènes dans le contrôle de l'infection.

Figure 2. Historique des découvertes associées à l'immunodépression – Source personnelle



Il faut ensuite attendre le milieu du 20^{ème} siècle pour voir apparaître les premières descriptions de déficits immunitaires, principalement d'origines primitifs.

En 1937, Alfred Wiskott décrit au sein d'une fratrie un syndrome induisant une thrombopénie, des diarrhées sanglantes, de l'eczéma et des otites récidivantes. Ces observations seront confirmées dans d'autres familles en 1954 par Robert Aldrich, donnant à ce syndrome le nom de Wiskott-Aldrich.

En 1950, Eduard Glanzmann et Paul Riniker découvrent un lien entre l'absence de lymphocyte et des infections à *Candida albicans*. L'une des dates clés dans l'histoire des PID est la découverte en 1952 par Ogden Bruton de l'agammaglobulinémie liée à l'X. Enfin, en 1954 Robert Good découvre une maladie granulomateuse mortelle connue maintenant sous le nom de granulomatose septique chronique.

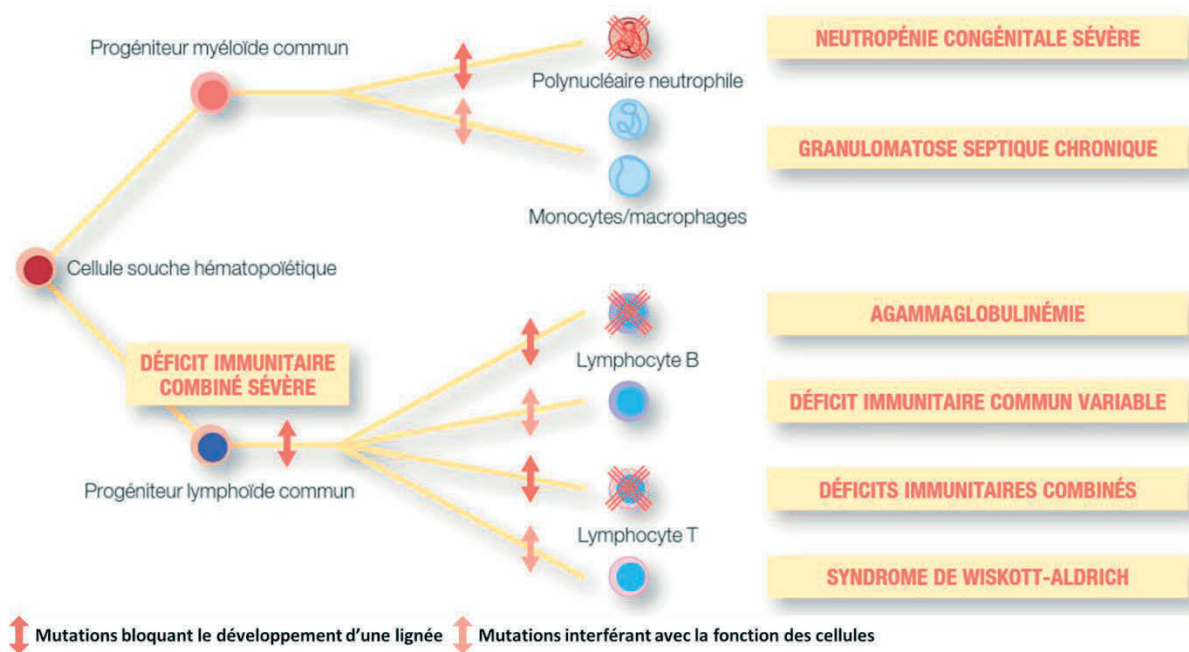
Si la découverte de nouveaux syndromes a rythmé la description des DIP, pour les DIS l'historique est plus disparate étant donné la diversité des facteurs extérieurs conduisant à un état d'immunodépression. Quelques dates majeures peuvent néanmoins être à retenir, notamment la découverte du Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA) en 1981, puis en 1983 du virus de l'immunodéficience Humaine (VIH) qui lui est associé (9), cause majeure d'immunodépression ayant causé la mort de plus de 36 millions de personnes dans le monde. L'avènement des traitements immunosuppresseurs tels que les corticoïdes en 1933 (10) et la ciclosporine en 1972 (11) a également été l'une des premières causes iatrogènes d'origine médicamenteuse des DIS.

1.3. Les déficits immunitaires primitifs

1.3.1. Description

Les déficits immunitaires primitifs regroupent un ensemble hétérogène d'environ 400 syndromes rares liés à des troubles génétiques altérant le fonctionnement du système immunitaire. Les DIP peuvent se révéler tout au long de la vie, mais sont généralement présents dès la naissance et dans la majorité des cas héréditaires. Les techniques de pointes de séquençage génétique ont permis une meilleure identification des DIP (12), passant d'une centaine de gènes altérés recensés dans les années 2000 (13) à environ 450 gènes à ce jour (14,15). Il s'agit de gènes codants pour des protéines ayant des rôles centraux dans le développement, l'entretien et la fonction des cellules et des différents composants du système immunitaire. Leur mutation entraîne une perte d'expression, une perte ou un gain de fonction (LOF et GOF, de l'anglais *loss-gain of function*) (**Figure 3**).

Figure 3. Mécanismes physiopathologiques des DIP – D’après (16)



Leur modification fonctionnelle conduit à une immunité aberrante dont les manifestations cliniques et complications associées sont hétérogènes telles que des réactions auto-immunes, des allergies sévères, des maladies auto-inflammatoires ou des pathologies malignes. Les DIP sont également responsables de maladie mortelle tel que le déficit immunitaire combiné sévère (DCIS) dont l'incidence annuelle européenne est estimée à environ 1/60 000 naissances (17). De plus, la plupart des troubles sont associés à une sensibilité accrue aux infections, qui en l'absence de traitement peuvent devenir chroniques, sévères, et dans les cas les plus extrêmes fatales. Les agents infectieux responsables peuvent être variables selon les DIP et le compartiment immunitaire affecté (15).

1.3.2. Classification

Les DIP sont classés principalement en fonction du compartiment du système immunitaire altéré. Les principaux déficits étant liés i) à la phagocytose ; ii) aux protéines du complément ; iii) à la réponse humorale ; iv) à la réponse cellulaire ou v) à la combinaison des deux réponses. Le comité d'experts de l'Union internationale des sociétés immunologiques (IUIS) a mis à jour en 2019 la classification des déficits immunitaires primitifs. Considérée comme la référence actuelle des connaissances de ces pathologies elle regroupe les DIP en 10 grandes catégories en fonction de l'atteinte majoritaire (**Tableau 1**).

Tableau 1. Liste non exhaustive des différentes catégories de PID et exemples associés – Adapté d’après IUIS classification (15)

Immunodéficiences combinées
• Défiance en CD3, CD4, déficit immunitaire combiné sévère
Immunodéficiences combinées avec caractéristiques syndromiques
• Syndrome de Wiskott-Aldrich ; Syndrome de DiGeorge
Déficiences d’anticorps
• Agammaglobulinémie ; déficit sélectif en IgA ; Déficit immunitaire commun variable (DICV)
Maladies du dérèglement immunitaire
• Lymphohistiocytose familiale ; syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité
Défauts congénitaux des phagocytes
• Syndrome de Kostmann ; Granulomatose septique chronique ; neutropénie
Défauts de l’immunité intrinsèque et innée
• Encéphalite Herpétique ; Défiance de la voie de signalisation TLR
Maladies auto-inflammatoires
• Interféronopathies de type 1 ; Fièvre méditerranéenne familiale
Déficiences du complément
• Défiance C1, C2, C3 ; Infections par des organismes encapsulés
Insuffisance de la moelle osseuse
• Anémie de Fanconi ; syndrome MIRAGE
Phéncopies des PID
• Syndrome lymphoprolifératif auto-immun ; syndrome de Good
<i>CD, cluster de différenciation ; Ig, immunoglobuline ; TLR, Toll-like receptor</i>

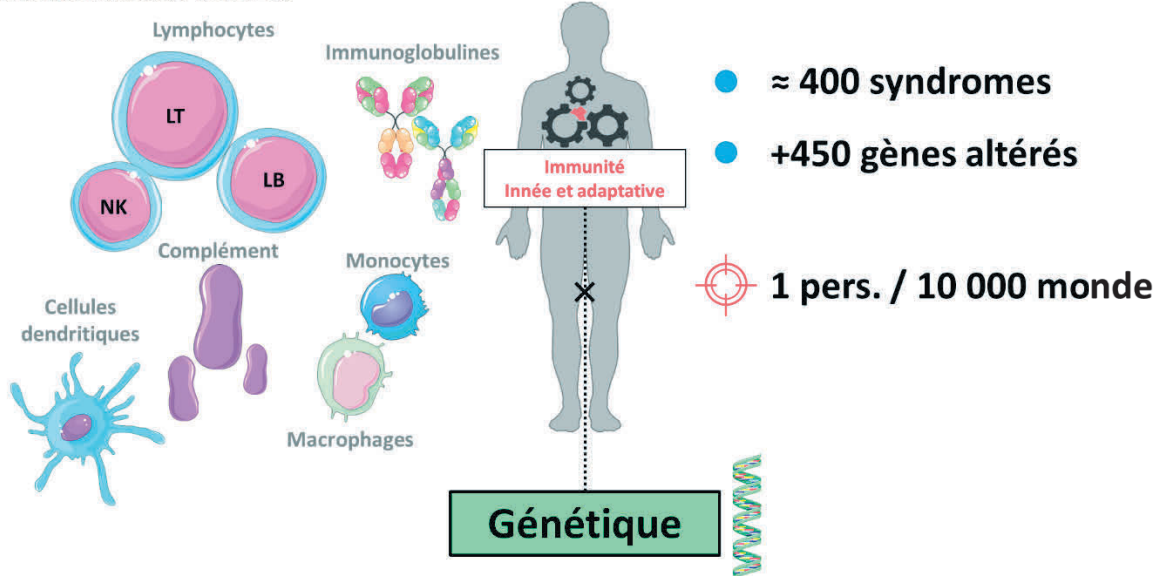
1.3.3. Incidence

Dans le monde, l’incidence globale rapportée des DIP est d’environ 1 personne sur 10 000, ce chiffre, variable entre chaque pays, n’est qu’une estimation probablement sous-estimée en raison d’un nombre important de diagnostic manqué (18). Néanmoins, une récente étude décrit une augmentation de 47,9 % de la prévalence mondiale de patients identifiés avec un DIP entre 2013 et 2021 (14).

Les trois plus importantes prévalences concernaient les déficiences d’anticorps (42 %), les immunodéficiences combinées avec caractéristiques syndromiques (12 %) et enfin les déficiences non spécifiées (11 %) (14). En France, au 15/06/2021 les DIP concernaient plus de 8 000 personnes, avec une proportion légèrement augmentée chez les individus du genre masculin (19) (**Figure 4**).

Figure 4. Altérations et incidence des DIP – Source personnelle

Composants immunitaires altérés



1.4. Les déficits immunitaires secondaires

1.4.1. Description

Les déficits immunitaires secondaires sont beaucoup plus fréquents que les déficits immunitaires primitifs et se développent généralement plus tard au cours de la vie. Ils ne sont pas d'ordre génétique, mais résultent de facteurs extérieurs de différentes natures pouvant affecter un hôte doté d'un système immunitaire intrinsèquement normal. Les DIS ont un large spectre de présentation, principalement en fonction de la sensibilité de l'hôte et de l'ampleur du facteur externe responsable, l'exemple le plus parlant étant la dose de médicaments immunosuppresseurs qui aura une plus ou moins forte incidence sur l'état d'immunodépression.

Par comparaison aux DIP, il n'existe pas de classification officielle pour les DIS, néanmoins les différents facteurs pouvant induire une immunodépression peuvent être regroupés selon leur origine par exemple comportemental, physiologique ou iatrogénique.

1.4.2. Incidence

Il est également difficile d'estimer le nombre de personnes en France ou à travers le monde présentant une immunodépression induite par une cause non-génétique. Néanmoins, l'incidence de facteurs extérieurs à l'origine de cet état peut être estimée (**Figure 5**).

À titre d'exemple, **physiologiquement** la population mondiale âgée de plus de 65 ans passera de 9 % en 2019 à 16 % d'ici 2050 (20). Ce cap de 65 ans est associé à une immunosénescence caractérisée par une réduction progressive de la capacité à déclencher des réponses anticorps et cellulaires efficaces contre les infections ou après vaccination (21).

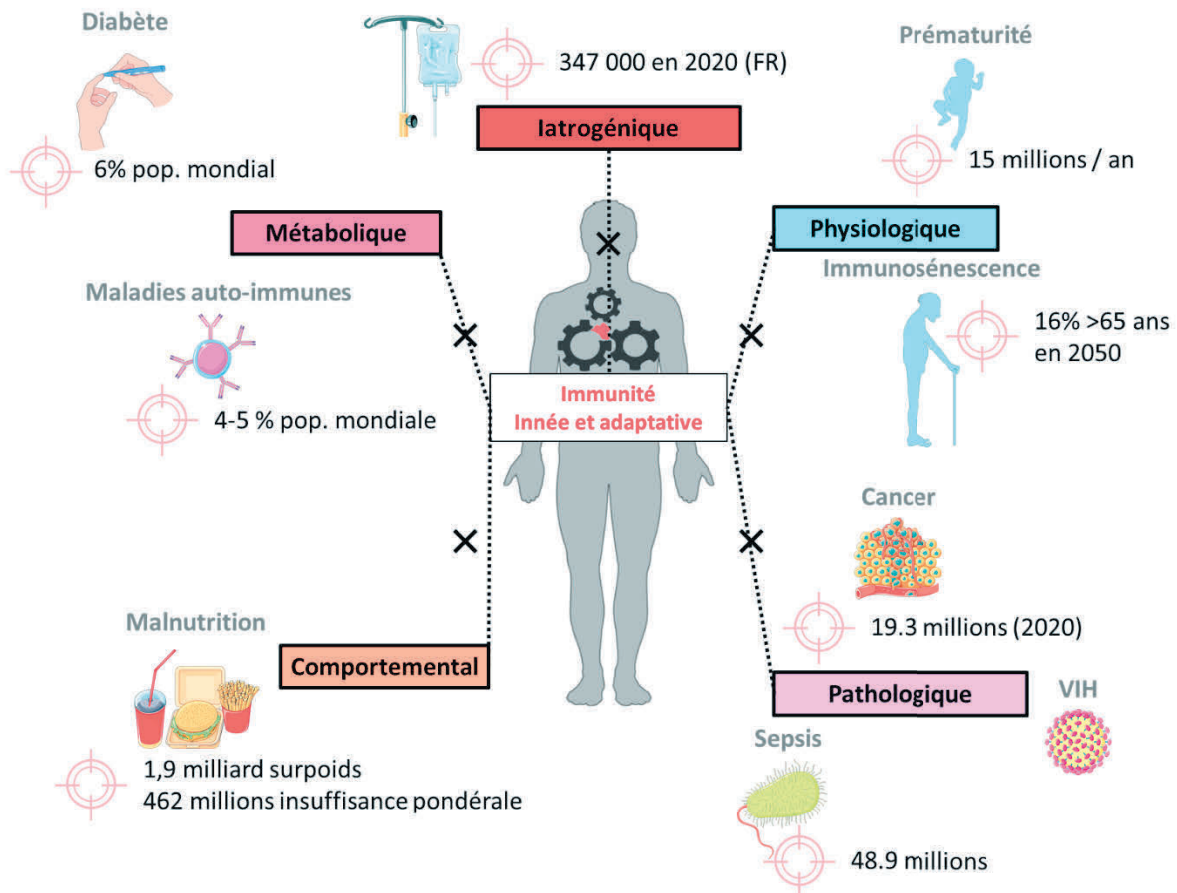
La prématurité, par définition toute naissance viable survenant avant 37 semaines d'aménorrhées, concerne également plus d'un nouveau-né sur 10 dans le monde soit environ 15 millions chaque année (22). Les nourrissons prématurés en raison d'un système immunitaire immature et déficient présentent également un risque accru de contracter des infections, principalement nosocomiales (23–25).

La **malnutrition**, englobant à la fois la sous-alimentation et la suralimentation, qu'elle soit liée à une maladie ou à une situation économique, est également l'une des principales causes d'immunodéficience dans le monde (26,27). Selon les chiffres de l'organisation mondiale de la santé (OMS), 1,9 milliard d'adultes sont en surpoids ou obèses et 462 millions souffrent d'insuffisance pondérale. La malnutrition peut compromettre la disponibilité des composants du complément et la fonction des phagocytes, induire une atrophie de la moelle osseuse et du thymus et donc de l'hématopoïèse, diminuer la fonction biologique de différents types cellulaires (lymphocytes B, macrophages) et altérer la fonction des lymphocytes T mémoire effecteurs (26–29).

L'immunodépression **post-traumatique**, regroupant par exemple le choc septique, les brûlures ou encore les chirurgies lourdes, induit des diminutions au niveau des lymphocytes T, de la sécrétion de cytokines majeures telles que IFN- γ , IL-2 et TNF- α , et de l'expression de HLA-DR, ce qui conduit à une augmentation de la vulnérabilité des patients à contracter des infections (30). Deux importantes études réalisées au Japon et aux USA rapportent des taux d'infections d'environ 6 % des patients hospitalisés post-traumatique (31,32). De plus le **sepsis**, défini en 2016 comme un dysfonctionnement d'un ou plusieurs organe(s) potentiellement mortel causé par une réponse de l'hôte dérégulée à une infection (SEPSIS 3)(33), toucherait environ un tiers des patients admis en soins intensifs dans le monde soit environ 48.9 millions de cas.

Au cours de sa phase tardive on observe un important état d'immunodépression qui conduit à un échec de l'éradication des infections primaires et à l'acquisition d'infections secondaires potentiellement mortelles.

Figure 5. Liste non exhaustive de DIS et incidence associée – Source personnelle



A la fin de l'année 2020 le **VIH** avait infecté 37.7 millions de personnes (34), faisant de cette infection encore à ce jour l'une des principales causes d'immunodéficience secondaire dans le monde. A titre d'exemple 1.5 millions de personnes ont été nouvellement diagnostiquées et on estimait que plus de 6 millions de personnes ignoraient qu'elles vivaient avec le VIH en 2020 (34). Cette infection virale, causée par les rétrovirus VIH-1 et VIH-2, est responsable de la destruction progressive du réservoir de lymphocytes T CD4⁺ (CD, cluster de différenciation) et de l'altération de la fonction de l'immunité à médiation cellulaire (35). L'infection par le VIH peut induire le SIDA qui va alors entraîner une augmentation accrue du risque d'infections opportunistes et de survenue de cancers (36).

En 2020, on estimait à 19.3 millions le nombre de nouveaux cas annuels de **cancer** à travers le monde (37). Les leucémies et les lymphomes non-Hodgkinien, cancers du sang ciblant directement les cellules immunitaires, représentaient les 13^{ème} et 15^{ème} cancers avec la plus forte incidence avec 544 352 et 474 519 nouveaux cas (38).

Les **maladies auto-immunes et/ou inflammatoires** ont une prévalence estimée comprise entre 4 % et 5 % dans les pays développés (39). Ces maladies résultent d'un dysfonctionnement du système immunitaire conduisant ce dernier à s'attaquer aux constituants normaux de l'organisme. Par exemple, la **polyarthrite rhumatoïde** est une maladie inflammatoire conduisant à une destruction progressive de nombreuses articulations et dont la prévalence mondiale est estimée entre 0.1 et 2% (40). Cette maladie induit dans un premier temps des enraidissements des articulations et peut conduire dans les cas les plus extrêmes à une déformation articulaire et/ou une destruction tendineuse. Elle se caractérise par la présence d'auto-anticorps, notamment le facteur rhumatoïde et les anticorps anti-peptides cycliques citrullinés (anti-CCP), ces derniers sont utilisés comme biomarqueurs pour le diagnostic. La présence de ces auto-anticorps conduit à la formation de complexes immuns dans les articulations entraînant une sécrétion aberrante par les cellules immunitaires de cytokines telles que IL1, IL17, IL6 ou TNF- α , ce qui conduit à un état d'inflammation chronique et une destruction tissulaire (41).

D'autres **maladies inflammatoires**, dont les origines peuvent être diverses, représentent également une importante cause d'immunodépression. Par exemple, le **diabète de type 2** toucherait plus de 6 % de la population mondiale, soit environ 462 millions d'individus. Cette pathologie est responsable d'une diminution de la fonction des neutrophiles, induit une faible production de cytokines en réponse aux mitogènes et aux antigènes, une inflammation chronique et une sénescence immunitaire (42,43). Les **maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)** qui regroupent majoritairement la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) toucherait dans le monde 3,9 millions de femmes et près de 3,0 millions d'hommes (44). Les MICI se caractérisent par une inflammation chronique du tractus gastro-intestinal et serait le résultat d'une réponse immunitaire incontrôlée face à un élément déclencheur (flore bactérienne, facteurs environnementaux) chez des individus génétiquement prédisposés. Un déséquilibre de la sécrétion de cytokines clés de la réponse immunitaire telles que TNF- α , ou IFN- γ est notamment décrit (45). Ces diverses pathologies

peuvent être traitées en utilisant des anti-inflammatoires, tels que les biothérapies anti-cytokiniques (anti-TNF α , anti-IL6 ou anti-IL1), et des immunosuppresseurs.

Paradoxalement, l'application de ces traitements immunosuppresseurs entraîne une augmentation des déficits immunitaires, on parle alors d'immunodépression **iatrogénique** médicamenteuse. Parmi les plus couramment utilisés on retrouve les corticoïdes qui présentent des propriétés à la fois immunosuppresseuses et anti-inflammatoires. Ils diminuent l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH) et la production d'IL-2 (46) et inhibe l'activité de facteurs de transcription des gènes inflammatoires, tels que NF- κ B et la protéine activatrice-1 (AP-1)(47). Les inhibiteurs de la calcineurine, tels que la cyclosporine A et le tacrolimus, sont également couramment employés lors de transplantation d'organes et de cellules souches hématopoïétiques ou encore dans certaines maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux par exemple. La cyclosporine A et le tacrolimus se lie à des récepteurs intracytoplasmiques, respectivement la cyclophiline et FKBP12, ils forment alors un complexe qui inactive la calcineurine inhibant ainsi la déphosphorylation et la translocation dans le noyau du facteur de transcription NFAT. Il en résulte un blocage de la transcription des gènes et de la libération des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2 (48). Le méthotrexate est employé dans le traitement de maladies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis ou les MICI ainsi que dans les protocoles de transplantation en raison de ses activités anti-inflammatoires et immunomodulatrices. Initialement employé en tant que traitement anti-cancéreux, le méthotrexate inhibe les enzymes clés impliquées dans la biosynthèse des purines et des pyrimidines telle que la dihydrofolate réductase, limitant ainsi le renouvellement des cellules malignes. Il est également utilisé dans les maladies inflammatoires où il agit en inhibant l'activité de nombreuses cellules responsables de l'inflammation telles que les neutrophiles, les macrophages ou les lymphocytes T. Le méthotrexate inhibe également l'activité des voies NF- κ B et JAK/STAT et la production de cytokine pro-inflammatoires telles que IFN- γ , IL2, IL-6, IL1 β et TNF- α (49). Ainsi, ils existent un large panel de traitements immunosuppresseur dont l'utilisation, pouvant être combinée, sera dépendante du contexte pathologique ou clinique. A titre d'exemple le mycophénolate mofétil, un antimétabolite inhibant l'activité des lymphocytes T et B, est couramment employé en combinaison avec des inhibiteurs de la calcineurine dans les protocoles de transplantation d'organes solides (50).

L'importante incidence des pathologies dont la thérapie repose sur l'utilisation de traitements immunosuppresseurs combinées à un accroissement de l'accès aux soins contribue ainsi directement ou indirectement à l'augmentation des déficits immunitaires iatrogéniques médicamenteux.

Ainsi, selon les chiffres de cette liste non exhaustive suite à ce travail de recherche bibliographique, l'immunodépression pourrait concerner près d'une personne sur 10 dans le monde. Cette importante prévalence estimée nous permet donc aisément d'affirmer que la prise en charge et le maintien de l'homéostasie pour ces patients est un enjeu majeur de santé publique, notamment en raison de l'important risque infectieux associé à cet état.

1.5. Le risque infectieux dans l'immunodépression

Le risque infectieux représente le principal élément déclencheur qui oriente la recherche de déficits immunitaires. Dans ce sens, l'association IRIS en partenariat avec le centre de référence pour les déficits immunitaires héréditaires (CEREDIH) a décrit les 10 signes orientant la recherche d'un déficit immunitaire primitif chez l'enfant et l'adulte (**Tableau 2**). L'immunodéficiences doit être envisagée chez un patient présentant des infections caractérisées par une fréquence accrue, un besoin d'antibiotiques parentéraux, une gravité inhabituelle, une récupération difficile ou des agents pathogènes étiologiques peu fréquents.

Tableau 2. Les dix signes d’alarme des déficits immunitaires primitifs – Adapté d’après (51)

Chez l'enfant	Chez l'adulte
1. ≥ 4 nouvelles otites en 1 an	1. ≥ 2 nouvelles otites en 1 an
2. ≥ 2 épisodes de sinusite sévère	2. ≥ 2 épisodes de sinusite sévère, en l'absence d'allergie
3. ≥ 2 mois d'antibiotiques sans effet satisfaisant	3. 1 pneumonie par an pendant > 1 an
4. ≥ 2 pneumonies en 1 an	4. Diarrhée chronique avec perte de poids
5. Prise de poids insuffisante ou retard de croissance	5. Infections virales récurrentes (rhumes, herpès, verrues, condylomes)
6. Abscesses récurrents et profonds de la peau ou des organes	6. Besoin récurrent d'antibiotiques intraveineux pour éliminer les infections
7. Mycoses persistantes au niveau de la bouche ou de la peau	7. Abscesses récurrents et profonds de la peau ou des organes
8. Besoin d'antibiotiques intraveineux pour éliminer les infections	8. Mycoses persistantes au niveau de la bouche ou de la peau
9. ≥ 2 infections profondes, y compris le sepsis	9. Infection due à une bactérie normalement anodine
10. Antécédents familiaux de déficit immunitaire primitif	10. Antécédents familiaux de déficit immunitaire primitif

Dans le contexte des déficits immunitaires secondaires, les prédispositions aux infections et les agents infectieux impliqués sont variables selon le(s) composant(s) immunitaire(s) impacté(s) et le facteur extérieur initial causant l’immunodépression, pouvant ainsi fournir des informations importantes pour la prise en charge des patients (**Tableau 3**).

Tableau 3. Liste non-exhaustive des effets des DIS sur les composants du système immunitaire et les principales infections associées – Synthétisé d’après (16)

Composants impactés	Facteurs extérieurs responsables	Susceptibilité accrue à
Phagocytes	Corticoïdes	Bactéries extracellulaires : <i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , Champignons : <i>Aspergillus</i>
	Diabète	
	Chimiothérapie	
Lymphocytes B	Leucémie lymphoïde chronique	Bactéries extracellulaires encapsulées : <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> ou <i>Staphylococcus aureus</i> Entérovirus
	Myélome multiple	
	Chimiothérapies	
	Corticoïdes	
	Allogreffes de CSH	
Lymphocytes T	Corticoïdes	Bactéries intracellulaires Virus : CMV/EBV/VZV Parasites : <i>Toxoplasma</i> Champignons : <i>Pneumocystis</i> , <i>cryptococcus</i>
	Immunosuppresseurs	
	Chimiothérapies	
	Infection VIH	
	Transplantation d’organe	
	Greffe de CSH	

CSH, cellules souches hématopoïétiques ; CMV, Cytomégalovirus ; EBV, Epstein-Barr virus VIH ; virus de l’immunodéficience humaine ; VZV, Varicella-Zoster virus

Bien que la récurrence des infections oriente vers le diagnostic d’un déficit immunitaire, elle est aussi la cause d’une importante mortalité associée. (**Tableau 4**).

Tableau 4. Liste non-exhaustive de la mortalité infectieuse dans l'immunodépression – Source personnelle

Déficit immunitaire	Lieu	Période	Mortalité infectieuse	Classement	Référence
Primitif					
DIP	Koweït	2004-2015	46 % liés à un sepsis et 29 % à la pneumonie	1 ^{ère} et 2 nd	(52)
DICS	Hollande	1998-2013	20.9 % liés à une infection	NA	(53)
DICV	Iran	1984-2005	31.3 % liés à une infection (pneumonie + sepsis)	2 nd	(54)
Secondaire					
Immunosénescence (>65 ans)	France	2017	8.5 % liés à des maladies respiratoires dont 2.7 % de pneumonie	3 ^{ème}	(55)
	Europe	2016	8.1% liés à des maladies respiratoires dont grippe et pneumonie	3 ^{ème}	(56)
	USA	2000-2011	5.4 % liés ou compliqué par une infection	3 ^{ème}	(57)
Prématurité	Inde	2002-2017	20-40 % liés à un sepsis	2 nd	(58)
	Ethiopie	2016-2018	29.8 % liés à une infection néonatale	2 nd	(59)
	Hollande	2011-2017	15.9% liés à une infection	4 ^{ème}	(60)
Période néonatale	194 pays	2000-2013	14 % liés à une infection - période précoce (0-6 jours) 47.6 % liés à une infection - période tardive (7-27jours)	3 ^{ème} 1 ^{ère}	(61)
Cancer	USA	1973-2014	151 440 liés à une infection dont 48 % de pneumonie et grippe	NA	(62)
	Vietnam	2008-2018	Cohorte pédiatrique: 43.2 % liés à une infection	1 ^{ère}	(63)
	Mexique	2012-2015	27 % liés à une infection dont 89 % d'un choc septique	NA	(64)
Allogreffe-CSH	Monde	1985-2015	22.3 % liés à une infection	3 ^{ème}	(65)
	USA	1989-2009	Cohorte pédiatrique: 47 % liés à un sepsis	1 ^{ère}	(66)
Brulures	Inde	/	48.2 % liés à un sepsis	1 ^{ère}	(67)
	Iraq	2018-2019	50% liés à un sepsis	1 ^{ère}	(68)
	Europe	1985-2009	2 % à 14 % liés à un sepsis	3 ^{ème}	(69)
Trauma	USA	2012-2016	9.5% liés à un sepsis	NA	(32)
	Japon	2004-2017	10.5% liés à une infection	NA	(31)

Les traitements mis en place afin de limiter ce risque infectieux consiste à la réduction d'exposition au risque environnemental et à la mise en place ou à l'adaptation d'un schéma vaccinal. Il est également possible d'administrer une antibiothérapie préventive, ou antibioprofylaxie. Néanmoins, l'utilisation incorrecte et/ou abusive des traitements antibiotiques a contribué au développement et à la dissémination de bactéries multi-résistantes, problème majeur de santé mondiale. Une étude a notamment estimé un nombre de 1,3 millions de décès attribuables à l'antibiorésistance dans le monde en 2019 (70).

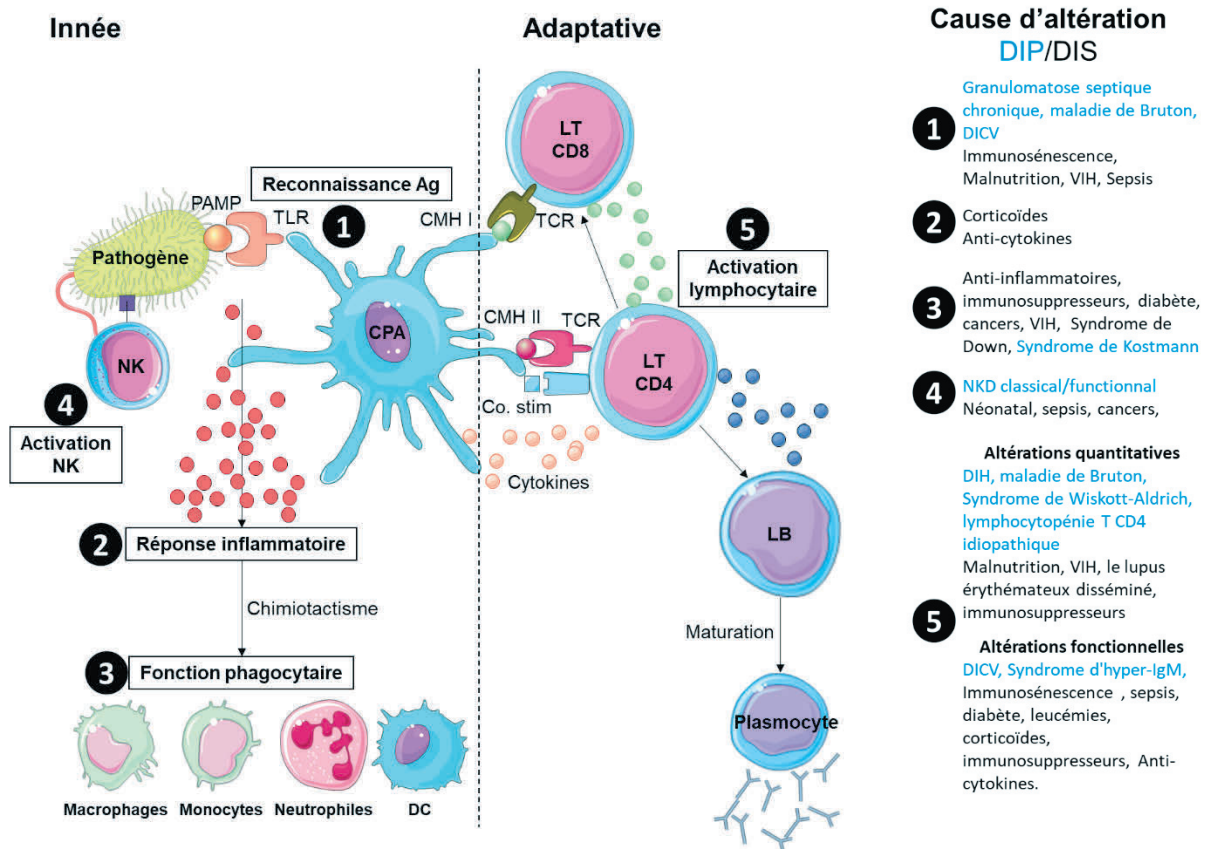
Sur le versant immunitaire, les principaux traitements pour les déficits immunitaires consistent à remplacer les composants immunitaires défailants. Outre les traitements expérimentaux comme la thérapie génique pour les DIP, les méthodes principalement utilisées sont l'injection d'immunoglobulines polyvalentes par voie intraveineuse ou sous-cutanée lorsque le patient présente un déficit d'anticorps ; l'administration de facteurs de croissance des granuleux (GCSF) ; ou la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) en cas de déficit immunitaire cellulaire (71). De manière spécifique aux DIS, la restauration de la compétence immunitaire nécessite la guérison de la pathologie sous-jacente et l'arrêt de tout traitement immunosuppresseur, ce qui n'est pas toujours possible comme par exemple en cas de transplantation d'organe.

Afin d'**optimiser la prise en charge** des patients au travers des thérapies immunitaires ciblées, la **compréhension de la réponse de l'hôte** et des différents compartiments où des dérèglements peuvent se produire est **nécessaire**.

1.6. Les altérations immunitaires dans l'immunodépression

De la reconnaissance du pathogène jusqu'à la mise en place de la réponse adaptative, la diversité des altérations immunitaires décrites dans les cas des DIP ou des DIS affectent de nombreux maillons de la réponse immunitaire (**Figure 6**).

Figure 6. Les altérations immunitaires dans l'immunodépression – Source personnelle



Ag, antigène ; CD, cluster de différenciation ; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; Co. Stim, co-stimulation ; CPA, Cellule présentatrice d'antigène ; DC, cellule dendritique ; DICV, déficit immunitaire commun variable ; DIH, déficit immunitaire humorale ; Ig, immunoglobuline ; LT-LB, lymphocyte T-B ; PAMP, Pathogen-associated molecular pattern ; TCR, T-cell receptor ; TLR, Toll-like receptor ; VIH, virus de l'immunodéficience humaine

1.6.1. La reconnaissance de l'antigène

1

Les *Toll-Like Receptors* (TLR) sont des molécules transmembranaires permettant d'initier les défenses de l'hôte en reconnaissant des motifs de danger de nature non-infectieuse nommées DAMP (de l'anglais *Danger Associated Molecular Pattern*) ou des motifs microbiens dénommés PAMP (de l'anglais *Pathogen Associated Molecular Patterns*). Les TLR sont dotés d'un domaine de reconnaissance extracellulaire riche en leucine (LRR, de l'anglais *leucine rich repeat*) impliqué dans la dimérisation des récepteurs et la reconnaissance des ligands et un domaine intracellulaire impliqué dans la transduction du signal (TIR, de l'anglais *Toll/IL-1 receptor*). Les TLR sont exprimés par les cellules épithéliales et endothéliales et les leucocytes. Les monocytes, macrophages et cellules dendritiques expriment le plus grand panel de récepteurs. Chez l'homme, 11 TLR sont décrits (**Tableau 5**).

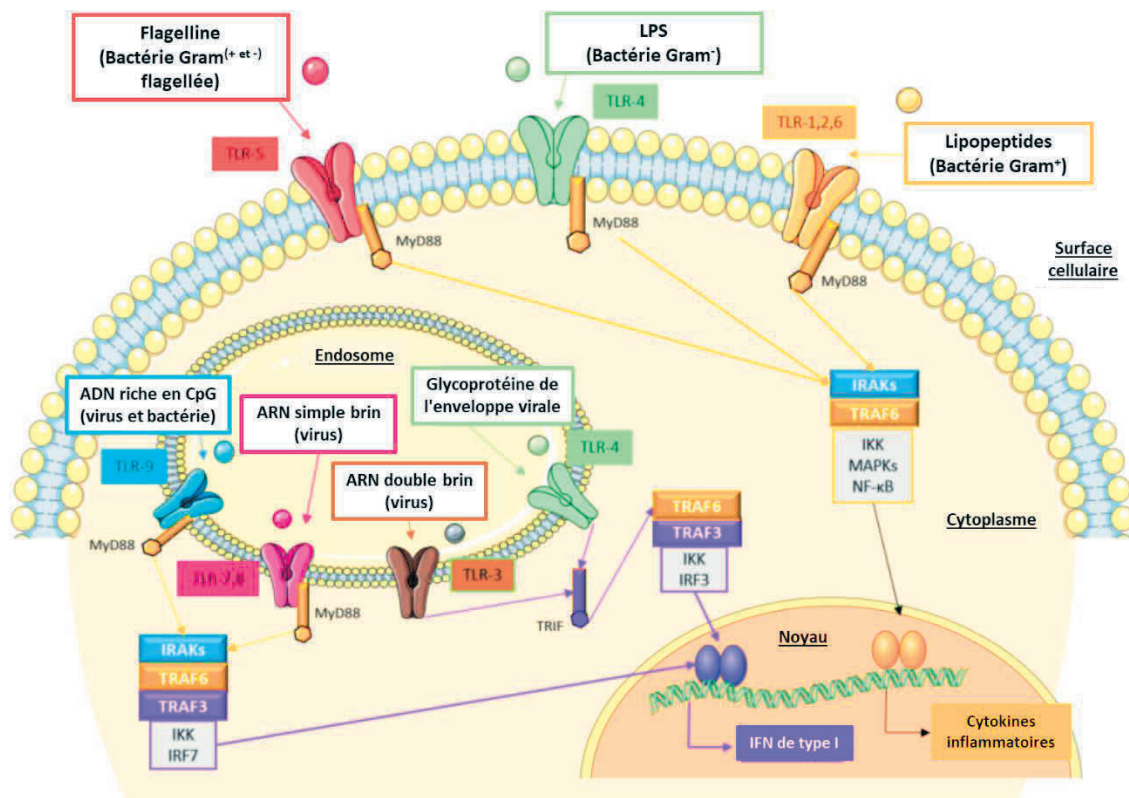
Tableau 5. Ligands et localisation subcellulaire des TLR – Adapté d’après (72)

TLR	LOCALISATION	PAMP
TLR1	Membrane cellulaire	Lipopeptides des mycobactéries
TRL2	Membrane cellulaire	Lipoprotéines des bactéries Peptidoglycanes de bactéries Gram+ Acide lipotéchoïque des Streptocoques B Porines de <i>Neisseria</i> Lipoaranimannane des mycobactéries Zymozan des <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Phospholipomannane de <i>Candida albicans</i> Glucuronoylomannane de <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Mutin-type transmembran glycoprotein</i> des trypanosomes Hémagglutinines du virus de la rougeole
TLR3	Endosome	Polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC)
TLR4	Membrane cellulaire/endosome	Lipopolysaccharides LPS bactériens Mannanes des champignons Glycoinositolphospholipides des parasites Protéines d’enveloppes virales
TLR5	Membrane cellulaire	Flagelline des bactéries flagellées
TLR6	Membrane cellulaire	Zymozan des <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TLR7 et 8	Endosome	ARN simple brin des virus
TLR9	Endosome	Cytosine-phosphate-guanine (CpG) des bactéries Hémozoïne du <i>plasmodium falciparum</i>
TLR10	Membrane cellulaire	Suggestions récentes : <i>Borrelia burgdorferi</i> / HIV-gp41 / <i>L. monocytogenes</i>
TLR11	Membrane cellulaire	Bactéries à tropisme urologique Prolfilin-like de <i>Toxoplasma gondii</i>

PAMP, pathogen-associated molecular patterns; TLR, Toll-like receptor

Les TLR permettent de reconnaître la majorité des micro-organismes et jouent donc un rôle primordial au niveau de la réponse immunitaire vis-à-vis d’un pathogène. La plupart des tissus expriment au moins un des 11 TLR, et ces derniers sont capables de reconnaître un large panel de composants microbiens (LPS, peptidoglycanes, mannane de levure). L’activation des TLR induit également la libération de radicaux libres et de peptides antimicrobiens, qui contribuent à l’élimination du pathogène, et à l’augmentation de l’expression de molécules de costimulation (CD80 et CD86) à la surface des cellules présentatrices d’antigènes, favorisant ainsi l’activation de la réponse adaptative. La liaison entre les ligands (DAMP/PAMP) et les PRR (de l’anglais, *pattern recognition receptors*), notamment les TLR permettent ainsi d’initier la réponse immunitaire innée et la régulation d’une réponse adaptative face à l’infection (**Figure 7**).

Figure 7. Signalisation TLR chez l'homme - adaptée d'après (73)



IFN, Interferon ; IKK, IkappaB Kinase ; IRAK, Interleukin 1 Receptor Associated Kinase ; MAPK, Mitogen-activated protein kinases ; NF-κB, Nuclear Factor Kappa B ; TLR, Toll-like receptor ; TRAF, TNF Receptor Associated Factor

Certains déficits immunitaires primitifs induisent des altérations au niveau des TLR et/ou des cascades de signalisations qui en découlent (74,75). C'est notamment le cas de la maladie de Bruton où la déficience du gène BTK, qui interagit avec diverses voies de la réponse immunitaire (activatrices ou inhibitrices), peut entraîner la diminution (76) ou l'augmentation (77) de la sécrétion de cytokines TLR médiée. Chez les patients atteints d'un DCIV, on observe une diminution de la sécrétion d'IFN-α des pDC et de l'activité des cellules B post stimulation avec un agoniste du TLR9 (78).

De manière similaire, plusieurs déficits immunitaires secondaires peuvent induire des altérations des TLR. Chez les patients dialysés pour une insuffisance rénale chronique (79) une diminution de l'expression du TLR4 est induite par une stimulation continue des endotoxines contenues dans le dialysat et conduit à une plus faible sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (80).

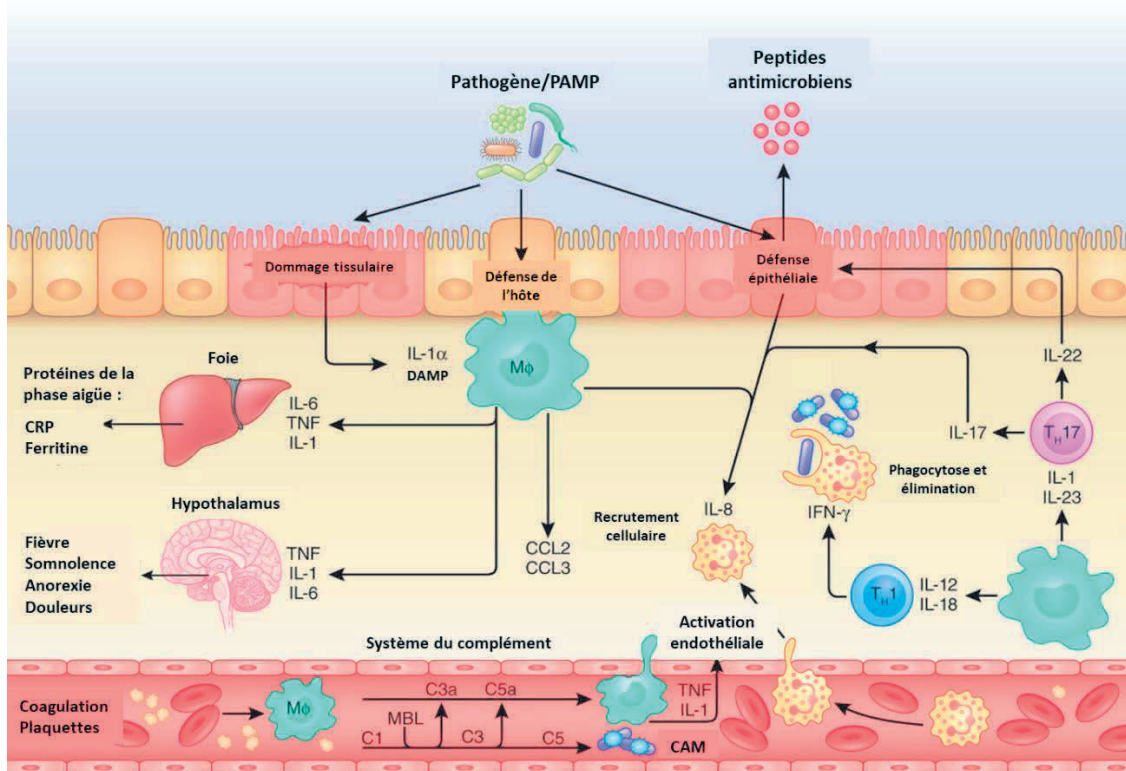
L'âge avancé peut conduire à une réduction de la signalisation des TLR via la voie NF-κB, ce qui induit une diminution de la production de cytokines inflammatoires et de la phagocytose et à une altération du chimiotactisme et de la capacité de présentation de l'antigène (81,82). L'infection par le VIH induit une augmentation de l'expression des TLR (notamment TLR2 et TR4) dans différentes cellules, conduisant à une surproduction de cytokine pro-inflammatoire (83), l'effet bénéfique ou néfaste de l'interaction des TLR dans la pathogénèse du VIH est néanmoins sujet à discussion (84). D'autres DIS peuvent également induire des altérations des TLR telle que la malnutrition (85).

1.6.2. La réponse inflammatoire

2

Une fois le pathogène introduit dans l'organisme et reconnu, le système immunitaire est activé dans le but d'éliminer le pathogène, il déclenche alors une cascade de processus inflammatoires localisés au niveau du site de l'infection et articulés en différentes phases distinctes (**Figure 8**).

Figure 8. Induction de la réponse inflammatoire par les mécanismes immunologiques – Adapté d'après (86)



CAM, Complexe d'attaque membranaire ; CRP, C-reactive protein ; DAMP/PAMP, Damage/Pathogen-associated molecular patterns ; IL, Interleukine ; TNF, Tumor necrosis factors

Dans un premier temps, l'activation des PRR va induire la libération de différents médiateurs de l'inflammation tels que des cytokines ou chimiokines. La libération de ces molécules va induire l'attraction des cellules compétentes au niveau du site inflammatoire (cellules phagocytaires), l'augmentation de la destruction (opsonines) et la présentation de l'antigène aux lymphocytes T. La dernière étape de la réponse inflammatoire correspond à la réparation du tissu lésé. Parmi les cytokines produites lors de la réponse inflammatoire aiguë, on retrouve les membres de la famille du TNF, les facteurs de croissance hématopoïétiques, l'IL-1 (IL-1, IL-18) et les interférons de type I. D'autres médiateurs sont également impliqués tels que la famille des IL-6 (IL-6, IL-27 et LIF), IL-33, VEGF (de l'anglais *Vascular Endothelial Growth Factor*), TREM-1L (de l'anglais *Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 1*), CXCL8 (CXC motif chemokine ligand 8), ou CCL5.

Lorsque les mécanismes compensatoires notamment via les cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et le TNF- β) tardent à se mettre en place, la sécrétion massive de cytokines est alors qualifiée d'orage ou de « rush » cytokinique, conduisant alors à un état pathologique d'hyper-inflammation systémique.

Combiné aux altérations de la reconnaissance de l'hôte, les déficits immunitaires, primitifs ou secondaires, peuvent également altérer tout ou partie de cette réaction inflammatoire. Les déficits immunitaires iatrogéniques médicamenteux en sont un exemple concret, notamment l'utilisation d'anti-inflammatoires tels que les corticoïdes (46) ou de traitements anti-cytokines clés de l'inflammation tels que IL1, IL6 ou TNF- α , utilisés notamment dans les maladies auto-immunes (87).

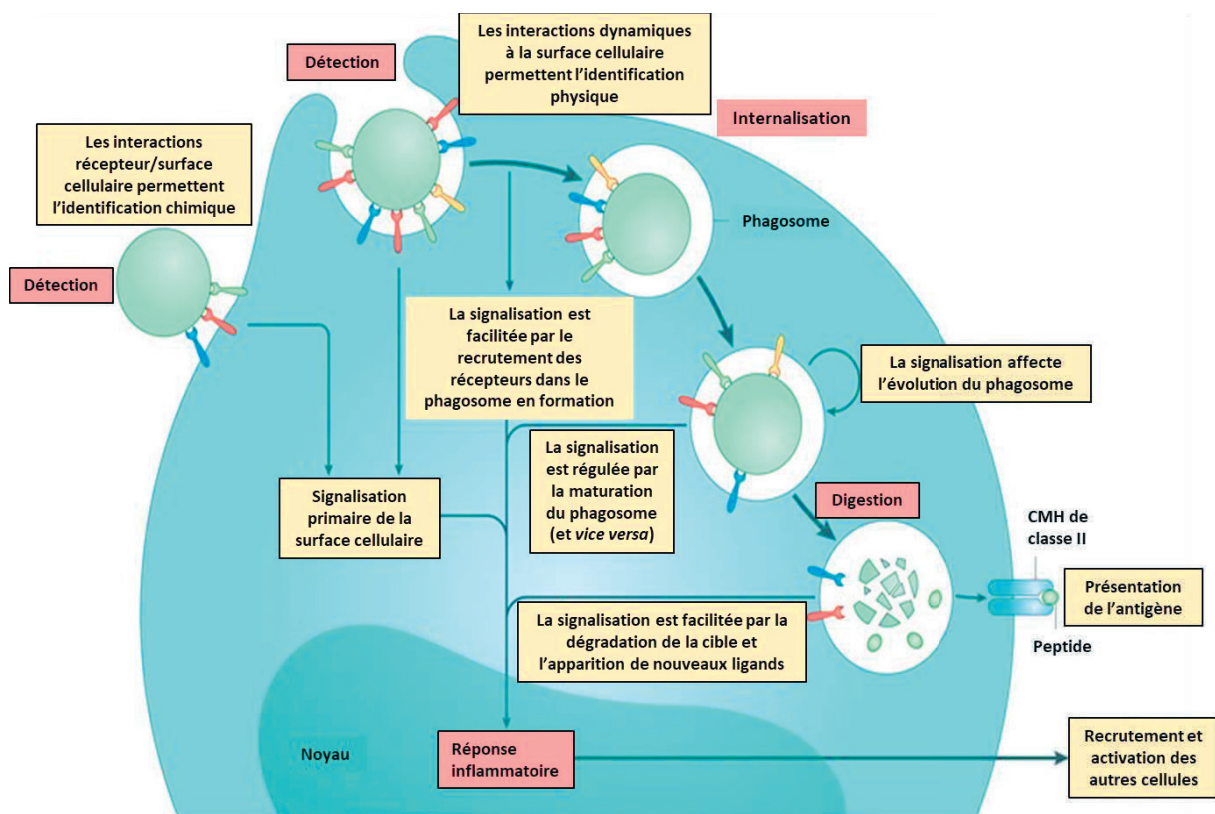
1.6.3. La fonction phagocytaire

3 La phagocytose de l'agent pathogène par une cellule phagocytaire comme les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, et les polynucléaires neutrophiles (PNN) est également initiée après la reconnaissance du pathogène. Les monocytes ont pour fonctions principales la phagocytose des pathogènes, la présentation des antigènes aux lymphocytes T, et la production de cytokines. Les cellules dendritiques (DC) sont de puissantes cellules présentatrices d'antigènes (CPA) permettant l'activation des lymphocytes T.

Deux grands sous-ensembles de DC sont reconnus : i) les DC plasmacytoïdes (pDC) circulantes et capables de produire de l'IFN de type I en réponse à un antigène viral, et ii) les DC myéloïdes (mDC) qui migrent vers les organes lymphoïdes secondaires une fois activés par la phagocytose des agents pathogènes ou la détection de signaux de danger endogènes.

Les PNN sont recrutés au niveau du site inflammatoire et s'infiltrent ensuite dans les tissus via l'expression de chimiokines et de molécules d'adhésion suite à une infection par un pathogène. Une fois activés les PNN vont phagocyter les pathogènes et libérer des molécules antimicrobiennes présentes dans leurs granules. Cette phagocytose est réalisée sous différentes étapes (opsonisation, chimiotactisme, adhésion, ingestion et destruction). La phagocytose est également à l'origine de la formation du signal de danger, et entraîne *in situ* une réaction inflammatoire (Figure 9).

Figure 9. Les différentes étapes de la phagocytose – Adapté d'après (88)



CMH, complexe majeur d'histocompatibilité

Différents contextes d'immunodépression peuvent également être à l'origine d'une altération de la fonction phagocytaire.

Ces déficits peuvent être iatrogéniques médicamenteux comme lors de l'utilisation de traitement anti-inflammatoire et immunosuppresseur qui entraîneront une inhibition du chimiotactisme (89); pathogéniques comme pour le diabète où l'environnement hyperglycémique et les changements métaboliques entraînent un chimiotactisme et une phagocytose défectueuse des macrophages (90,91) et des neutrophiles (92) ; ou enfin d'ordre génétique comme pour le syndrome de Down où une diminution du marqueur d'activation des neutrophiles CD11b est décrit (93). Les altérations de la phagocytose peuvent également être induits par une diminution spécifique d'un type cellulaire, par exemple avec la neutropénie, i.e. la diminution du nombre de polynucléaires neutrophiles circulants. On observe notamment une diminution de la réserve et de la fonction des neutrophiles lors de la période néonatale (94,95), une forte neutropénie induite par l'utilisation d'agents cytotoxiques (96) ou à la suite de cancers et de leurs traitements associés (chimio-radiothérapies) (97,98). Enfin, une neutropénie chronique est observée en cas d'infection par le VIH (99) ou dans certains DIP comme la neutropénie congénitale sévère (syndrome de Kostmann) (100).

1.6.4. L'activité NK

4

Les cellules tueuses naturelles (NK, de l'anglais natural killer) sont de grands lymphocytes granuleux issus de la lignée lymphocytaire, localisés généralement dans les tissus, également impliqués dans la réponse immunitaire innée. Ils ont pour principales fonctions de participer à l'élimination des cellules défectueuses, comme les cellules tumorales, et au contrôle précoce des infections microbiennes. Les NK sont des cellules cytotoxiques ne nécessitant pas d'exposition préalable à l'antigène. Ils sont en mesure d'éliminer le pathogène ou la cellule endommagée par différents processus comme la dégranulation ou la stimulation des récepteurs de l'apoptose. Les NK ont également un rôle dans la réponse inflammatoire initiale en produisant des cytokines pro-inflammatoires et immunorégulatrices (exemple IFN- γ , IL10, GM-CSF), permettant ainsi leur colocalisation avec d'autres cellules hématopoïétiques comme les cellules dendritiques au niveau du site d'infection. Les NK contribuent également à l'initiation et au façonnement de la réponse immunitaire adaptative grâce à la distribution de débris et à la sécrétion de cytokines effectrices.

Ils existent plusieurs déficits de NK nommés NKD (pour NK deficiency). Ils sont définis comme un sous-ensemble de DIP dans lequel une anomalie des cellules NK représente un défaut immunologique majeur entraînant l'immunodéficience clinique du patient. Ces classifications distinguent les cNKD (de l'anglais *classical*) dans lesquelles les cellules NK sont absentes ou en très faible quantité et les fNKD (de l'anglais *functional*) où les NK sont présentes en nombre normal, mais ne fonctionnent pas. À ce jour, 6 gènes altérés ont été publiés comme causant au moins en partie une NKD, dont 5 cNKD et 1 fNKD (101). Différents déficits immunitaires secondaires sont également responsables d'une altération de la fonction des NK. Chez les nouveau-nés, il est décrit que le répertoire de cellules NK malgré qu'il soit phénotypiquement formé présente un défaut de fonction (102), principalement une capacité cytolytique inférieure qui pourrait contribuer à l'immaturation du système immunitaire néonatal (103). Au cours du sepsis, des variations quantitatives et/ou fonctionnelles des NK sont observées (104), leurs effets bénéfiques ou néfastes sont néanmoins encore discutés. Enfin, il est également rapporté que les personnes présentant une faible cytotoxicité des cellules NK sont plus sensibles au cancer (105).

Sans être exhaustif, cette partie met en évidence que de nombreux déficits immunitaires peuvent impacter divers mécanismes de la réponse immunitaire innée. Cette réponse est la première ligne de défense de l'organisme contre un élément du non-soi, et ces mécanismes sont immédiats et peuvent conduire à l'élimination du pathogène. Dans le cas d'infection persistante la réponse immunitaire adaptative qui est la seconde ligne de défense de l'organisme va intervenir en complément et en parallèle de l'immunité innée (106).

1.6.5. La réponse lymphocytaire

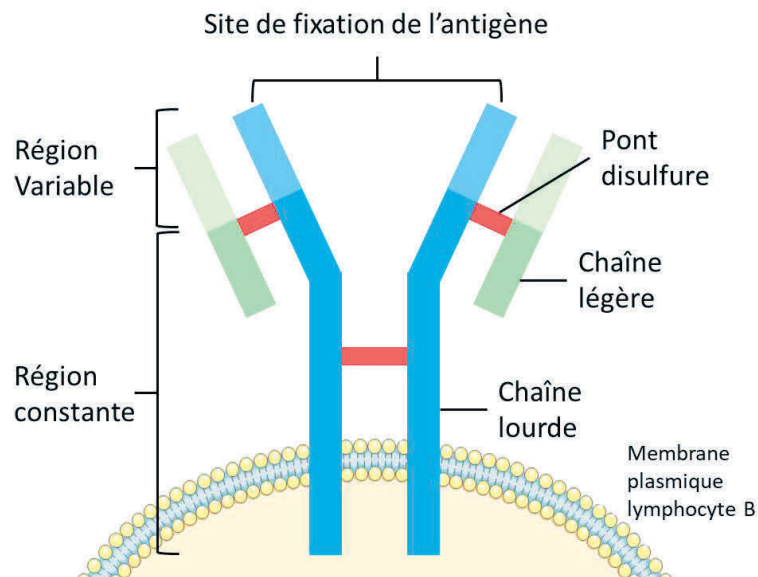
5

La réponse adaptative met en jeu deux familles de cellules lymphocytaires qui diffèrent par la nature de leurs récepteurs membranaires : les lymphocytes B et les lymphocytes T.

1.6.5.1. Les lymphocytes B

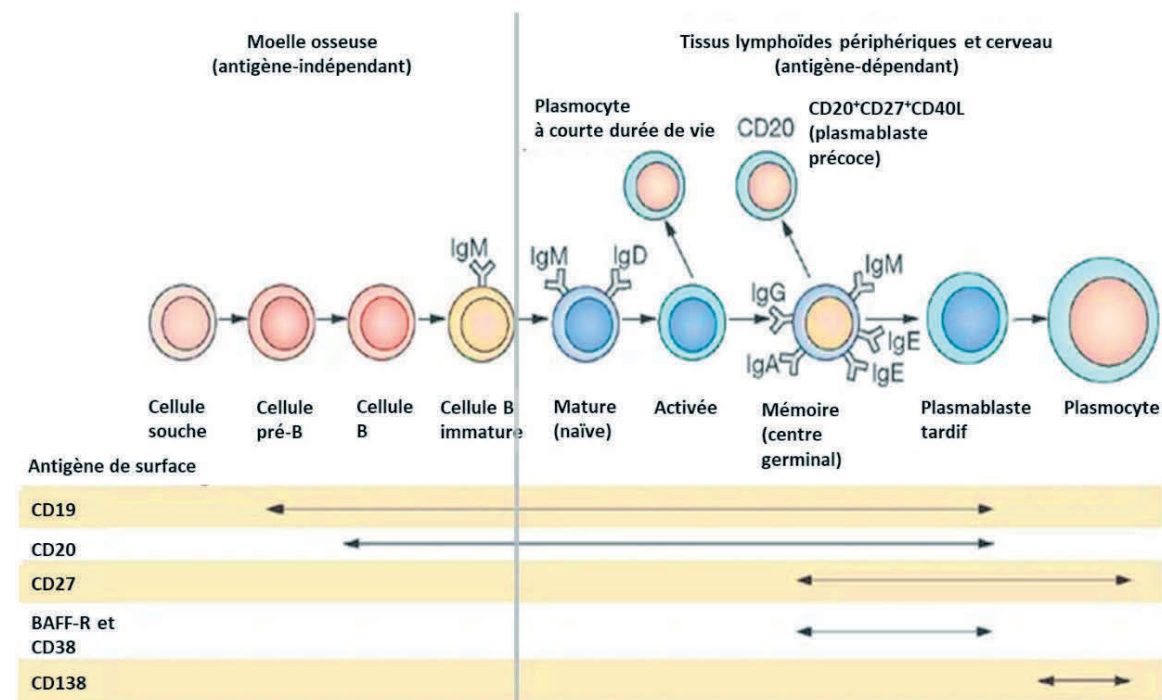
Les lymphocytes B expriment le récepteur des cellules B (BCR, de l'anglais *B cell receptor*) divisé en deux parties : une immunoglobuline membranaire servant de fragment de liaison au ligand et un hétérodimère transmembranaire servant de fragment de transduction du signal (107) (**Figure 10**).

Figure 10. Le récepteur des cellules B (BCR) – Source personnelle



Les lymphocytes B représentent 5 à 15 % des lymphocytes totaux présents dans le sang et sont produits à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) après une succession d'étapes de différenciation. Les premières étapes sont réalisées au sein de la moelle osseuse et sont indépendantes de l'antigène, les secondes sont réalisées après migration des lymphocytes B vers les organes lymphoïdes secondaires et sont dépendantes du contact avec l'antigène. L'ensemble des états par lesquels transitent les lymphocytes B au cours de leur différenciation/maturation, de la cellule souche au plasmocyte en passant par la forme mémoire, sont identifiables grâce à des CD spécifiques (**Figure 11**).

Figure 11. Maturation des lymphocytes B – Adapté d’après (108)



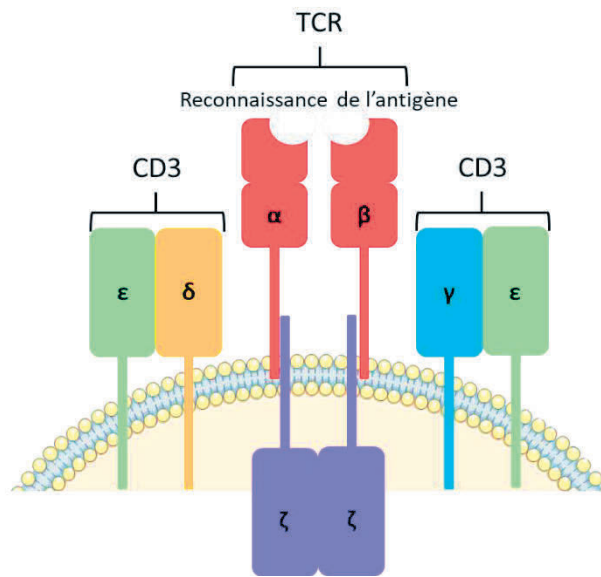
CD, Cluster de différenciation

L’activation des lymphocytes B immatures sera engagée après reconnaissance de l’antigène par les immunoglobulines (Ig) M membranaires présentes à leur surface. Cette liaison va induire un signal d’activation intracellulaire conduisant à la prolifération clonale et à l’activation des LB. Leur maturation en plasmocyte sera réalisée après la formation d’une synapse immunologique avec les lymphocytes T. Les lymphocytes B produisent des immunoglobulines de forte affinité mais peuvent également être des CPA et produire des cytokines qui régulent la fonction immune.

1.6.5.2. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T expriment à leur surface le TCR, un hétérodimère composé de trois portions (transmembranaire/extracellulaire/intracellulaire) et constitué de deux chaînes (α/β ou γ/δ) liées l’une à l’autre par un pont disulfure (107). Cet hétérodimère est associé à 4 protéines transmembranaires : CD3 γ , δ , ϵ , et ζ et forment ensemble le complexe TCR/CD3. Le TCR aura pour fonction la reconnaissance de l’antigène, le CD3 aura pour rôle la transmission intracytoplasmique du signal. Le complexe TCR/CD3 confère aux lymphocytes T la propriété de reconnaître des fragments peptidiques antigéniques associés aux molécules du CMH présenté par les CPA et ceci de manière spécifique (**Figure 12**) (107).

Figure 12. Le complexe récepteur des lymphocytes T (TCR)/CD3 – Source personnelle



CD, Classes de différenciation ; TCR, T cell receptor

Les lymphocytes T sont produits dans la moelle osseuse et migrent vers le thymus où ils se différencient en lymphocytes T auxiliaires (CD4⁺) ou cytotoxiques (CD8⁺), puis entrent dans le système circulatoire après maturation. Ils représentent 80 % des lymphocytes totaux.

Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs sont activés selon trois signaux distincts i) la reconnaissance via le TCR d'un peptide antigénique présenté par le CMH de classe II d'une CPA, ii) l'activation du signal de costimulation via la liaison de CD28 exprimé à la surface des lymphocytes T avec ses ligands CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-2) exprimés à la surface des CPA et enfin iii) la sécrétion de cytokines modulatrices des fonctions effectrices comme IL4 ou IL12.

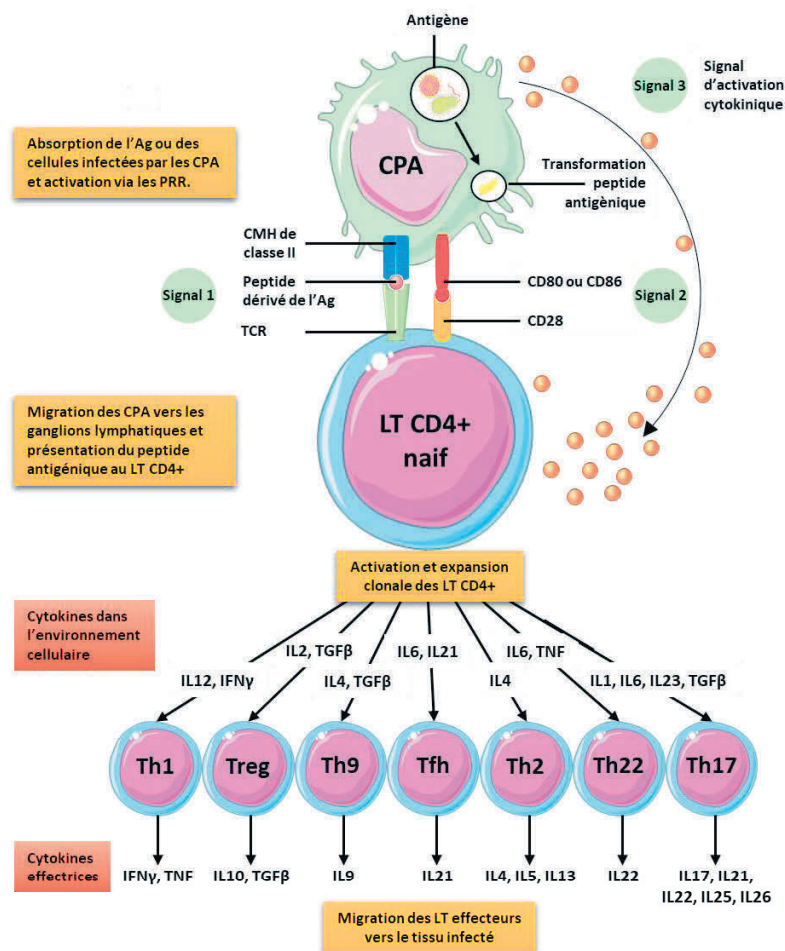
Une fois activées, ils prolifèrent et sécrètent un panel varié de médiateurs en fonction de la nature de l'antigène présenté. Les lymphocytes T CD4⁺ sont considérés comme les chefs d'orchestre de la réponse immunitaire adaptative et agissent via l'interaction cellule-cellule ainsi que par la sécrétion de cytokines. La réponse à médiation cellulaire sera privilégiée dans le cas d'une infection par un virus ou un micro-organisme intracellulaire ; la réponse à médiation humorale dans le cas d'allergènes ou de parasites extracellulaires.

Les lymphocytes T CD8⁺ sont activés lorsqu'ils reconnaissent l'antigène présenté par des molécules du CMH de classe I. En réponse, ils libèrent des substances cytotoxiques, telles que les perforines ou les granzymes, induisant l'apoptose de la cellule ciblée. Une troisième population de lymphocytes T sont les T régulateurs T (Treg), un sous-ensemble de lymphocytes T CD4⁺ ayant la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes T effecteurs.

Les Treg sont identifiables via l'expression du facteur de transcription Foxp3, et ont pour rôle de contrôler la réponse immunitaire par différents mécanismes comme la sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- β). Les Treg permettent d'éviter des lésions irréversibles pour l'hôte notamment en contribuant à la prévention des réponses auto-immunes.

Le réservoir de lymphocytes T CD4⁺ est hétérogène, il existe en effet différents sous-types dont le développement est contrôlé par divers facteurs de transcription et présentant des spécialités et des cytokines associées spécifiques (Th1, Th2, TH9, Th17, Th22, Tfh, Treg) (**Figure 13**).

Figure 13. Génération de lymphocytes T CD4⁺ effecteurs - Source personnelle

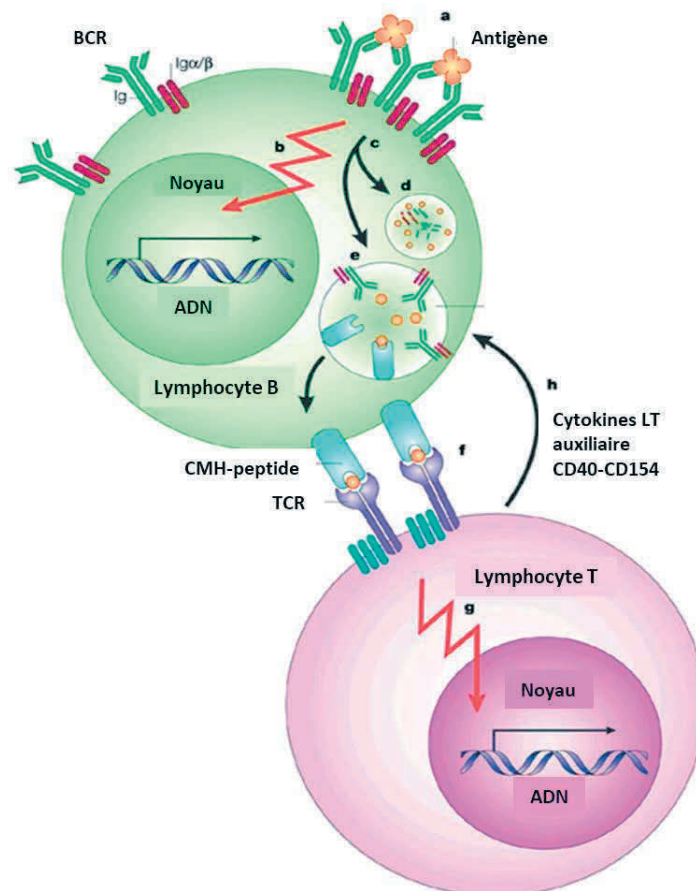


Ag, Antigène ; CD, Cluster de différenciation ; CMH, Complexe majeur d'histocompatibilité ; CPA, Cellule présentatrice d'antigène ; IL, Interleukine ; LT, Lymphocyte T ; TCR, T cell receptor ; TGF, Transforming growth factor ; TNF, Tumor necrosis factor

1.6.5.3. La coopération lymphocytaire

La formation d'une synapse immunologique avec présentation du peptide antigénique par les CPA via le CMH au lymphocytes T naifs va permettre l'activation de clones de lymphocytes T. Il est également important de mettre en avant la notion de coopération cellulaire lors de la réponse immunitaire adaptative. Une fois l'antigène fixé sur le récepteur des lymphocytes B (BCR) conduisant à leur activation, le BCR est internalisé et va induire la formation de nouveau complexe composé de peptides dérivés de l'antigène et de molécule du CMH de classe II. Ce nouveau complexe peptide-CMH II est alors transporté de nouveau vers la surface des cellules B, permettant leur reconnaissance par le récepteur TCR des lymphocytes T CD4⁺ aboutissant à leur activation. Les lymphocytes T CD4⁺ nouvellement activés induiront enfin l'activation complète et fonctionnelle des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8⁺ par le biais de sécrétions de cytokines et d'interactions cellule-cellule augmentant ainsi l'efficacité de la réponse. (Figure 14).

Figure 14. Interactions lymphocytes B-T – d'après (109)



ADN, Acide Désoxyribonucléique ; BCR, B-Cell Receptor ; CD, Cluster de différenciation ; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; TCR, T-Cell Receptor

La réponse immunitaire sera stoppée une fois l'antigène piégé ou éliminé de l'organisme. La perte de stimulation par l'antigène entraîne l'arrêt de sécrétion des cytokines et l'entrée en apoptose d'une partie des lymphocytes T. Certains lymphocytes T, différenciés en cellules mémoire, seront capables de survivre sur de longues périodes dans les ganglions lymphatiques ou la moelle osseuse, indépendamment de la stimulation antigénique. Ce réservoir de cellules mémoire permettra d'induire une réponse secondaire en cas de nouvelle rencontre avec le même antigène.

1.6.5.4. *Altérations quantitatives*

De manière similaire à la réponse immunitaire innée, les déficits immunitaires peuvent altérer également le nombre et la fonction des cellules impliquées dans l'immunité adaptative.

La caractéristique majeure de l'altération de la réponse immunitaire adaptative est une considérable lymphopénie observée chez les patients, c'est-à-dire une faible quantité de lymphocytes circulants. Elle peut être globale ou porter sélectivement sur une population ou sous-population lymphocytaire, majoritairement les lymphocytes T, et ainsi ne pas être reflétée par le nombre de lymphocytes totaux dans le sang (110). Les principales conséquences associées sont les infections opportunistes et l'augmentation du risque de pathologies malignes et auto-immunes (111). Une lymphopénie peut accompagner à la fois les DIP et les DIS. Elle peut par exemple survenir dans des cas de déficits immunitaires humoraux (DIH), groupe hétérogène de pathologies au sein des DIP présentant un défaut de production d'immunoglobuline (Ig) (112). Les agammaglobulinémies, comme la maladie de Bruton, entraînent une absence complète de développement des lymphocytes B et donc une absence de production d'immunoglobulines, les autres compartiments cellulaires n'étant pas impactés (113). La lymphopénie est également une des caractéristiques du Syndrome de Wiskott-Aldrich où des altérations du nombre et de la fonction des lymphocytes B et T sont observées (114). Enfin, dans certains cas, un seul sous-type cellulaire est déficient tel que dans la lymphocytopenie T CD4 idiopathique (115).

Au cours des DIS, de nombreux facteurs peuvent induire une lymphopénie. L'une des causes les plus fréquentes dans le monde est la malnutrition protéino-calorique (116), mais la lymphopénie peut également être consécutive à un sepsis (117) ou à une infection virale, la plus connue étant le VIH (118), la plus récente étant la COVID-19 (119).

Certains troubles systémiques à caractère auto-immun peuvent également être à l'origine d'une lymphopénie comme le lupus érythémateux disséminé (120). Néanmoins, les facteurs extérieurs majeurs causant une lymphopénie sont d'origine iatrogène et résultent de l'utilisation de chimiothérapie cytotoxique (121), de radiothérapie (122) ou de traitement immunosuppresseurs (123).

1.6.5.5. *Altérations fonctionnelles*

Les altérations de la réponse immunitaire adaptative ne sont pas exclusivement quantitatives. Certains déficits immunitaires, primitifs ou secondaires, peuvent également engendrer des défauts phénotypiques ou fonctionnels des cellules, et ce, malgré une quantité normale de cellules. Concernant les DIP, c'est notamment le cas pour le DICV qui est un déficit humoral caractérisé par de très faibles taux d'immunoglobulines, conséquence d'un défaut de maturation des lymphocytes B malgré un nombre normal (124). C'est également le cas pour le syndrome d'hyper immunoglobuline M lié à l'X, où une diminution de l'expression du CD40L à la surface des lymphocytes T altère leur fonction et ne permet pas l'initiation de la commutation isotypique, entraînant une production exclusive d'IgM (125). Ces altérations conduisent à une incapacité de produire une réponse immunitaire efficace contre les agents pathogènes invasifs.

Pour les DIS, de nombreux facteurs de diverses natures peuvent une nouvelle fois être à l'origine d'une altération fonctionnelle de la réponse immunitaire adaptative. L'immunosénescence par exemple est associée à une diversité restreinte du répertoire des lymphocytes B et induit des phénotypes de lymphocytes B ayant une capacité réduite à sécréter des anticorps, des cytokines et à présenter des antigènes (126). Elle conduit également à une oligoclonalité des lymphocytes T associée à une capacité limitée du thymus à générer des phénotypes naïfs de LT, induisant des réponses réduites aux nouveaux antigènes (127).

Le sepsis peut induire des profils d'épuisement ou d'anergie des lymphocytes T avec des altérations fonctionnelles majeures comme la diminution de leur capacité à produire de l'IL-2 et de l'IFN- γ ou à proliférer en réponse à une stimulation (128). Le diabète conduirait également à une anergie des LT, se traduisant par une faible réponse lymphoproliférative à la stimulation par des mitogènes (129,130).

Cette anergie pourrait être causée par un phénotype de cellule dendritique plus mature induit dans des conditions hyperglycémiques, entraînant une altération de la capacité proliférative et de la survie des lymphocytes T CD4⁺ (131). Enfin, les hémopathies malignes et non-malignes sont également responsables d'altérations fonctionnelles des lymphocytes. À titre d'exemple, les leucémies lymphoïdes entraînent des déficits de l'immunité à médiation humorale et cellulaire avec une hypogammaglobulinémie et une forte diminution des capacités cytotoxiques et prolifératives des lymphocytes T (132,133). Elles induisent également un accroissement de l'activité des Tregs conduisant, via la sécrétion des cytokines suppressives TGF- β et l'IL-10, à une importante inhibition des lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et NK (134).

Enfin, l'une des principales sources d'altérations fonctionnelles des cellules de la réponse immunitaire adaptative est l'utilisation de traitements immunosuppresseurs et d'agents cytotoxiques. Les corticoïdes entraînent une diminution de la production de cytokines (IL-1, IL-6 et TNF- α), une altération du chimiotactisme leucocytaire, de l'adhésion cellulaire (135), de la phagocytose et une anergie lymphocytaire (136,137). Les anticalcineurines notamment la ciclosporine et le tacrolimus, utilisés dans la prévention et le traitement du rejet de transplantation et dans la gestion des maladies auto-immunes, vont interférer avec l'activation, la prolifération, la différenciation et la production de cytokines des lymphocytes T en empêchant la transcription de l'IL-2 (48,138,139). Certains agents immunosuppresseurs comme le Mycophénolate Mofétil, immunosuppresseur de la famille des antimétabolites indiqué pour la prévention du rejet aigue d'allogreffe d'organes, inhibe la synthèse *de novo* de nucléotides entraînant un effet cytostatique sur les lymphocytes B et T en bloquant leur capacité de prolifération (140). Les traitements par anticorps monoclonaux sont également responsables d'altérations de la réponse adaptative, tels que les anticorps monoclonaux anti-CD25 qui ciblent la sous-unité alpha du récepteur de l'IL-2 empêchant la fixation de l'IL-2 sur les lymphocytes T et inhibent leur prolifération (141). Les traitements peuvent également cibler des cytokines spécifiques, comme les anti-TNF α ou anti-IL6, largement utilisés dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques (142).

Les sources d'altérations, quantitatives et/ou fonctionnelles, des mécanismes, composants et voies de la réponse immunitaire sont donc nombreuses et diverses. Pour les DIP, les avancées technologiques et le développement de nouvelles méthodes ont permis d'accélérer l'identification des défauts du système immunitaire et des aberrations cellulaires, moléculaires et génétiques sous-jacentes. Ces évolutions permettent ainsi de mettre couramment à jour la classification, d'améliorer la compréhension des différents syndromes et d'optimiser leur prise en charge (**Tableau 2**). Concernant les DIS, comme décrit précédemment, les nombreux facteurs influençant le déficit immunitaire ont des effets spécifiques sur la fonctionnalité immunitaire et affectent différents aspects ou composants du système immunitaire (**Tableau 6**).

Tableau 6. Liste non exhaustive des conditions pouvant entrainer un DIS – Adapté d’après (89)

Condition	Effet sur la fonctionnalité immunitaire
Âges extrêmes	
- Période néonatale	Organes lymphoïdes immatures Absence de mémoire immunitaire Prématurés: Faible taux d'IgG maternel Diminution de la réserve/fonction des neutrophiles Diminution de l'activité des NK Diminution de la signalisation des TLR Diminution de la production de cytokines Diminution des composants du complément.
- Immunosénescence	Diminution de l'immunité cellulaire spécifique de l'Ag Faible production/oligoclonalité des lymphocytes T Répertoire des cellules B restreints
Malnutrition	
Diminution de la réponse immunitaire cellulaire Affaiblissement des barrières muqueuses	
Environnementale	
- Lumière UV	Augmentation de l'apoptose des lymphocytes
- Radiations	Augmentation de la sécrétion de cytokines tolérogènes
- Hypoxie	Cytopénies Anergie et diminution de l'immunité cellulaire Activation immunitaire non spécifique
Troubles métaboliques	
- Diabète	Diminution de la lymphoprolifération induite par les mitogènes Phagocytose défectueuse Diminution de la chimiotaxie
- Urémie chronique	Diminution de la réponse immunitaire cellulaire Diminution de la génération de réponses anticorps mémoire Diminution de la chimiotaxie
Anomalie chromosomique	
- Trisomie 21 (syndrome de Down)	Phagocytose défectueuse Chimiotaxie défectueuse Défauts variables des réponses immunitaires spécifiques aux Ag
Pathologique	
- VIH	Lymphopénie des T Anergie et diminution de la réponse immunitaire cellulaire Réponses défectueuses aux anticorps spécifiques des Ag
- Hématologique	Faible production Lymphocytes B et T
Iatrogénique	
- Anti-inflammatoire	Lymphopénie
- Immunomodulateurs	Anergie et diminution de la réponse immunitaire cellulaire
- Immunosuppresseurs	Diminution des cytokines pro-inflammatoires Diminution de la phagocytose Diminution de la chimiotaxie
- Agents cytotoxiques	Neutropénie Affaiblissement des barrières muqueuses
Chirurgie et trauma	
Perturbation des barrières épithéliales et muqueuses Anergie des lymphocytes T par activation immunitaire non spécifique	

Être en mesure **d'identifier les altérations des composants immunitaires** apparaît donc comme essentiel afin d'améliorer la prise en charge des patients immunodéprimés.

Un **modèle d'étude unique** d'immunodépression pour la mise au point de stratégies d'évaluation de la réponse immunitaire fonctionnelle est **l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)**. Les receveurs de transplantation de CSH présentent un « reset » du système immunitaire, caractérisé par la perte du répertoire immunitaire spécifique qui sera maintenue sur des longues périodes de temps puis suivie d'un profil de reconstitution immunitaire graduel et individuel.

2. Un cas particulier de DIS – L’allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

2.1. Les cellules souches hématopoïétiques

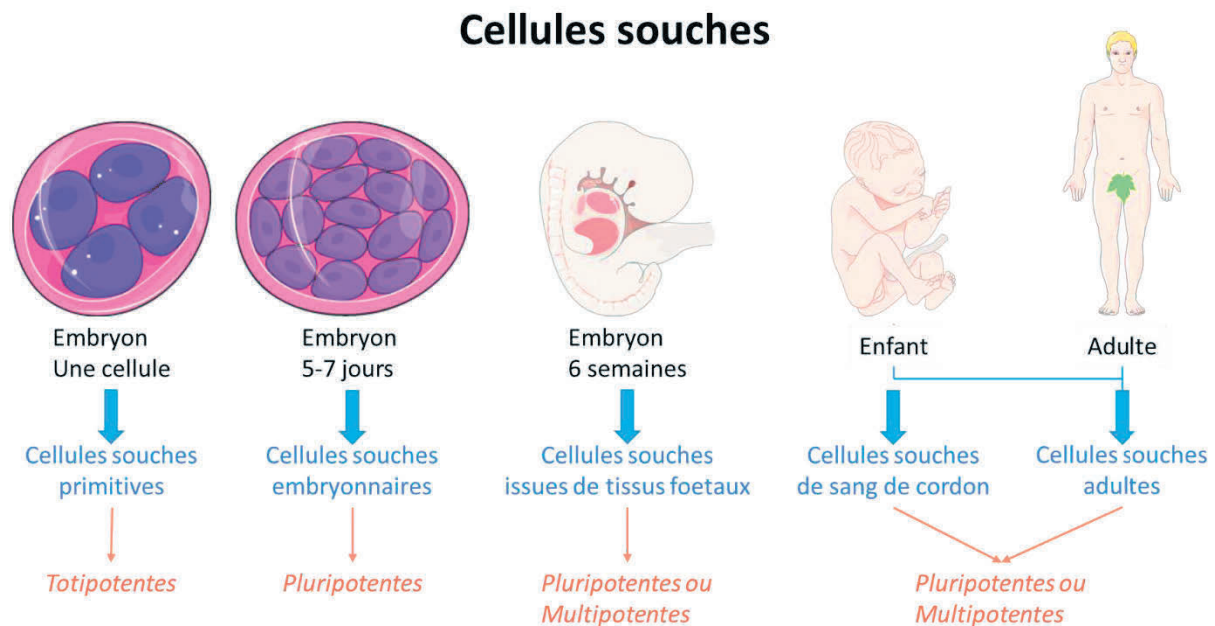
Une cellule souche (CS) est par définition une cellule indifférenciée ayant les capacités de se développer à l’infini par mécanisme d’auto-renouveaulement, mais également de devenir une cellule du corps humain spécifique mature via leur capacité de différenciation. Il existe quatre grand types de CS classés selon leur stade et capacité de différenciation (**Figure 15**):

- CS totipotentes, présentes dans l’œuf après fécondation et pouvant engendrer l’ensemble des types cellulaires présents dans le corps humain.

- CS pluripotentes, issues de l’embryon et pouvant se différencier en n’importe quel tissu de l’organisme.

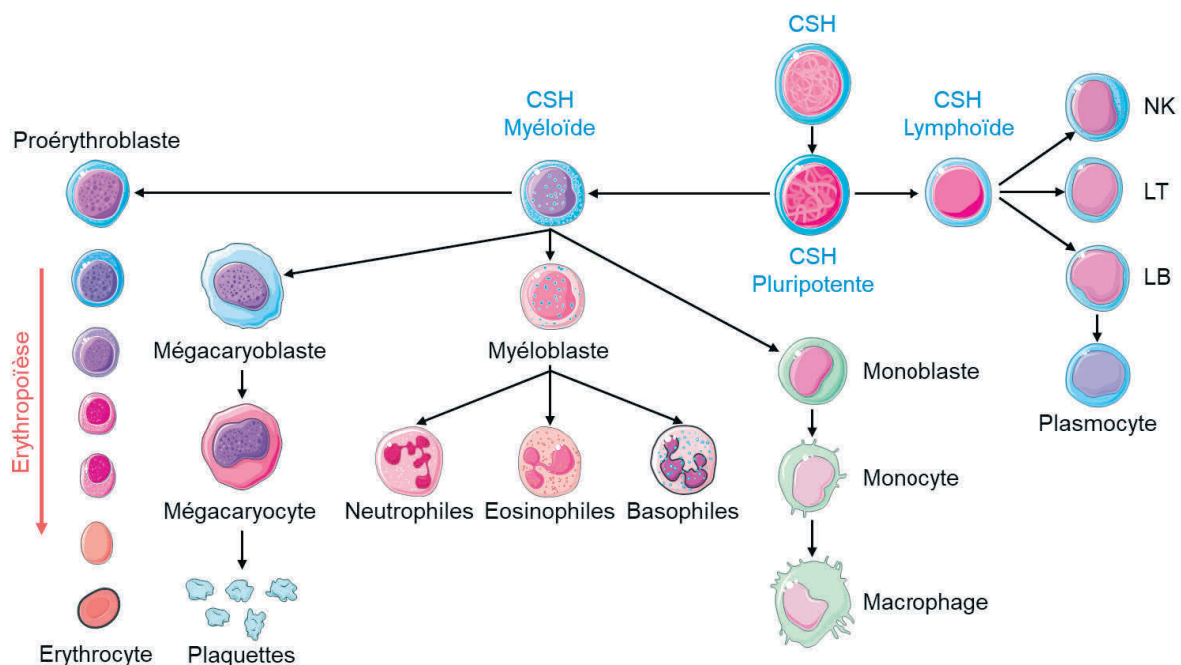
- CS adultes unipotentes et multipotentes, cellules les plus différenciées issues de la différenciation des cellules souches fœtales et pouvant respectivement engendrer un ou différents types cellulaires au sein d’une même lignée. Ces dernières par leur grande capacité d’auto-renouveaulement et de différenciation spécifique permettent le maintien des organes et tissus dans un état physiologique.

Figure 15. Différenciation des cellules souches hématopoïétiques – Source personnelle



Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont présentes chez l'adulte principalement dans la moelle osseuse (MO) mais peuvent être retrouvées dans le sang périphérique et dans le sang de cordon ombilical. Les CSH, malgré leur faible nombre (0,01 – 0,05 % des cellules médullaires) sont à l'origine de la fabrication de l'ensemble des globules présents dans le sang, on parle alors d'*Hématopoïèse* (du Grec αἷμα, αίματος : « le sang » et ποιεῖν : « faire, fabriquer »). La production des cellules présentes dans le sang est un processus physiologique et dynamique, où une notion d'équilibre existe entre la production des CSH par division cellulaire (capacité d'auto-renouvellement) et la perte des CSH à la suite de leur engagement vers les lignées cellulaires spécifiques (différenciation). Bien que les premières étapes de différenciation soient communes, les CSH vont ensuite se différencier en progéniteur, dépendant de la voie engagée, afin de former les différents composants du sang. En s'engageant dans la voie dite myéloïde, les CSH formeront différentes cellules telles que les macrophages, les globules rouges et blancs (monocyte et polynucléaire) ou encore les plaquettes. En s'engageant dans la voie dite lymphoïde, les CSH conduiront à la formation des différents lymphocytes (NK, B, T et plasmocytes) (**Figure 16**).

Figure 16. Les différentes étapes de l'Hématopoïèse - Source personnelle



CSH, cellules souches hématopoïétiques ; LB-LT, lymphocytes B et T ; NK, *natural killer cells*

Les CSH sont donc capables de s'auto-renouveler à l'infini et de se différencier en plusieurs types cellulaires permettant le maintien de l'homéostasie au sein du corps humain. Ces caractéristiques ont conduit à l'utilisation des CSH dans le cadre de nombreux traitements pour des troubles hématologiques et notamment pour le renouvellement des cellules sanguines par la voie de la greffe.

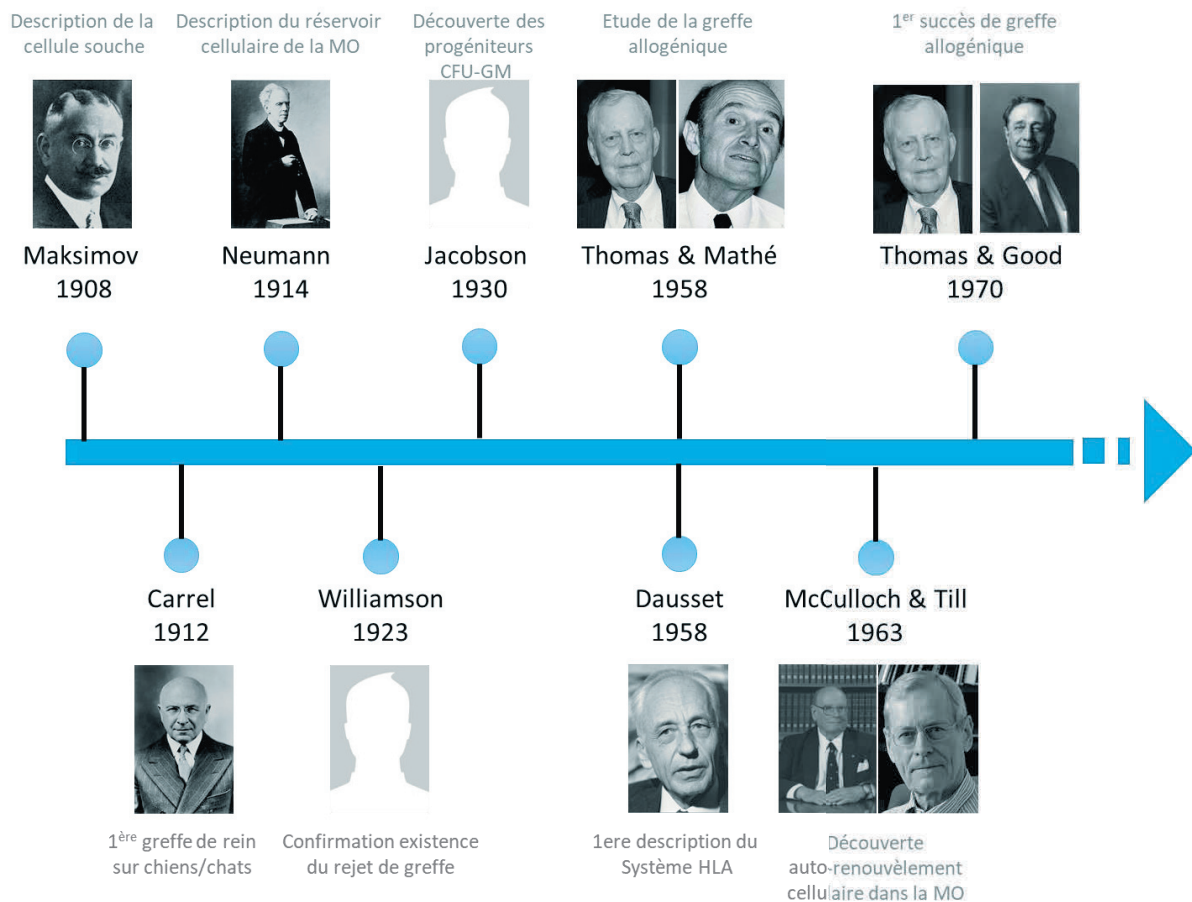
2.2. La greffe de CSH

2.2.1. Dates marquantes et évolution

En 1908, le scientifique russe Alexander Maksimov décrit pour la première fois le terme de «cellules souches» et émet l'hypothèse de l'existence de CSH (143). En 1912, Alexis Carrel expérimente la greffe de reins sur des chiens et des chats, il démontre notamment que la transplantation d'organes dépend de la capacité à connecter les vaisseaux sanguins (144). Il décrit surtout pour la première fois la notion de rejet de greffe et l'existence d'autres facteurs de l'hôte pouvant impacter ce processus ; observations par la suite confirmées par Williamson en 1923 (145). En 1914, Franz Ernst Christian Neumann décrit la moelle osseuse comme un organe contenant des cellules capables de donner naissance à l'ensemble des cellules du corps humain et notamment aux cellules différenciées du sang. Dans les années 1930, Jacobson découvre l'existence des progéniteurs CFU-GM (de l'anglais *Colony-Forming Unit-Granulocyte Macrophage*) à partir de rates de souris de génotype identique. En période post-guerre dans les années 1950, ils démontrent avec Lorenz que des cellules adultes murines contenues dans la rate et la moelle osseuse sont capables de protéger la rate et de reconstituer le système hématopoïétique de souris irradiées de manière létale (146). L'existence des CSH sera ensuite confirmée dans les années 1960 par les Dr McCulloch et Dr Till, notamment en 1963 où ils mettent en évidence des cellules auto-renouvelables dans la moelle osseuse de souris (147). En 1958, Jean Dausset décrit le système majeur d'histocompatibilité humain, le système HLA (de l'anglais *Human Leukocyte Antigen*) et démontre son importance dans la transplantation d'organe ou la greffe de moelle osseuse (148). La même année, les premiers essais cliniques décrivant la faisabilité d'une prise de greffe de moelle osseuse issue d'un donneur différent ont lieu, on parle alors de greffe allogénique ; aux USA par le Dr Thomas puis en France par le Dr Mathé, qui expérimente la greffe sur cinq physiciens yougoslaves irradiés (149,150).

Les premières réussites cliniques de transplantation allogénique de CSH via un donneur HLA-identique apparenté interviennent peu avant les années 1970 ; par le Dr Thomas pour traiter une leucémie (151) et par le Dr Good pour la guérison d'un syndrome d'immunodéficience sévère (SIS)(152) (**Figure 17**).

Figure 17. Historique des découvertes associées à la greffe de CSH – Source personnelle



À la suite de ces premiers succès, de nombreux faits marquants sont intervenus dans les années 1970-1980 notamment la découverte de CSH dans le sang du cordon ombilical (153), l'amélioration des techniques de conservation par congélation ou encore les premières greffes de sang de cordon ou de moelle osseuse avec donneur non HLA-identique. Dans les années 1980-1990, le concept de greffe de moelle osseuse évolue pour devenir greffe de CSH ; expliqué notamment par la découverte de nouvelles sources de CSH. En 1984, la découverte de l'antigène CD34 présent à la surface des CSH (154) a permis d'améliorer et de contrôler la qualité des greffons prélevés.

Il existe deux types de transplantation de CSH, on parle de greffe autologue lorsque l'on utilise les propres cellules du patient à traiter ; ou de greffe allogénique (allogreffe) lorsque l'on utilise des cellules provenant d'un donneur.

2.2.2. Activité de la greffe de CSH en France

En France au cours de l'année 2020, 77 centres ont réalisé et déclaré leur activité de greffes de CSH, plus de la moitié d'entre eux n'ont réalisé qu'un seul type de greffe (autologue n=40, allogénique n=4), le reste ayant eu une activité mixte (n=33). L'activité de greffe de CSH était stable depuis 6 ans, mais a observé une légère baisse au cours de cette année, principalement due à la pandémie de COVID-19 ayant impacté de nombreux protocoles cliniques (**Tableau 7**).

Tableau 7. Evolution du nombre de greffes de CSH en France – d'après (155)

Année	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Nombre de greffes autologues	3003	2766	3034	3118	3125	3151	3322	3340	3168	2971
Nombre de greffes allogéniques	1772	1721	1872	1966	1964	1958	1902	1946	1964	1878
Nombres total de greffes	4775	4487	4906	5084	5089	5109	5224	5286	5132	4849

Par souci de clarté pour la lecture de cette thèse, nous ne développerons par la suite que les spécificités autour de l'allogreffe.

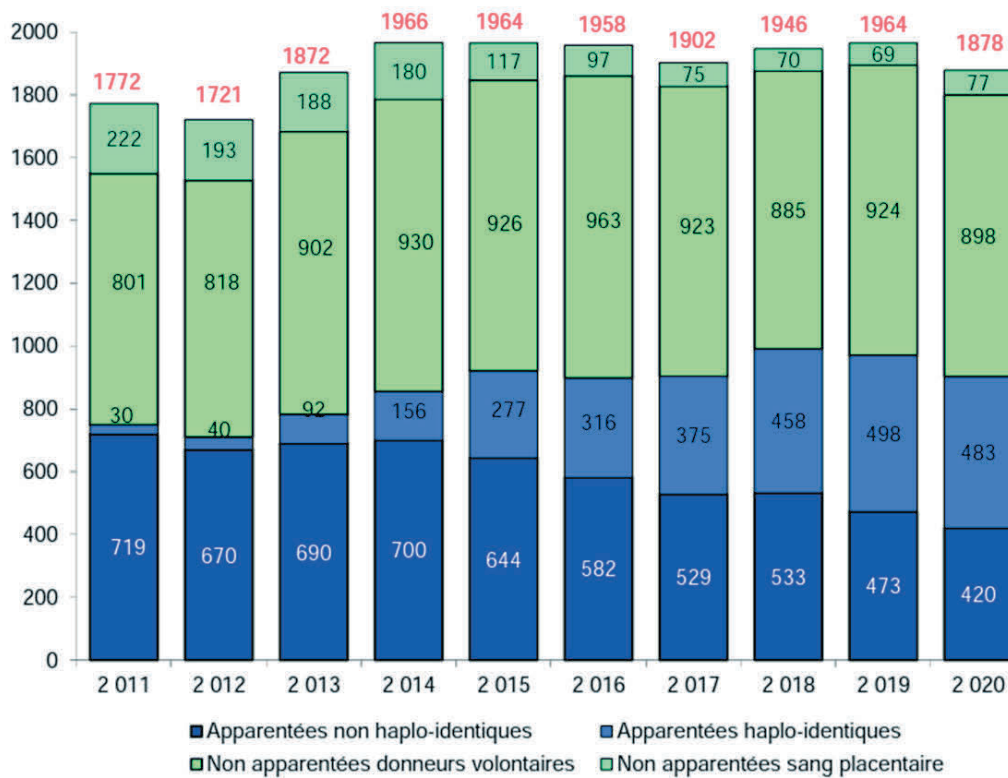
2.3. L'allogreffe de CSH

L'allogreffe de CSH peut avoir plusieurs objectifs, comme le remplacement ou la restauration d'une moelle osseuse cancéreuse ou non-fonctionnelle et/ou d'un système immunitaire défectueux. Elle est utilisée comme un traitement systémique pour soigner différentes pathologies telles que les hémopathies malignes ou non malignes, les tumeurs solides, les maladies auto-immunes ou les déficits immunitaires primitifs.

2.3.1. Les chiffres de l'allogreffe de CSH en France

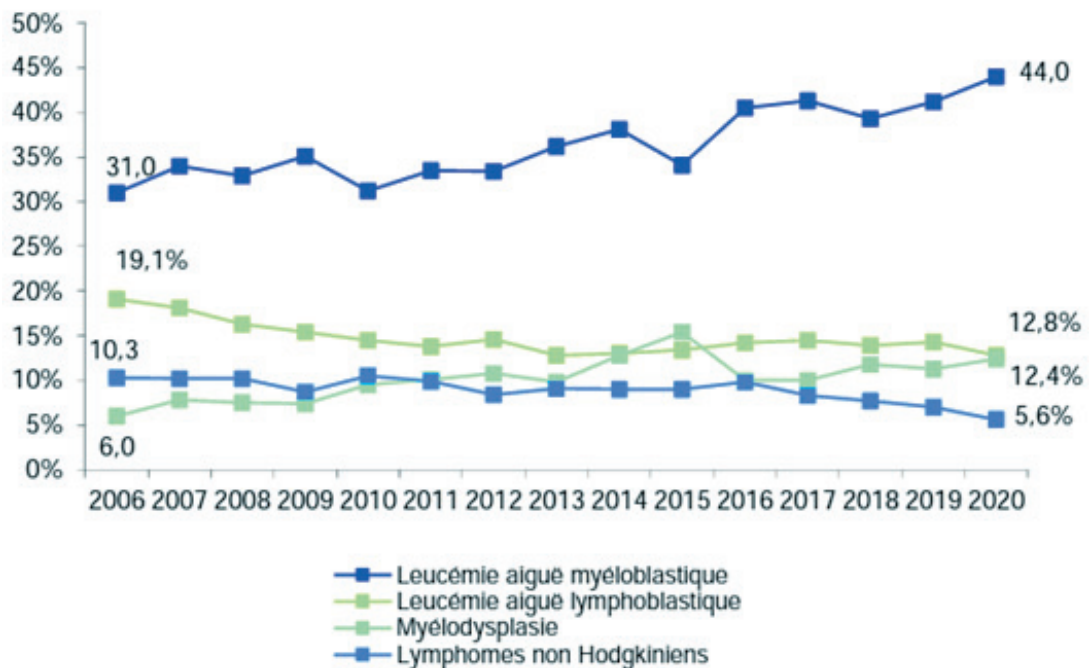
L'ensemble des tableaux/graphiques présentés ci-après résume l'activité de greffe allogénique en France pour l'année 2020. On recense au cours de cette année 1878 allogreffes réalisées chez 1857 patients, donnée en augmentation par rapport aux années précédentes, avec une répartition quasi-similaire entre donneurs apparentés et non apparentés dont l'activité reste stable (**Figure 18**).

Figure 18. Evolution du nombre d'allogreffe de CSH selon le type de donneur – d'après (155)



Les indications d'allogreffe sont globalement identiques depuis plus de 10 ans, peu importe l'origine du donneur ou de la source de CSH. Les hémopathies malignes représentent 90 % des indications d'allogreffe (**Figure 19**).

Figure 19. Evolution de la répartition des indications d'allogreffe de CSH - d'après (155)



Les quatre principales hémopathies pour lesquelles l'allogreffe de CSH est indiquée sont :

- La leucémie aiguë myéloblastique (LAM): la LAM est un cancer des cellules du sang prenant naissance dans les cellules souches myéloïdes. Elle conduit à une surproduction et à un développement anormal des cellules du sang, décrites comme leucémiques ou « immatures ». La LAM entraîne des cytopénies, anémies, neutropénies et thrombocytopénies induites par un défaut de production de différents types cellulaires. Le nombre de nouveau cas de LAM estimé en France en 2018 était de 3 428 (156).
- La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) : la LAL est un cancer similaire à la LAM qui ne se différencie que par l'origine du compartiment cancéreux et des cellules impactées. Les LAL prennent naissance dans les cellules souches lymphoïdes et impactent le développement des lymphocytes. Les LAL ont touché 900 personnes en France en 2018 dont 45 % d'enfants (inférieur à 15 ans), il s'agit du cancer pédiatrique le plus fréquent (156).
- La myélodysplasie (SMD) : la SMD est une maladie touchant la moelle osseuse et dont le fonctionnement anormal induit une sous-production des cellules sanguines normales (globules rouges et blancs et plaquettes) provoquant ainsi une chute du nombre de cellules sanguines circulantes. Les SMD ont touché 4 735 personnes en France en 2018 dont 61 % d'hommes (156).

- Les lymphomes non hodgkiniens (LNH) : les LNH sont des cancers du système lymphatique qui induisent une prolifération anormale des lymphocytes B (85 % des cas) ou T (15 % des cas) et entraînent une baisse globale de l'immunité. Il existe plus de 80 LNH répertoriés, classés selon leur vitesse d'évolution (agressifs/indolents) et qui se différencient selon des caractéristiques morphologiques, immunologiques, génétiques ou cliniques. Les LNH représentent plus de 90 % des lymphomes diagnostiqués et près de 22 000 nouveaux cas ont été estimés en France sur l'année 2018 (156).

2.3.2. Procédure de l'allogreffe de CSH

- **Principes généraux de l'allogreffe :**

L'allogreffe de CSH est réalisée selon trois grandes étapes, i) la collection des CSH, ii) le conditionnement, ou préparation du patient à la greffe et iii) la réinjection des CSH. L'allogreffe conduira ensuite à la reconstitution d'un nouveau système hématologique et immunitaire. L'effet immunologique recherché est la réaction du greffon contre les cellules pathologiques du receveur, nommé effet GvL (GvL de l'anglais *Graft versus leukemia*) ; tout en limitant le risque de réaction du greffon contre l'hôte, nommé GvHD (GvHD, de l'anglais *Graft versus Host Disease*).

En amont de la collection de CSH le malade va recevoir un traitement à l'aide d'une chimiothérapie et/ou radiothérapie dans le but de réduire la maladie à son plus bas niveau. De plus, de manière spécifique à l'allogreffe le protocole de collection doit prendre en compte en amont la compatibilité entre le donneur et le receveur. Cette compatibilité est mesurée à partir du système majeur d'histocompatibilité humain HLA portant sur 6 antigènes différents répartis en deux classes : HLA-A, HLA-B, HLA-C (Classe I) et HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DPB1 (classe II). On parle alors de greffe génoïdétique, lorsque le donneur est de la même famille que le receveur (frère/sœur portant les mêmes antigènes HLA) ; phéno-ïdétique, lorsque la greffe est faite à partir de donneurs volontaires non apparentés ; et haploïdétique, lorsque le donneur et le receveur n'ont que 50 % de compatibilité (parent, frère/sœur ou enfant).

2.3.2.1. La préparation de l'allogreffe

- **La collection des CSH :**

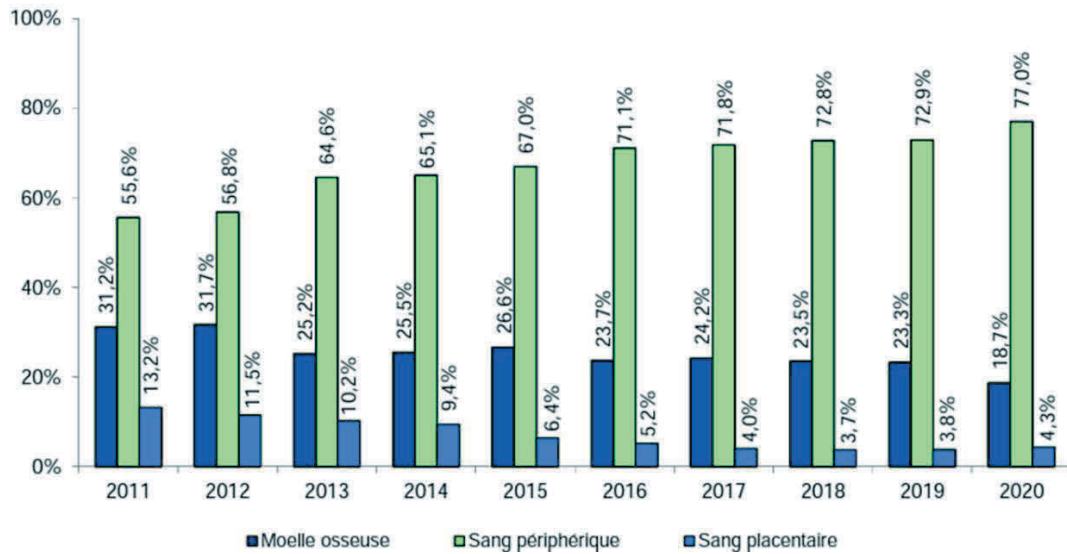
Trois principaux réservoirs sont à présent disponibles: la moelle osseuse, le sang périphérique et le sang placentaire. Les CSH localisées dans la moelle osseuse peuvent être prélevées par ponction au niveau du bassin au bloc opératoire sous anesthésie générale (durée de 2 à 4 heures). Les CSH présentes dans le sang périphérique sont recueillies par prélèvement sanguin (cytaphérèse) après une phase de mobilisation correspondant à une stimulation de 4 jours par des facteurs de croissance recombinant (GCSF, de l'anglais *granulocyte colony-stimulating factor* ou GMCSF *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). Enfin, le sang placentaire est récolté au moment de l'accouchement, son utilisation est principalement limitée aux enfants le nombre de CSH étant trop faible pour greffer un adulte. Parmi les trois sources de CSH disponible, la principale est le sang périphérique qui représente à elle seule plus de 77 % des allogreffes réalisées indépendamment de l'origine du donneur (**Tableau 8 - Figure 20**).

Tableau 8. Activité d'allogreffe de CSH, par type de donneur et d'origine du greffon. – D'après (155)

Source / Type de greffe	Allogreffe apparentées	Allogreffe non apparentées	Total
Moelle osseuse (%)	241 (26.7)	110 (11.3)	351 (18.7)
Sang périphérique (%)	658 (72.9)	788 (80.8)	1446 (77)
Sang placentaire (%)	4 (0.4)	77 (7.9)	81 (4.3)
Total	903	975	1878

L'utilisation du sang périphérique est en constante augmentation, par rapport aux deux autres sources de CSH qui ne cessent de décroître depuis une décennie, principalement de par la plus grande facilité de recueil des CSH dans ce compartiment (**Figure 20**).

Figure 20. Evolution de la répartition des sources de greffon de l'allogreffe de CSH - d'après (155)



- **Le conditionnement :**

Cette seconde étape du protocole a pour objectif de préparer l'organisme du receveur à la transplantation afin de minimiser le risque de rejet et de rechute. Le conditionnement pré-greffe consiste en une chimiothérapie intensive et est spécifique à divers paramètres comme les antécédents médicaux, la pathologie traitée ou encore l'âge.

Ils existent deux principaux types de conditionnement utilisés dans l'allogreffe :

- Myéloablatif : ce conditionnement conduit à la destruction des cellules tumorales du receveur par chimiothérapie et/ou irradiation corporelle totale. Il engendre en parallèle la suppression de l'ensemble du système hématopoïétique et immunitaire du receveur. Ce dernier sera alors remplacé par celui du donneur, avec pour objectif d'obtenir un effet GvL. Malgré l'avantage bénéfique de l'effet GvL, l'utilisation de ce protocole est en diminution notamment à cause des nombreux effets indésirables liés à la chimiothérapie intensive.

- Non-Myéloablatif ou dit « d'intensité réduite » : ce conditionnement est indiqué chez les patients dont la chimiothérapie à fortes doses présente des risques trop importants (patients âgés, présentant des comorbidités ou ayant reçu de multiples lignes préalables de chimiothérapie). Il est basé sur l'utilisation d'une chimiothérapie associée la plupart du temps à un traitement immunosuppresseur induisant un blocage de l'activité des lymphocytes du receveur (sérum anti-lymphocytaire).

Il permet alors aux receveurs de tolérer et de ne pas rejeter le greffon du donneur qui va alors agir selon l'effet GvL contre les cellules tumorales du receveur.

L'utilisation de ce protocole de conditionnement est en progression permanente depuis une dizaine d'années et a notamment permis l'accès au traitement par allogreffe à des patients de plus en plus âgés, augmentant de manière constante depuis une décennie l'âge moyen des patients receveurs d'une allogreffe de cellules CSH.

- **La réinjection des CSH :**

Post conditionnement les patients vont recevoir la greffe de CSH proprement dite, qui se présente sous forme de transfusion par un cathéter veineux. La greffe peut durer de 1 à plusieurs heures selon le nombre de cellules souches administrées.

Indépendamment du protocole de conditionnement, après transplantation les receveurs d'allogreffe de CSH vont se trouver dans une phase d'aplasie profonde caractérisée par un « silence immunitaire ». Au cours de cette phase, ils n'auront plus ou presque plus de défense immunitaire mobilisable compte tenu de la destruction chimio-induite de la moelle osseuse pour réduire la masse tumorale et pour limiter le risque de rejet de greffe. Cette période d'aplasie est associée à un risque élevé de complications infectieuses (157).

Cette phase d'immunodépression se maintiendra sur des longues périodes de temps, chiffrables en mois, voire années et peut être prolongée par l'utilisation de thérapies immunosuppressives. Tant que la reconstitution immunitaire n'est pas achevée, les receveurs de CSH peuvent présenter un risque infectieux accru, une rechute de la maladie sous-jacente ou une GvHD.

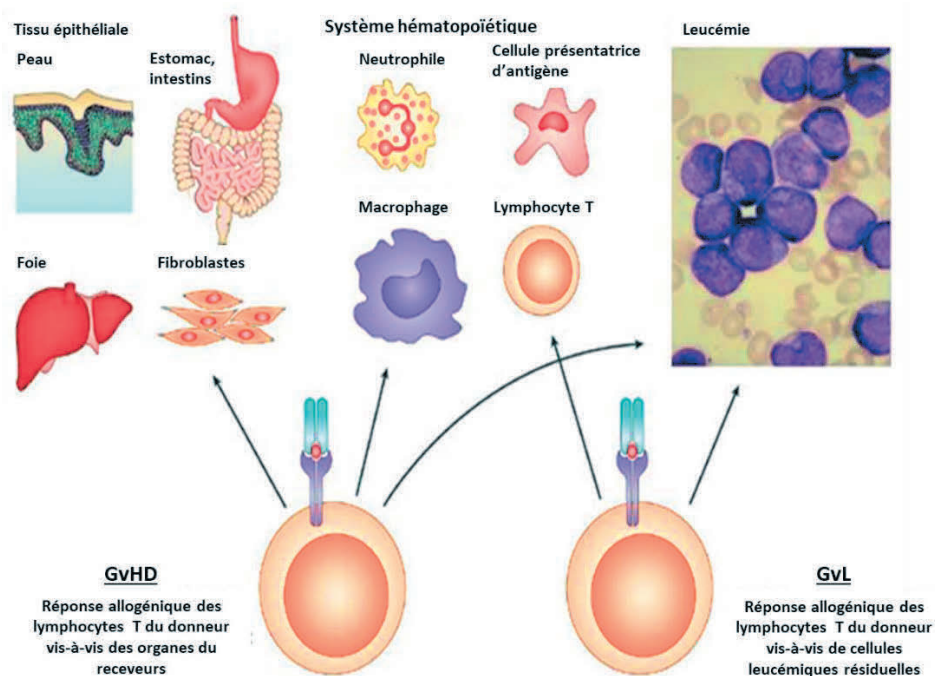
2.3.2.2. *Les effets immunologiques*

Parallèlement au remplacement du système hématologique et/ou immunitaire défectueux, la réaction finale recherchée au travers l'allogreffe de CSH est une immunothérapie anti-tumorale, appelée l'effet GvL. Cet effet est basé sur la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales restantes au sein de l'organisme du receveur, principalement par les cellules lymphocytaires contenues au sein du greffon.

Ce nouveau système immunitaire fonctionnel réduira ainsi considérablement les risques de rechute de la maladie en supprimant les cellules cancéreuses résiduelles.

Parallèlement à l'effet GvL apparaîtra de manière fréquente une complication sévère pour le receveur qui est responsable d'une importante morbidité et mortalité nommée GvHD. Décrit par Billingham en 1966 (158) elle correspond à une réaction des cellules immunocompétentes présentes dans le greffon du donneur contre les antigènes « étrangers » du receveur, reconnus comme appartenant au « non-soi ». L'effet GvL et GvHD se distingue en fonction des cellules reconnues par les composants fonctionnels du système immunitaire présents au sein du greffon (Figure 21).

Figure 21. Effet GvL et GvH – d'après (159)



Il existe deux formes principales de la GvHD, la forme aiguë (aGvHD, de l'anglais *acute*) et la forme chronique (cGvHD, de l'anglais *chronic*). Elles se différencient en fonction des manifestations cliniques (organes et tissus affectés), des symptômes et principalement du délai de survenue (après ou avant les 100 premiers jours suivant l'allo-CSH). L'occurrence de la GvHD est importante dans le contexte de l'allogreffe de CSH, elle intervient dans 30-50 % des cas sous sa forme aiguë, et affecte 30 à 70 % des patients sous sa forme chronique (160). L'aGvHD touche principalement la peau, le foie et le tube digestif, et se manifeste par des éruptions cutanées, une jaunisse ou des troubles gastro-intestinaux. On distingue trois formes principales d'aGvHD, faible, modérée ou grave.

Cette classification est effectuée en fonction du nombre et du degré de sévérité des organes impactés (stade) et gradué de I (forme la plus légère) à IV (forme la plus grave) (**Tableau 9**).

Tableau 9. Manifestation clinique, stade et classification de l'aGvHD - Adapté d'après (161)

Organe	Manifestation clinique	Stade
Peau	Éruption érythémateuse, maculopapuleuse, touchant les paumes et la plante des pieds Maladie graves: Bulle	Stade 1=<25% d'éruption Stade 2=25%-50% d'éruption cutanée Stade 3 = érythrodermie généralisée Stade 4=Bulles
Tube digestif	Nausées, vomissements, crampes abdominales, diarrhée, occlusion intestinale (iléus), distension, saignements.	Stade 1= Diarrhée >500mL/jours Stade 2=Diarrhée >1000mL/jours Stade 3 = Diarrhée >1500mL/jours Stade 4= Iléus, saignement
Foie	Hyperbilirubinémie et augmentation de la phosphatase alcaline	Stade 1= Bilirubine 2-3 mg/dL Stade 2= Bilirubine 3.1-6 mg/dL Stade 3= Bilirubine 6.1-15 mg/dL Stade 4= Bilirubine>15 mg/dL

Grade	Peau	Intestin	Foie
I	Stade 1-2	0	0
II	Stade 1-3	1 et/ou	1
III	Stade 2-3	2-4 et/ou	2-3
IV	Stade 2-4	2-4 et/ou	2-4

De nombreux facteurs de risque peuvent être associés à la survenue d'une aGvHD, notamment l'âge, la différence de sexe donneur/receveur, une injection supplémentaire de lymphocytes du donneur, une incompatibilité du système HLA donneur/receveur ou encore le régime de conditionnement (162,163).

Dans ce dernier exemple, des lésions tissulaires peuvent induire une importante production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL1 β ou IL6) qui auront pour effet d'accentuer l'immunogénicité des cellules de l'hôte via le système HLA et ainsi d'accroître l'alloréactivité des cellules du donneur.

La cGvHD, représente l'une des principales causes de morbi-mortalité post allogreffe et peut par définition durer plusieurs mois/années (164). Les principaux organes touchés et leurs manifestations associées sont décrits dans le **tableau 10** ci-après.

Tableau 10. Manifestations cliniques de la GvHD chronique - Adapté d'après (165)

Organe	Diagnostic	Distinctives	Autres	Communes aGvHD
Peau	Poikilodermie, lichen plan/scléreux, sclérose profonde, morphee	Dépigmentation (vitiligo), lésions papulosquameuses	Hypo/hyperpigmentation, kératose pileaire, ichtyose, défaut de transpiration	Erythème, rash maculopapuleux, prurit
Ongles		Dystrophie, onycholyse, perte d'ongle, pterygium unguis		
Cuir chevelu et pilosité		Alopécie	Cheveux irréguliers/fins/ternes, grisonnage prématuré	
Bouche	Lichen plan	Xérostomie, mucoécèle, atrophie muqueuse, ulcérations		Gingivite, mucite, érythème, douleur
Yeux		Xérophtalmie, kératoconjonctivite sèche, kératopathie ponctuée	Hyperpigmentation périorbitaire, photophobie, blépharite	
Tractus génital	Lichen plan/scléreux Femme : sténose vaginale, fusion labiale/clitoridienne Homme : sténose méatale/urétrale, phimosis	Érosions, fissures, ulcères		
Tractus gastro-intestinal	Stricture/sténose du tiers supérieur ou moyen de l'œsophage		Insuffisance pancréatique exocrine	Anorexie, nausée, vomissements, diarrhée, perte de poids, troubles de croissance
Foie				Élévation de la bilirubine totale/PAL/ALAT > 2X valeurs normales
Poumons	Bronchiolite oblitérante	Air piégé et bronchiectasies	Restriction pulmonaire	
Muscle, fascia, articulations	Fasciite, raideur articulaire contractures	Myosite, polymyosite	Œdèmes, crampes, arthralgies/artrites	
Hémato			Thrombopénie, éosinophilie, lymphopénie, hypogammaglobulinémie, auto-Ac	
Autres			Épanchements péricarde/plèvre/ascite, syndrome néphrotique, myasthénie, cardiopathie, troubles de conduction	

Les facteurs de risque conduisant à l'apparition d'une cGvHD, sont globalement similaires à ceux décrits pour la forme aiguë, néanmoins la source des CSH ou l'antécédent d'une aGvHD sont des facteurs spécifiques à la forme chronique (166).

Bien qu'il n'existe pas de traitement standard commun aux différents centres de greffe, il est possible de prévenir la GvHD via l'administration de divers médicaments immunosuppresseurs permettant de réduire fortement l'activité des lymphocytes T du donneur. Les médicaments couramment utilisés incluent les corticoïdes, les anti-calcineurines (ciclosporine, tacrolimus) et les anti-métabolites (Mycophénolate Mofétil) décrits précédemment ; ils comprennent également les sérums anti-lymphocytaires ou « antithymocyte globuline » (ATG) qui induisent l'opsonisation des lymphocytes circulants (165). Ces traitements sont immédiatement stoppés en cas de signe de rechute de la maladie sous-jacente, observable au myélogramme, à l'immunophénotypage ou en biologie moléculaire (étude des transcrits d'ADN spécifiques de l'hémopathie).

Cependant, ces traitements posent deux problèmes majeurs, i) ils induisent une baisse de l'effet GvL, régi par les lymphocytes T présents dans le greffon et précédemment décrits comme bénéfique pour le contrôle anti-tumoral et ii) ils sont associés à un risque infectieux accru en conduisant à un maintien de l'immunodépression post greffe en ralentissant la reconstitution immunitaire.

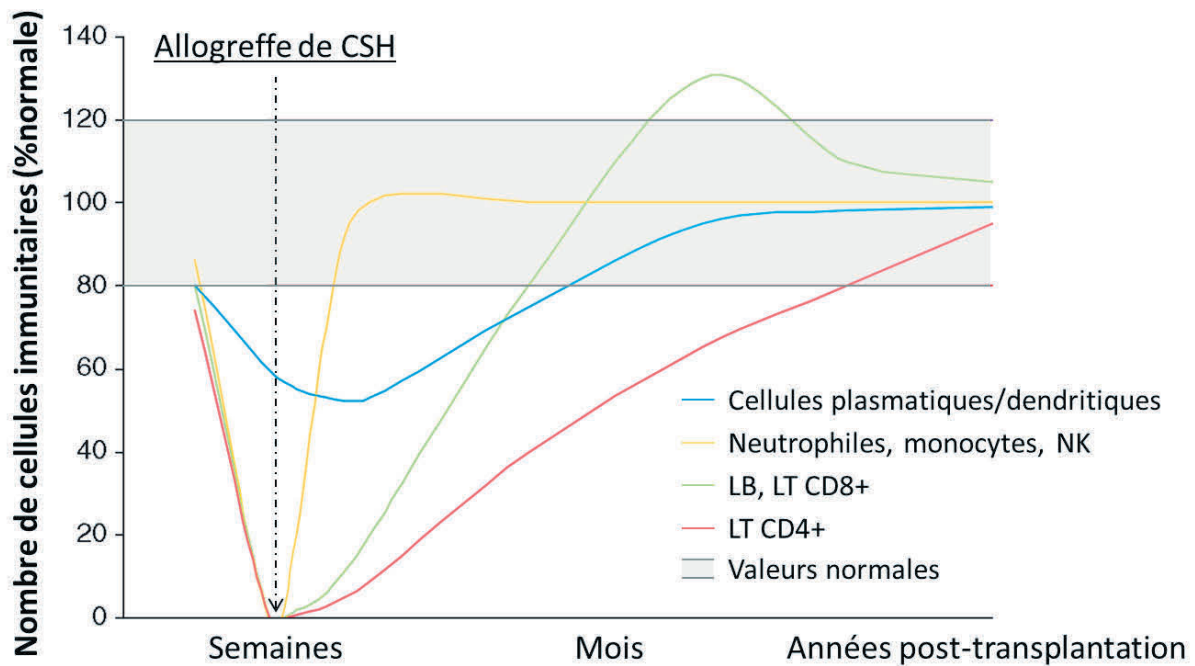
2.3.2.3. *La reconstitution immunitaire*

Les différentes informations données dans cette partie ont été synthétisées d'après (157,167–170).

La reconstitution immunitaire post-greffe suivant la phase d'aplasie est graduelle, individuelle et correspond à un processus complexe dépendant des caractéristiques hématologiques et des complications post-greffe.

L'immunité innée est la première à se remettre en place ; après quelques semaines post transplantation les cellules de l'immunité innée dérivées de la moelle vont commencer à se normaliser (**Figure 22**).

Figure 22. Représentation du nombre approximatif des cellules immunitaires péri et post-greffe de CSH myéloablatives. – Adapté d’après (168)



CSH, Cellule souche hématopoïétique ; LB, Lymphocyte B ; LT, Lymphocyte T ; NK, Natural killer

Un nombre normal de neutrophiles sera retrouvé au cours du premier mois post greffe, le délai pouvant varier selon la source des CSH et du schéma de conditionnement ou être altéré en présence de GvHD. Néanmoins, leur fonction ne se normalise que progressivement au bout d’environ 2 mois et peut une nouvelle fois être retardée dans le cas d’un traitement par corticoïdes pour la GvHD. Les monocytes/macrophages se comportent de manière similaire. Les cellules NK, qui constituent la majorité des cellules lymphoïdes, atteignent des niveaux normaux au cours du premier mois suivant la transplantation. Le délai de reconstitution des NK peut varier selon la source de CSH et ne semble pas être impacté par la présence d’une GvHD. Enfin, les cellules dendritiques ont pour particularité d’avoir des délais variables de rétablissement selon leur localisation. Pour les cellules de la peau (cellules de Langerhans) 3 à 6 mois seront nécessaires ; pour les cellules dendritiques myéloïdes (DC1) circulantes dans le sang environ 3 mois, tandis que pour les cellules dendritiques plasmacytoïdes (DC2) et folliculaires, une année sera nécessaire afin d’atteindre des valeurs normales. A noter que le niveau des molécules du complément est normal et non altéré par la transplantation, car elles sont produites par les hépatocytes et non par les cellules dérivées de la moelle (**Tableau 11**).

Tableau 11. Reconstitution de l'immunité innée post allogreffe de CSH – Adapté d'après (167)

Type cellulaire	Durée de reconstitution quantitative	Origine
Epithélium	Dans les semaines qui suivent la greffe Retard si présence de GvHD	Majoritairement dérivées du receveur ; quelques cellules épithéliales dérivées des CSH du donneur ou issues de précurseurs épithéliaux circulants
Complément	Non déficient	Hépatocytes du receveurs (en majorité), quelques monocytes dérivés du donneur (minorité)
Neutrophiles	Dans les semaines qui suivent la greffe Dépend de la source de CSH Sang périphérique: 2sem Moelle osseuse: 3sem Sang cordon: 4sem	CSH du donneur
Monocytes macrophages	Entre une semaine et un mois	Dans les tissus, les cellules du receveur seront progressivement remplacées par des cellules du donneur (au fil des mois). Dans le sang, issues des CSH du donneur depuis la phase précoce post-transplantation
NK	Dans un délai d'un mois	CSH du donneur
Cellules dendritiques	Variable selon type/localisation Peau: 3 à 6 mois Myéloïdes: 3 mois Plasmacytoïdes: un an Folliculaire: un an	CSH du donneur

CSH, Cellules souches hématopoïétiques ; GvHD, Graft vs. Host disease ; NK, Natural Killer

La reconstitution des cellules de l'immunité adaptative intervient chronologiquement après celle des cellules de l'immunité innée (**Figure 22** et **Tableau 12**).

- Lymphocytes T auxiliaire (CD4⁺) :

La fourchette de valeurs normales pour les CD4⁺ est de 500 à 1400 x10⁶/L. Chez l'adulte, le nombre de CD4⁺ circulants est très faible durant les 3 premiers mois suivant la greffe (< 200 x10⁶/L) ; puis augmente lentement pour atteindre environ 300 x10⁶/L à 1 an et environ 450 x10⁶/L à 5 ans et ne deviendra normal que 20 ans après la greffe. Le compte de CD4⁺ au cours de la période précoce post-transplantation peut être influencé par la source de CSH, la quantité de cellules initialement présentes dans le greffon, l'intensité du conditionnement ou la présence d'une GvHD aigüe qui aura pour effet d'inhiber la génération et l'expansion des lymphocytes T CD4⁺.

La majorité du réservoir de CD4⁺ sera composée de cellules mémoires/effectrices et la régénération de la population de CD4⁺ sera en grande partie réalisée à partir des lymphocytes du donneur plutôt qu'à partir des CSH. La récupération des sous-types naïfs chez l'adulte est plus lente que chez l'enfant due à une dégradation du thymus naturelle ou induite par la chimio/radiothérapie et par la GvHD et/ou à son traitement associé. La diversification du répertoire des lymphocytes T CD4⁺ interviendra uniquement après l'augmentation du nombre de CD4⁺ naïfs.

- Lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺) :

La fourchette de valeurs normales pour les CD8⁺ est de 200 à 800 x10⁶/L. Chez l'adulte, le nombre de CD8⁺ dans le sang est inférieur à la normale pendant les 3 premiers mois (< 200 x10⁶/L), puis augmente rapidement pour atteindre un niveau normal ou transitoirement supranormal un an après la greffe. La majorité du réservoir de CD8⁺ est constituée de cellules mémoires ou effectrices, cette augmentation accélérée pourrait être due à l'expansion des CD8⁺ spécifiques amorcée par les antigènes de l'hôte plutôt que des lymphocytes naïfs. Néanmoins la génération de CD8⁺ naïfs apparaît comme plus rapide comparée aux CD4⁺, une fois encore cette nouvelle génération de lymphocytes naïfs influence la diversification du répertoire cellulaire. Contrairement à ce qui est observé pour les CD4⁺, l'âge des patients ne semble pas influencer le délai de récupération quantitative des CD8⁺.

- Lymphocytes B :

Les lymphocytes B sont en quantité très faible ou indétectable au cours des deux premiers mois post-transplantation et 1 à 2 ans seront nécessaires pour obtenir une reconstitution complète. La présence d'une GvHD et son traitement peuvent induire un allongement de ce délai. Comme pour les lymphocytes T, la source du greffon ainsi que sa composition peuvent impacter sur la reconstitution du réservoir de lymphocytes B au cours de la période précoce post transplantation. De manière similaire à l'ontogénèse lorsque les lymphocytes B commencent à apparaître, ils sont principalement sous un phénotype naïf et très peu sous forme de lymphocytes B mémoire, ces derniers restant faibles pendant au moins un an post allogreffe.

Malgré un nombre très faible de lymphocytes B au cours de la période précoce post transplantation et d'un nombre restreint de lymphocytes B mémoire, les IgG et IgA (totales ou spécifiques) restent détectables chez le receveur pendant des mois/années, principalement due à la survie des plasmocytes « longue durée de vie » du receveur vis-à-vis de la radio/chimiothérapie. Plus tardivement post greffe, les immunoglobulines du receveur seront remplacées par celles provenant de cellules issues du donneur. La diversification des lymphocytes B spécifiques n'intervient néanmoins pas avant la première année post greffe, avec une augmentation plus rapide du taux d'anticorps pour les antigènes les plus courants. En l'absence d'une nouvelle immunisation post-transplantation, notamment via la vaccination, on observera une disparition des anticorps spécifiques pour les antigènes les plus rares (exemple: Tétanos).

Tableau 12. Reconstitution de l'immunité adaptative post allogreffe de CSH – Adapté d'après (167)

Type cellulaire	Durée de reconstitution quantitative	Sous-type	Origine
LT CD4⁺	Plusieurs années	Mémoire effecteur: 1-5 ans Naïf: >5 ans	Dans les premiers mois post allogreffe: Issues des LT présent dans le greffon du donneur
LT CD8⁺	Plusieurs mois	Mémoire effecteur: 2-6 mois Naïf: Plusieurs années	Puis en partie à partir des CSH du donneur
LB	Plusieurs mois; Retard en présence de GvHD	Mémoire effecteur: Plusieurs années Naïve: Plusieurs mois	Dans les premiers mois post allogreffe: Majoritairement issues des LB présent dans le greffon du donneur Puis à partir des CSH du donneur
Plasmocytes	Quelques mois à années	Ordre d'apparition : IgM puis IgG puis IgA	Les plasmocytes du receveur (radio/chimio résistants) sont remplacés au fil des mois et des années par les plasmocytes du donneur

CSH, Cellules souches hématopoïétiques ; GvHD, Graft vs. Host disease ; LB-LT, Lymphocytes B et T ; Ig, Immunoglobulines

En résumé, post allogreffe de CSH, le réservoir cellulaire de l'immunité innée et adaptative est altéré. La durée de reconstitution est spécifique du type cellulaire et peut être impactée par de nombreux facteurs de risques associées à l'allogreffe de CSH (**Tableau 13**).

Tableau 13. Facteurs de risques associées à l'allogreffe de CSH - Adapté d'après (171)

Pre-transplantation	Transplantation	Post-transplantation
Démographiques	Statut de la maladie	Délai de prise de greffe
Âge, sexe	Précoce, intermédiaire,	Immunothérapies passives
Comorbidités	avancée,	Infusion de lymphocytes du donneur,
Index de comorbidité	Transplantation antérieure	Injection d'immunoglobulines
Diabète	Incohérence des sexes	Médicament(s) post-CSH
Tabagisme	Conditionnement	aGvHD
Maladie pulmonaire	Myéloablatif,	Oui/non, Grade,
Affection cardiaque	Intensité réduite,	Localisation(s), traitement
Affection neurologique	Irradiation corporelle	cGvHD
Maladie auto-inflammatoire	Cellularité du greffon	Oui/non, Grade,
Maladies sous-jacentes	- Cellules nucléées totales	Localisations (s), traitement
LAM, LAL, Néoplasmes,	MO, CSP, sang placentaire	Photophérèse extracorporelle
Aplasies médullaires	- Cellules CD34+	Paramètres immunologiques
acquises, Myélome multiple	- Cellules CD3+	Immunoglobulines M, G, A
Anticorps anti-HLA	Appariement ABO	Numération lymphocytaires :
Positif, négatif	Appareillé, majeur,	T : CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD2 ⁺ , CD4 ⁺ /CD8 ⁺
Spécifique du donneur	mineure, bidirectionnel	B : CD19 ⁺ , CD20 ⁺ , CD21 ⁺
	Correspondance HLA	NK
	Géno, Haplo, Phéno	Risque infectieux
	Source de CSH	Bactérien, fongique, virale, parasitaire
	Moelle osseuse, CSP, sang placentaire	
	Prophylaxie GvHD	
	Statut sérologique	

CSP, cellules souches périphériques ; GvHD, Graft versus host disease ; MO, moelle osseuse ; NK, Natural Killer

La **compréhension** et la **caractérisation** de cette longue période de **reconstitution immunitaire** apparait comme **primordiale** notamment afin d'améliorer la gestion du risque infectieux.

2.4. Le risque infectieux dans l'allogreffe de CSH

Le risque infectieux est directement lié aux altérations immunitaires et à l'immunodéficience prolongée des individus qui peut être influencée par plusieurs facteurs de risques présents aux différentes phases post transplantation. Les principaux facteurs, décrits précédemment dans le **tableau 13**, sont la maladie sous-jacente, le régime de conditionnement, la source de CSH, la compatibilité donneur/receveur, la présence d'une GvHD, les traitements immunosuppresseurs et la présence d'infection en amont de la greffe. Certaines infections peuvent intervenir tout au long de la période post allogreffe, c'est notamment le cas des virus respiratoires, principalement *Influenzae*, *Parainfluenzae* ou le virus respiratoire syncytial (VRS) (172), qui en cas d'infections respiratoires basses peuvent causer des troubles respiratoires importants pouvant conduire à la mort. Hormis cet exemple, on décrit classiquement trois phases à risque infectieux post allogreffe présentant chacune d'entre elles des germes et des caractéristiques d'immunodépression spécifiques.

2.4.1. Le risque infectieux au cours des différentes phases de reconstitution post-greffe

Les différentes informations données dans cette partie ont été synthétisées d'après (169,173–177) (Tableau 14).

Tableau 14. Les infections post allogreffe de CSH – Adapté d'après (178,179)

Type d'infection	Phase avant la prise de greffe	Phase précoce post prise de greffe	Phase tardive post prise de greffe
Bactérienne	Gram positif	Gram positif	Bactéries encapsulées
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>SCN</i>	<i>SCN</i>	<i>Haemophilus influenza</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Streptocoques oraux</i>	<i>Streptocoques oraux</i>	
	Gram négatif	Gram négatif	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>	
	<i>Pseudomonas aeruginos</i>	<i>Pseudomonas aeruginos</i>	
	<i>Clostridium difficile</i>		
Fongique	<i>Candida spp.</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
	<i>Aspergillus</i>		
Virale	<i>HSV</i>	<i>CMV</i>	<i>CMV</i>
	Virus respiratoire	<i>EBV</i>	<i>EBV</i>
		<i>HHV-6</i>	<i>VZV</i>
		Virus respiratoire	Virus respiratoire

- La phase avant prise de greffe : de 0 à 30 jours après transplantation

Cette phase est associée une immunodéficience prolongée et présente trois facteurs de risques majeurs d'infections, une neutropénie sévère, des dommages aux niveaux des muqueuses chimio-induites lors du conditionnement et la présence et l'utilisation fréquente d'un accès veineux central par cathéter. Le risque infectieux pour le patient sera limité par un maintien en milieu hospitalier stérile et par l'utilisation d'antibiotiques à large spectre en cas d'épisode fébrile.

Au cours de cette phase, la présence de mucite et de neutropénie favorise la réactivation de formes latentes des virus Herpès simplex virus (HSV-1 et -2) (180), avec une prévalence élevée pouvant aller jusqu'à 80 % pour les patients séropositifs.

Malgré le caractère classiquement bénin de cette infection, dans un contexte d'immunodépression sévère l'infection à HSV peut conduire à des symptômes plus graves comme la pneumonie, la méningite, l'hépatite ou l'encéphalite.

Les infections bactériennes en raison de la présence de cathéter et de la dégradation des muqueuses interviennent chez 20 % à 30 % des patients de manière globale, essentiellement sous la forme de bactériémie (181) et peuvent conduire à un décès dans 10 % des cas (65) (**Tableau 15**). Lors de cette phase avant prise de greffe, les germes classiquement retrouvés sont pour les Gram positifs les Staphylococques à coagulases négatives et les Streptocoques oraux ; pour les Gram négatifs *Escherichia coli* ou *Clostridium difficile*, ce dernier étant responsable de colite chez 12 % des patients allogreffés (182). Le risque d'infection et de bactériémie peut être réduit par l'utilisation d'une prophylaxie antibactérienne.

Tableau 15. Les infections bactériennes post allogreffe de CSH – D'après (178)

Pathogène bactériens	Facteurs de risques	Manifestations cliniques
<i>Streptococcus viridans</i>	Neutropénie, mucosités buccales	Bactériémie
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	GVHD, manque d'immunisation	Pneumonie, méningite, sepsis
<i>Enterococcus species</i>	Utilisation de céphalosporines, infection à <i>C. difficile</i>	Bactériémie
<i>Staphylococcus aureus</i>	CVC, colonisation	Bactériémie, Pneumonie, infection des tissus mous
SCN	CVC	Bactériémie
<i>Escherichia coli</i>	Neutropénie, mucite	Bactériémie, Pneumonie
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Neutropénie, mucite	Bactériémie, Pneumonie
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Neutropénie, mucite	Bactériémie, Pneumonie
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	CVC, exposition préalable à un antibiotique à large spectre	Bactériémie
Espèce <i>Acinetobacter</i>	CVC, exposition préalable à un antibiotique à large spectre	Bactériémie, Pneumonie
Espèce <i>Achromobacter</i>	CVC, exposition préalable à un antibiotique à large spectre	Bactériémie
Bactéries anaérobies (<i>Clostridium septicum</i>)	Neutropénie, mucite	Bactériémie, entérocolite nécrosante, typhlitis
<i>Clostridium difficile</i>	Exposition aux antibiotiques, GvHD, infection antérieure à <i>C. difficile</i>	Colite, bactériémie secondaire

CVC, cathéter veineux central ; GvHD, Graftvs.Host disease ; SCN, *Staphylococcus à coagulase-négative*

Enfin, la neutropénie et l'inflammation des muqueuses du tractus gastro-intestinal induite par le conditionnement conduisent également à des infections fongiques invasives (IFI), cause majeure de morbidité et de mortalité chez les receveurs d'allogreffe. La prévalence globale des IFI peut varier considérablement, néanmoins une récente étude décrit une incidence des IFI de 3 à 24 % (183). Durant cette période, les IFI sont principalement liées aux espèces *Candida*, on parle alors de Candidose invasive. La candidose peut être cutanéomuqueuse ou systémique et conduire à une atteinte des organes vitaux comme le cœur et le cerveau. La limitation du risque de candidose invasive est essentiellement basée sur une prophylaxie au fluconazole depuis les années 1990 (178).

- La phase précoce post prise de greffe : de 30 jours à 100 jours après transplantation

Au cours de cette phase on observe la fin de la neutropénie sévère et le renouvellement des barrières défensives initialement altérées par le conditionnement. Un dysfonctionnement est néanmoins encore présent notamment au niveau des lymphocytes, particulièrement en cas de présence de GvHD et de son traitement associé qui représente l'un des principaux facteurs de risque infectieux en plus des infections potentielles liées à la présence d'un cathéter.

Ce dernier reste en effet la source principale d'infections bactériennes malgré l'utilisation de traitements antibiotiques, qui ont inévitablement induit un risque de sélection accrue de souches multi-résistantes, telles que *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* productrice de carbapénémase. Il est à noter que durant cette période, en raison de l'altération de l'immunité à médiation cellulaire, les patients seront également plus sensibles à *Listeria* et *Legionella* en cas d'exposition (184,185).

Cette même altération contribue à un risque accru d'infections virales sous la forme de primo-infection ou de réactivation, notamment aux adénovirus, HHV-6 et au virus d'Epstein-Barr (EBV). Les infections à Adénovirus, sous la forme de réactivation du virus latent ou de primo-infection transmise via le greffon, sont courantes chez les patients allogreffés en particulier les enfants.

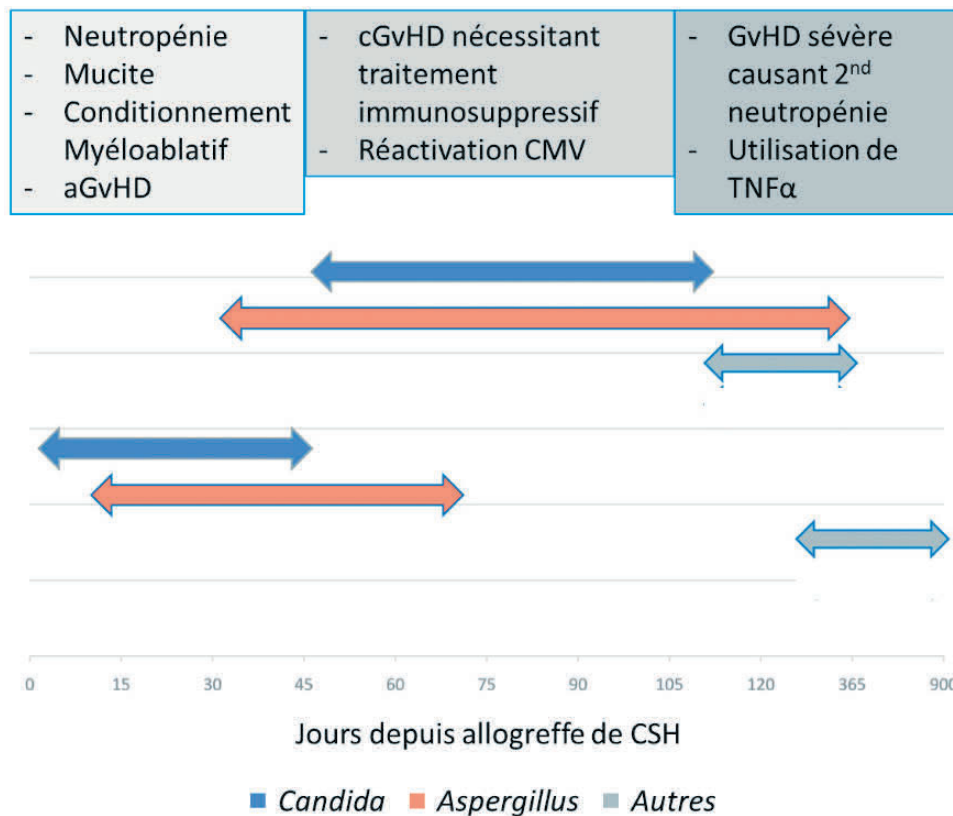
La réactivation virale à HHV-6 peut apparaître chez 30 à 70 % des receveurs d'allogreffe de CSH (186). Elle est responsable, dans la plupart, de manifestations cliniques bénignes (virémie asymptomatique, fièvre) mais peut conduire dans certains cas à des maladies graves (hépatite, pneumonie, encéphalite), induire des réactivations virales à d'autres virus comme cytomégalovirus (CMV) et EBV et favoriser l'apparition de GvHD lors de la prise de greffe (187). La réactivation virale HHV-6 peut également conduire à des infections invasives avec une importante moribundité, entraînant des insuffisances respiratoires ou des maladies neurologiques et un fort taux de mortalité allant de 2 à 9% pour les adultes et de 15 à 23% pour les enfants (188).

L'EBV est un type courant de virus de l'herpès transmis par la salive affectant plus de 90 % des individus (189), avant l'âge adulte, et dont la primo-infection symptomatique est responsable de la mononucléose infectieuse. La réactivation de la forme latente de l'EBV peut induire des symptômes comme une forte fatigue, une fièvre élevée, des douleurs musculaires, des encéphalites/myélites, une pneumonie ou une hépatite. Post allogreffe de CSH, la réactivation virale endogène ou la contamination par le greffon peut également entraîner des maladies liées à l'EBV, notamment la maladie lymphoproliférative post-transplantation (PTLD, de l'anglais *post-transplantation lymphoproliferative disorder*), maladie dont l'incidence peut aller jusqu'à 11 % des receveurs d'allogreffe et dont l'évolution rapide peut conduire à un dysfonctionnement de plusieurs organes et entraîner la mort (environ 33 %) en l'absence de traitement (190).

Enfin, en plus des espèces *Candida*, les IFI à *Aspergillus* sont fréquentes au cours de la phase précoce post prise de greffe. Une large étude multicentrique attribuait une incidence de ce germe de 33 % parmi les IFI (191) (**Figure 23**). L'introduction d'*Aspergillus*, agent pathogène environnemental omniprésent, dans l'organisme du patient se réalise par inhalation de spores aéroportées. Une fois introduit dans l'hôte, le système immunitaire des patients immunodéprimés post allogreffe n'est pas suffisamment fonctionnel pour limiter efficacement la prolifération de l'agent pathogène, en raison des altérations cellulaires et d'une capacité de phagocytose trop faible des macrophages. L'apparition de l'aspergillose invasive peut se produire dans la période de neutropénie lors des 40 premiers jours post transplantation, avec la survenue d'un potentiel second pic lors de la période tardive post greffe (+30 jours), notamment dans le cadre d'une GvHD.

Elle est responsable de diverses manifestations cliniques comme de la fièvre, des douleurs thoraciques, de la toux et des insuffisances respiratoires et est dans la plupart des cas causée par *Aspergillus fumigatus* (192).

Figure 23. Chronologie et facteurs de risque des infections fongiques invasives dans l'allogreffe de CSH – Adapté d'après (193)



a-cGvHD, acute-chronic graft vs. host disease ; *CMV*, Cytomégalo virus ; *TNF α* , Tumor Necrosis Factor α

- **La phase tardive post prise de greffe** : au-delà de 100 jours après transplantation.

Cette phase est associée à une reconstitution toujours en cours, mais avancée du réservoir de cellules immunitaires. Le facteur de risque majeur au cours de cette période est la présence d'une GvHD, essentiellement s'il s'agit d'une forme chronique. En effet, les épisodes infectieux sont plus rares au-delà de 100 jours post transplantation, néanmoins l'utilisation des traitements immunosuppresseurs associés à la GvHD induisent un retard de reconstitution immunitaire et une prédisposition augmentée aux infections en raison d'un prolongement de l'état immunosuppresseur.

Au niveau bactérien, les principales infections sont causées par des bactéries encapsulées telles que *Haemophilus influenzae*, *Neisseriae meningitidis* et majoritairement *Streptococcus pneumoniae* favorisées par des fonctions réduites de la rate (hyposplénisme). Pour ce dernier, les stratégies préventives comprennent la vaccination avec le vaccin anti-pneumococcique conjugué 3 à 6 mois après la prise de greffe pour tous les patients.

Concernant les infections virales, cette phase tardive post greffe sera essentiellement associée au CMV et au virus varicelle-zona (VZV) sous la forme de réactivation virale. L'infection à CMV concerne environ 83 % de la population mondiale (194), elle intervient majoritairement chez l'enfant sous la forme d'une primo-infection, dans la plupart des cas asymptomatique, avant de rester dans l'organisme sous une forme latente. Dans l'allogreffe de CSH les infections à CMV étaient initialement rencontrées au cours de la phase précoce post-greffe, avant que l'amélioration de la prophylaxie et des traitements reportent ce risque infectieux à la phase tardive. Elles sont associées à plusieurs facteurs de risques tels que la déplétion en lymphocytes T, le type de conditionnement, la GvHD aigue et principalement le statut sérologique du donneur et du receveur. Elles peuvent induire de multiples inflammations (entérite, hépatite, rétinite, encéphalite, pneumonie), appelées alors maladie à CMV et conduire à un risque accru d'infections opportunistes secondaires. Ces infections tardives plus ou moins persistantes après l'arrêt de la prophylaxie peuvent également engager le pronostic vital du patient avec une incidence de 40 à 50 % de mortalité, pouvant aller jusqu'à plus de 80 % en cas de forme grave (195). La stratégie de prophylaxie du CMV est variable, associant une surveillance étroite pendant 3 à 6 mois post transplantation de la charge virale du CMV dans le sang par PCR et, selon les statuts sérologiques du receveur et du donneur, un traitement antiviral préventif (196).

Enfin, le virus varicelle zona (VZV ou herpèsvirus humain 3) sous la forme de primo-infection est responsable de la varicelle, maladie majoritairement infantile extrêmement contagieuse touchant 90 % des enfants de moins de 10 ans. Elle apparaît sous la forme d'une éruption généralisée de vésicules sur la peau et les muqueuses et entraîne également de la fièvre. Le virus reste par la suite sous une forme latente dans les cellules ganglionnaires sensorielles (197). La réactivation du virus latent peut s'exprimer sous la forme d'un zona (herpes zoster). Dans la population générale, une réactivation du virus VZV peut être observée pour environ 20 % des personnes ayant initialement présenté une varicelle et touche le plus souvent les adultes âgés de plus de 50 ans.

Elle se caractérise par une apparition localisée douloureuse de vésicules sur la peau généralement le long d'un nerf ou d'un ganglion nerveux. De manière similaire à HHV-6, le virus VZV dans l'allogreffe peut se réactiver, principalement au cours des deux premières années post transplantation, bien que des cas puissent être rapportés des années après la greffe. Dans ce contexte d'immunodépression la réactivation à VZV peut également induire des formes sévères de la maladie sous la forme d'infections disséminées pouvant provoquer encéphalite, hépatite ou pneumonie. La prophylaxie vaccinale pourrait être une option intéressante pour renforcer l'immunité contre le VZV, cependant le vaccin vivant atténué contre le VZV actuellement disponible en France est contre-indiqué pendant les 24 premiers mois après l'allogreffe.

Pour résumer, les infections, indépendamment de leur nature, peuvent donc intervenir tout au long de la période post transplantation, de la phase précoce à la phase tardive post greffe et dans certains cas jusqu'à plusieurs années après l'allogreffe de CSH. Elles sont associées à de nombreux facteurs de risques courants de l'allogreffe de CSH (**Figure 24**).

Figure 24. Chronologie des infections opportunistes classiquement rencontrées chez les receveurs d'allogreffe de CSH – Adapté d'après (178)

Les déficiences immunitaires et les facteurs de risque associés à la transplantation sont indiqués en bleu, les infections bactériennes en orange, les infections virales en vert et les infections fongiques en violet.

	Pre-greffe (<30 jours)	Précoce post-greffe (30-100 jours)	Tardif post-greffe (>100 jours)
Déficiences immunitaires de l'hôte et facteurs de risque d'infection associés à la transplantation	Neutropénie Mucite Cathéter central GvHD aigue	immunité cellulaire altérée GvHD aigue	immunité humorale altérée
Infection à forte incidence	SCN Streptococcus viridans Gram négatif HSV Candida Aspergillus précoce	CMV/EBV VZV Adenovirus Aspergillus tardif	
Infection à faible incidence	Virus respiratoire et entérique	Maladies lymphoprolifératives associées à EBV	Bactéries encapsulées

CMV, CytomégaloVirus ; EBV, Virus d'Epstein-Barr ; GvHD, Graft vs. Host disease ; SCN, Staphylococcus à coagulase négative ; VZV, Virus Varicelle-Zona

La présence de ces infections est majoritairement due à l'état d'immunodépression profond des receveurs, qu'il soit induit par le protocole de la greffe ou lié à des traitements spécifiques de la GvHD. En complément des protocoles et des prophylaxies anti-infectieuses préventives et curatives déjà mis en place, il apparaît comme essentiel d'être en mesure d'évaluer les capacités fonctionnelles du système immunitaire des patients à l'aide d'un immunomonitoring précis.

3. L'immunomonitoring

L'immunomonitoring est une pratique clinique permettant de surveiller et caractériser la réponse immunitaire d'individus au travers l'examen de ces composants sanguins et/ou cellulaires. Dans le contexte de l'immunodépression, on l'utilise pour le diagnostic de déficit primitifs ou secondaire et le suivi thérapeutique. L'immunité humorale et/ou cellulaire peut être évaluée en laboratoire au travers des tests de routine mesurant des paramètres de lecture dit « statiques », c'est-à-dire à un moment T et sans activation au préalable. Les examens de première intention peuvent être le dosage d'anticorps, la numération cellulaire ou l'immunophénotypage.

3.1. Paramètres de lecture statiques

3.1.1. Dosage d'anticorps

La détection et la mesure des titres d'anticorps, communément appelée test sérologique, est une procédure de laboratoire courante. Effectuée à partir d'un échantillon de sérum sanguin, elle permet de mesurer de manière non-spécifique les différentes classes d'immunoglobulines (Ig), majoritairement les IgG, IgA et IgM ; les mesures d'IgE étant réalisées dans des contextes spécifiques tels que l'allergie ou en cas de suspicion de syndrome d'hyper-IgE (198). Les tests sérologiques sont utilisés pour l'exploration de l'immunité humorale dans différents contextes par exemple la détection des auto-anticorps dans les maladies auto-immunes, le diagnostic et le suivi de maladies infectieuses ou inflammatoires ou encore la détection des déficits immunitaires. Les principales méthodes utilisées sont l'immunoprécipitation, mesurée par néphélométrie ou turbidimétrie et l'électrophorèse des protéines, mesurée par densitométrie. La néphélométrie et la turbidimétrie sont les méthodes les plus utilisées en raison de leur rapidité, de leur facilité d'utilisation et de leur précision. La turbidimétrie mesure la diminution de l'intensité de la lumière et la néphélométrie mesure la diffusion de la lumière lors de son passage à travers l'échantillon, elles sont toutes deux proportionnelles à la concentration d'immunoglobulines. L'électrophorèse est une méthode basée sur la séparation des différentes classes d'immunoglobulines par migration sous l'influence d'un courant électrique. Certaines limites sont associées à ces méthodes. En effet, les valeurs normales peuvent varier d'un laboratoire à l'autre en raison des différences de technique de test.

L'âge doit également être pris en compte pour la comparaison des données obtenues par sous-classes d'Ig avec les valeurs normales de laboratoire, des changements étant observés dans le répertoire d'anticorps en circulation au cours de la vie (199).

La mesure des titres d'anticorps peut également être spécifique d'un antigène, notamment dans le cadre de la mesure de la réponse vaccinale. De nombreuses méthodes existent comme les techniques d'inhibition compétitive ou d'agglutination, mais la méthode classiquement employée est l'ELISA (de l'anglais Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (200).

Cette mesure est couramment employée pour évaluer la réponse vaccinale. Par exemple, un titre d'anticorps totaux supérieur au seuil de 15 UI/mL sera considéré comme protecteur contre l'hépatite A (201). Néanmoins, certains traitements comme l'injection d'immunoglobulines en intraveineuse (IgIV) peuvent compromettre l'interprétation des données et conduire à une modification artificielle des sérologies de dépistage et de diagnostic chez les patients traités (202,203). A titre d'exemple, une étude rapporte que l'administration d'IgIV induit une augmentation de 3.7 fois le taux initial d'IgG non spécifique. Cette observation a également été décrite pour les taux d'anticorps totaux spécifique de l'hépatite A où la valeur initiale de 8 UI/mL avant injection d'IgIV, atteignait une valeur de 60 UI/mL après injection, rendant le test sérologique positif (204). Les IgIV présentent également un important délai de persistance, dont la demi-vie dépasse les 3 semaines, ce qui peut interférer avec de nombreux tests analytiques comme les tests sérologiques. Il est ainsi recommandé de respecter un délai d'au moins 4 mois entre l'administration d'IgIV et la prescription de tests sérologiques pour que leurs résultats soit interprétables (205), ce délai peut donc impacter la gestion de la vaccination dans les populations à risques.

De plus, la notion de corrélat de protection des titres d'anticorps est au centre des attentions dans le cadre de la réponse vaccinale, de surcroit actuellement dans le contexte du SARS-CoV-2 (206–208). Les titres protecteurs sont définis grâce à la corrélation qui existe entre titre d'anticorps et capacité de neutralisation du SARS-CoV-2, propriété indispensable des anticorps pour empêcher l'entrée du virus dans la cellule. Or, une récente étude a mis en évidence que pour un même sérum la capacité de neutralisation peut être diminuée de 24 fois entre la souche historique du SARS-CoV-2 et le variant Omicron (209). Ces observations confirment que la seule détection quantitative d'IgG anti-SARS-CoV-2 doit être interprétée avec prudence pour définir des corrélats de protection.

Enfin, la quantité d'anticorps ainsi que leur réponse fonctionnelle neutralisante ne sont pas systématiquement associées à une mémoire immunitaire à médiation cellulaire. Une étude de fin 2020, dans le contexte du SARS-CoV-2 met notamment en évidence une discordance entre les réponses des anticorps neutralisants et des lymphocytes T, dans une cohorte de personnels soignants, certains individus présentant des titres d'anticorps neutralisants au-dessus du seuil de protection (concentration inhibitrice 50, IC50 > 200) et de faibles réponses des lymphocytes T (< 80 cellules formant des Spot (SFC)/10⁶) ou inversement (210). Une étude réalisée dans le cadre de la vaccination contre le VZV décrit également que l'efficacité protectrice post vaccinale est d'avantage associée à la réponse cellulaire par comparaison à la réponse humorale (211).

3.1.2. Numération cellulaire

La numération de formule sanguine (NFS), plus communément appelée hémogramme, est également un test de première intention. La NFS est un examen biologique réalisé à partir d'un prélèvement sanguin permettant d'obtenir un aperçu de l'état du système immunitaire notamment à travers la comptabilisation des principaux éléments du sang (globules rouges/blancs et plaquettes). La NFS est une investigation courante et représente l'un des examens le plus prescrit en France. En effet, elle fait partie du bilan standard dans de nombreux contextes tels que la grossesse, le bilan préopératoire et pré-thérapeutique ou encore le suivi de l'évolution d'un traitement ou d'une pathologie.

Cette méthode permet la détection d'anomalies quantitatives d'un ou plusieurs types cellulaires pouvant être associée spécifiquement à certains troubles immunitaires. Les numérations peuvent être en défaut dans certaines pathologies comme la thrombopénie, la neutropénie ou la lymphopénie ; ou en excès dans d'autres cas comme la leucocytose ou la lymphocytose.

Bien que la NFS ne constitue pas un examen diagnostique à proprement parler, elle permet de donner de précieuses indications au médecin. A titre d'exemple, une hyperleucocytose à PNN supérieur à 10 giga/L oriente vers un diagnostic de syndrome inflammatoire biologique (212).

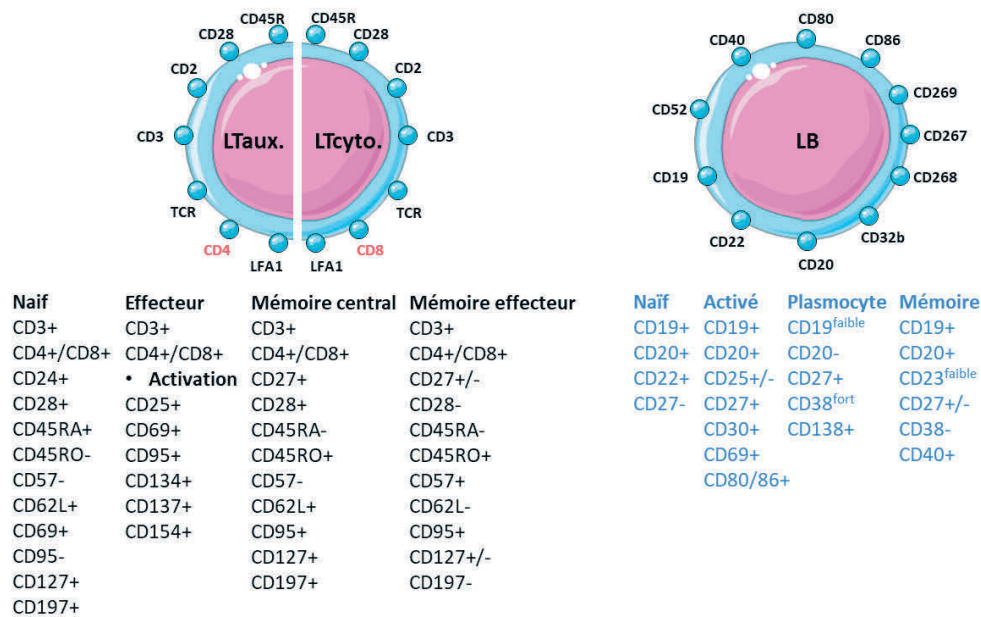
Lorsque les résultats d'une NFS ne sont pas normaux, un frottis sanguin peut également être réalisé afin d'analyser la morphologie des cellules du sang et de rechercher des cellules anormales. La présence de plus de 20% de blastes dans le sang périphérique conduit notamment au diagnostic des leucémies aiguës (213,214).

Néanmoins, **la NFS permet uniquement de révéler des altérations quantitatives au sein des grands compartiments cellulaires**. Or, certaines pathologies ou conditions peuvent induire à la fois une diminution et une augmentation au sein d'un sous-type cellulaire. L'immunosénescence conduit par exemple à une inversion du ratio CD4/CD8 *i.e.* un nombre diminué de lymphocytes T CD4⁺ et augmenté de CD8⁺ (215). Cette double variation peut ainsi ne pas être identifiée au travers de la simple formule leucocytaire d'une NFS. Néanmoins, ces limites peuvent être comblées par un immunophénotypage plus fin.

3.1.3. Immunophénotypage

L'immunophénotypage est, dans la plupart des cas, réalisé sur un échantillon de sang et/ou de moelle osseuse. Cette méthode fine et puissante d'analyse cellulaire est basée sur l'identification des sous-types cellulaires à l'aide des clusters de différenciation (CD) par cytométrie en flux, grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques couplés à des fluorochromes (216). Il existe à ce jour plus de 400 CD permettant de quantifier des types et/ou sous-types cellulaires, et d'identifier des stades de différenciation ou des aspects fonctionnels (adhésion, activation) (**Figure 25**), ces différents paramètres pouvant être analysés simultanément.

Figure 25. Clusters de différenciation associées aux lymphocytes T et B – Source personnelle



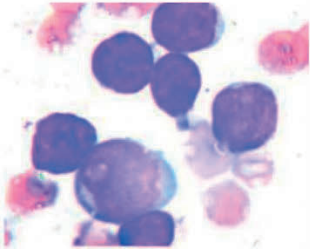
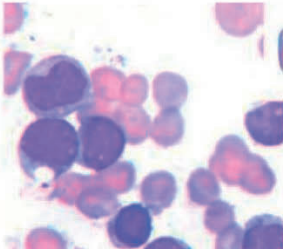
CD, Cluster de différenciation ; LB, Lymphocytes B ; LTaux/cyto, Lymphocytes T auxiliaire/cytotoxique

L'immunophénotypage est une méthode pouvant servir à trouver l'origine de l'immunodépression. Par exemple, le déclin du compte de lymphocytes T CD4⁺ en dessous du seuil de 200 cellules/mm³ est classiquement considéré comme un seuil critique, on l'associe à une déficience immunitaire et à une susceptibilité accrue aux infections. Ce seuil a notamment été utilisé par les *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) à partir des années 90 afin de définir le SIDA (217). Dans ce contexte, la mesure quantitative des lymphocytes T CD4⁺ reste l'un des tests les plus couramment utilisés et permet par exemple, d'initier et de contrôler l'efficacité d'un traitement antirétroviral (218). Ce seuil de 200 cellules/mm³ est également utilisé par analogie dans d'autres contextes cliniques d'immunodépression. Dans l'allogreffe de CSH il peut être utilisé pour initier ou non la vaccination, certains centres considérant ce critère biologique comme le reflet d'un rétablissement immunitaire complet (219) ; il est également utilisé pour l'administration de vaccins vivants atténués selon les recommandations en vigueur (220).

Autre exemple, l'immunophénotypage dans le cadre du sepsis permet l'analyse de l'expression monocyttaire de HLA-DR (mHLA-DR) qui est un marqueur clé de la fonction immunitaire monocyttaire et qui a été décrit comme pouvant refléter l'immunosuppression (221).

L'immunophénotypage est également utilisé en recherche fondamentale et en clinique pour aider au diagnostic de certaines pathologies. Cette méthode représente notamment un élément majeur du diagnostic des hémopathies malignes telles que les syndromes lymphoprolifératifs et les leucémies aiguës. Le diagnostic repose sur l'utilisation de panels d'anticorps constitué des marqueurs spécifiques de chaque lignée hématopoïétique et de marqueurs d'immaturité ou de maturations. (Figure 26).

Figure 26. Liste non exhaustive de marqueurs immunophénotypiques permettant d'identifier les leucémies aiguë lymphoblastiques et myéloblastiques – Adapté d'après (222,223)

Lymphoblastique	Marqueurs		Myéloblastique	Marqueurs
	B	T		MPO
	CD19	CD3		CD34
	CD22	CD7		CD13
	CD79A	CD5		CD15
	CD10	CD2		CD117
	CD20	CD4		CD33
	CD24	CD8		CD65

L'immunophénotypage présente néanmoins quelques limites. Cette méthode est moins courante que la NFS, l'équipement nécessaire à la cytométrie en flux étant coûteux et complexe. De plus, il nécessite une préparation importante avant et après chaque utilisation, (préchauffage, étalonnage des lasers et nettoyage). Son utilisation et sa maintenance requièrent donc des opérateurs formés et hautement qualifiés.

Enfin, en plus d'impliquer des protocoles techniques lourds pouvant induire un nombre important de variabilité, on observe un manque de standardisation au niveau du choix des réactifs, de la préparation, de la conservation des cellules à analyser ainsi que de l'interprétation des données collectées (216,224,225).

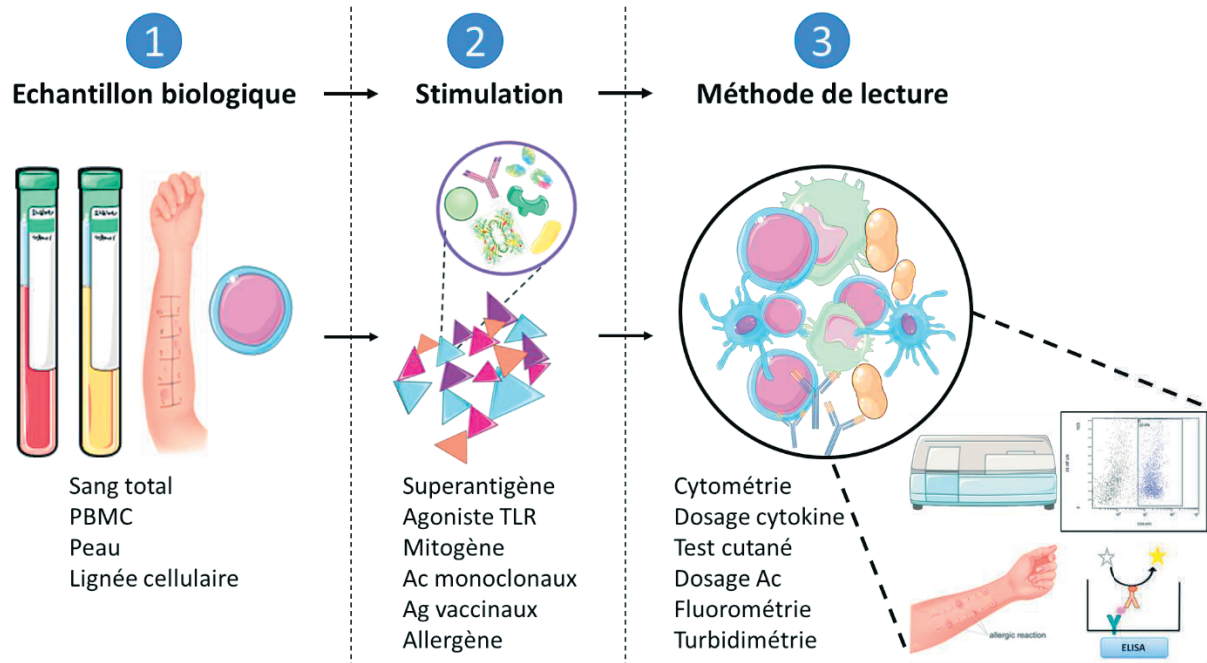
Ces marqueurs traditionnels **permettent essentiellement l'exploration des déficits quantitatifs ou phénotypiques**. Néanmoins, i) la numération cellulaire ne semble pas être représentative de la fonction (226), comme décrit précédemment pour le DICV qui induit des **altérations fonctionnelles de composants immunitaires malgré une quantité normale** (227) et ii) la réponse mémoire à médiation humorale n'est pas toujours le reflet de celle à médiation cellulaire. **L'évaluation des marqueurs "statiques" ne semble donc pas suffisante, et suggère le besoin d'utiliser des tests immunitaires fonctionnels.**

3.2. Tests immunitaires fonctionnels

L'activité de la réponse immunitaire au niveau individuel peut être évaluée grâce aux tests immunitaires fonctionnels (IFA, de l'anglais *Immune functional assays*) décrits comme des tests évaluant la réponse immunitaire induite après une stimulation *ex vivo*. Les IFA offrent la possibilité d'évaluer la fonction des cellules immunitaires, la restauration potentielle de l'immunité ou d'anticiper la réponse à une immunothérapie. La conception et la première utilisation d'un IFA date de l'époque d'Edward Jenner, lorsque ce dernier a injecté des extraits d'agents pathogènes par voie sous-cutanée pour évaluer la réponse humorale contre la variole. Koch et Mantoux ont par la suite inventé et développé le premier IFA pour diagnostiquer les infections à *Mycobacterium tuberculosis*, nommé test de l'intradermoréaction à la tuberculine (228). Les IFA ont ensuite été développés et adaptés dans différents contextes au cours des dernières décennies, en étroite relation avec l'étude du système immunitaire et de l'accroissement des connaissances qui lui sont associées. Les principaux cadres d'utilisation des IFA sont le diagnostic et la prise en charge des infections et des maladies impliquant le système immunitaire (auto-immunes, déficits immunitaires ou allergies).

Les trois étapes qui constituent un IFA sont (i) **un échantillon biologique** contenant des cellules immunitaires, (ii) **une stimulation** capable de déclencher une réponse de ces cellules, et enfin (iii) **une méthode de lecture** capable de mesurer cette réponse (**Figure 27**).

Figure 27. Principe simplifié de la réalisation d'un test immunitaire fonctionnel – Source personnelle



Ac, anticorps ; Ag, antigène ; ELISA, ELISA enzyme-linked immunoassay ; PBMC, peripheral blood mononuclear cells ; TLR, Toll-like receptor

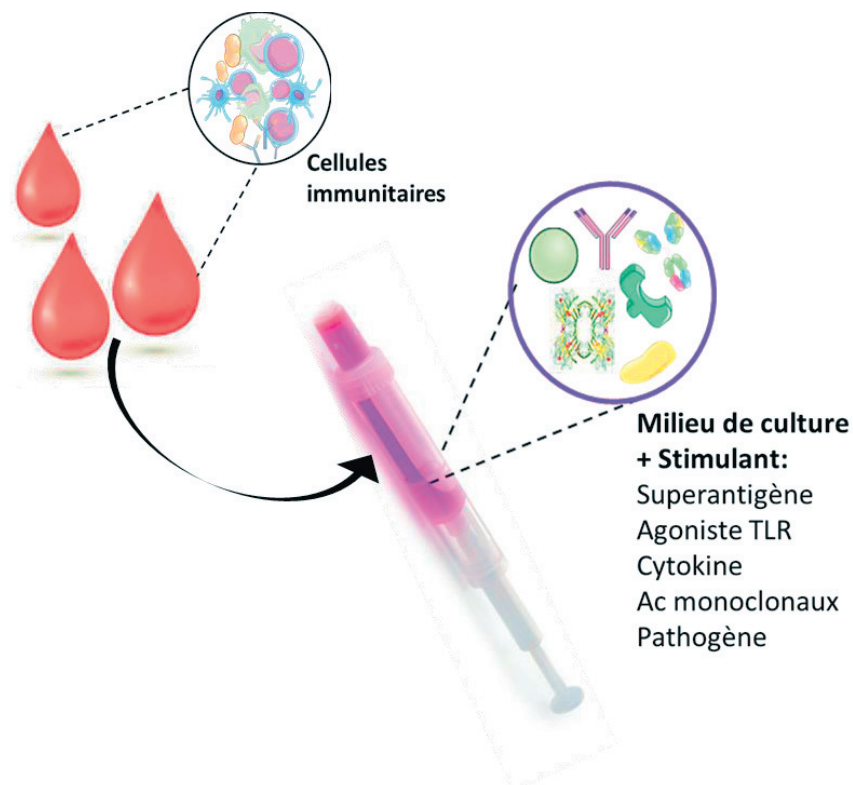
3.2.1. L'échantillon biologique

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC, de l'anglais *Peripheral blood mononuclear cell*) constituent l'échantillon biologique majoritairement utilisé pour la réalisation des IFAs, car il contient la plupart des principales populations de cellules immunitaires circulantes.

Cette méthode repose sur la séparation des PBMC à partir de prélèvements sanguins par gradient de densité (méthode Ficoll), décrite pour la première fois en 1968 (229). Malgré une importante utilisation au laboratoire, cette méthode présente néanmoins de nombreuses limites puisqu'elle requiert du temps, de l'habileté technique et peut induire un nombre important de variabilité (230) et de risque de contamination de l'échantillon (231). De plus, la présence résiduelle de Ficoll peut provoquer des effets non-spécifiques sur les cellules de l'immunité, que ce soit en terme d'activation, d'inhibition ou de mort, réduisant ainsi la qualité globale de l'échantillon (232,233).

Bien que les IFA soient habituellement réalisés à partir de PBMC, des études ont montré qu'il était également possible d'utiliser du sang total, que ce soit pour évaluer les réponses post stimulation des lymphocytes T par marquage intracellulaire de cytokines (ICS) (234) ou pour comparer des profils d'expression de gènes (235). L'utilisation de sang total apparaît ainsi mieux adapté à la réalisation des IFAs, permettant de réduire le temps de manipulation, la variabilité, de réaliser des analyses à partir de petits volumes d'échantillons et, de manière importante de préserver la composition et les interactions entre les populations cellulaires (236). Ils existent notamment pour cela des systèmes de stimulation sur sang total en tubes semi-fermés, nommés TruCulture® (**Figure 28**).

Figure 28. Principe du système de stimulation standardisé et semi-fermé Truculture® – Source personnelle

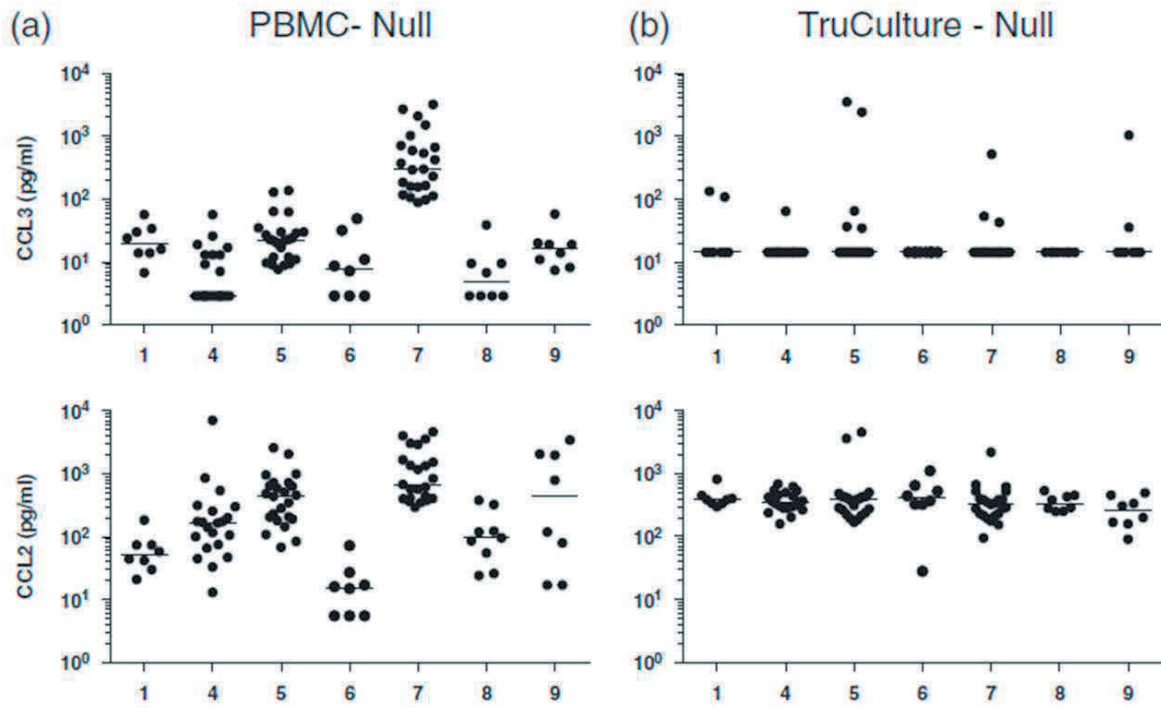


Ac, anticorps ; TLR, *toll-like receptor*

Une étude de 2017 du consortium *Milieu intérieur* a permis de comparer ces systèmes avec une stimulation *ex vivo* de PBMC en plaque plus conventionnelle, à partir de 152 prélèvements de donneurs sains dans 7 différents centres. Les auteurs mettent en évidence une importante réduction de la variabilité inter-sites par rapport aux méthodes utilisant les PBMC (**Figure 29**) (232).

Figure 29. Variabilité inter-sites en condition contrôle non stimulée (Null) de l'expression de CCL3 et CCL2 - d'après (232).

Résultats obtenus sur PBMC (A) et sang total TruCulture (B) dans les sept centres participants, les points représentent un donneur sain et les barres la valeur médiane.



PBMC, Peripheral blood mononuclear cells

La mise en place d'outils standardisés tels que les Truculture® pour l'évaluation des réponses immunitaires fonctionnelles pourrait donc contribuer à améliorer l'harmonisation des études d'immunomonitoring cliniques et le partage des données, notamment pour les études multicentriques.

Une fois l'échantillon biologique prélevé, la seconde étape de la réalisation d'un IFA consiste à induire une réponse immunitaire au sein de l'échantillon biologique via l'utilisation de stimulants immunogènes.

3.2.2. Stimulant

Les stimulants peuvent être i) non spécifiques et permettre d'évaluer l'état global des capacités immunitaires innées et adaptatives ou ii) spécifiques d'un pathogène et utiles pour le diagnostic d'une infection ou l'étude d'une réponse vaccinale.

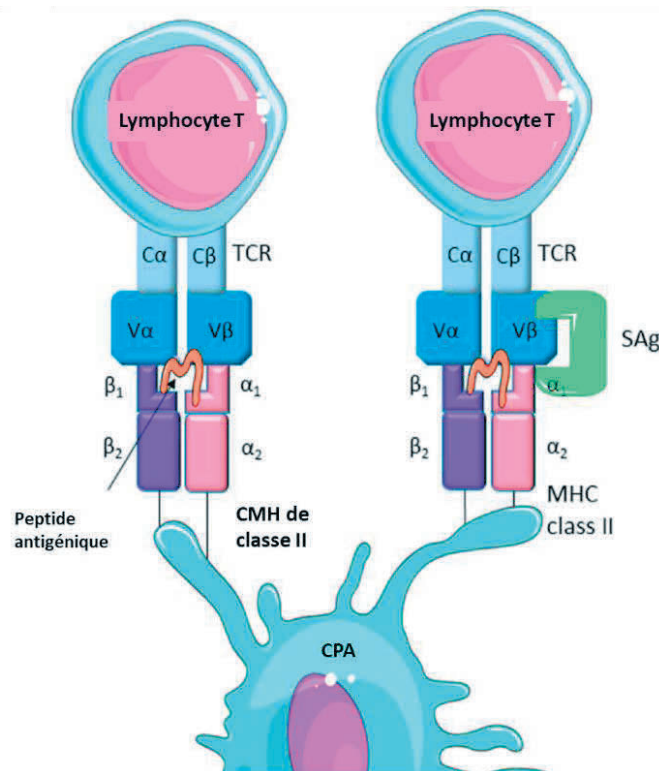
Concernant les stimulants non-spécifiques pour l'activation de la réponse adaptative, il est notamment courant d'utiliser les lectines concanavaline A (ConA) et phytohémmagglutinine (PHA) pour leur rôle d'agent mitogène. La ConA déclenche la réticulation du complexe du récepteur de l'antigène des lymphocytes T (TCR, de l'anglais *T cell receptor*) conduisant à l'activation des lymphocytes T (237), tandis que la PHA se lie au TCR et déclenche des voies de signalisation dépendantes du calcium qui conduisent à l'activation du facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT) (238). Ces mitogènes permettent ainsi d'induire une activation massive non-spécifique du système immunitaire cellulaire, en recrutant des lymphocytes et en induisant la production de cytokines.

- Les superantigènes

L'activation non-spécifique des lymphocytes peut également être réalisée via l'utilisation de « superantigènes » bactériens (ex : entérotoxines staphylococciques (239)) ou viraux (ex : associés à EBV (240)). Ces molécules sont à l'origine de chocs toxiques, qui sont des pathologies assez rares, mais pouvant s'avérer très sévères. Les plus courantes sont la toxine du syndrome de choc toxique (TSST-1), les entérotoxines staphylococcique A (SEA) ou B (SEB), produites par *Staphylococcus aureus*, ou encore les exotoxines pyrogènes streptococciques-A (SPEA), produites par *Streptococcus pyogenes*.

Les superantigènes activent, de manière non-spécifique, plusieurs clones de lymphocytes T CD4⁺ avec une amplitude cinq fois supérieur par rapport à l'activation d'un clone spécifique de lymphocytes T CD4⁺ induite par un seul antigène. Cette activation massive est due à la liaison du superantigène à la fois au CMH-II, fréquemment à la chaîne α , et à la chaîne V β du TCR sans avoir à passer par le mécanisme classique de présentation de l'antigène (**Figure 30**) (241). Cette activation lymphocytaire va induire une importante production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine (IL)1, l'IL2, l'IL6, le TNF- α ou l'interféron gamma (IFN- γ).

Figure 30. Mécanisme d'activation des lymphocytes T par un superantigène - Adapté d'après (242)



MHC, major histocompatibility complex; Sag, superantigen ; TCR, T cell receptor

Il existe également des stimulants non spécifiques permettant d'évaluer la réponse immunitaire innée. Ils peuvent être associés à un récepteur membranaire tels que les TLR, et être utilisés pour étudier des voies de signalisation ou des mécanismes particuliers. Par exemple, l'utilisation d'agoniste du TLR4 comme le LPS permet d'étudier la voie de signalisation induite par la molécule MyD88 et les mécanismes pro-inflammatoires; l'utilisation d'acide Polyinosinic:polycytidylic (communément nommé poly I:C) permet d'analyser la voie de signalisation du TLR3 et la production d'interféron de type I (**Figure 7**).

Enfin, il est possible d'utiliser des combinaisons de stimulants de la réponse immunitaire innée et adaptative, comme dans le kit commercial QuantiFERON-Monitor (QIAGEN). Le principe de ce test repose sur une stimulation sur sang total via un ligand anti-CD3 induisant une stimulation lymphocytaire T et un ligand R848 induisant une stimulation innée via les TLR-7 et TLR-8.

Pour la réalisation d'un IFA il est également possible d'avoir recours à des stimulants spécifiques d'un pathogène, tel que pour l'*Interferon Gamma Release Assays* ou IGRA.

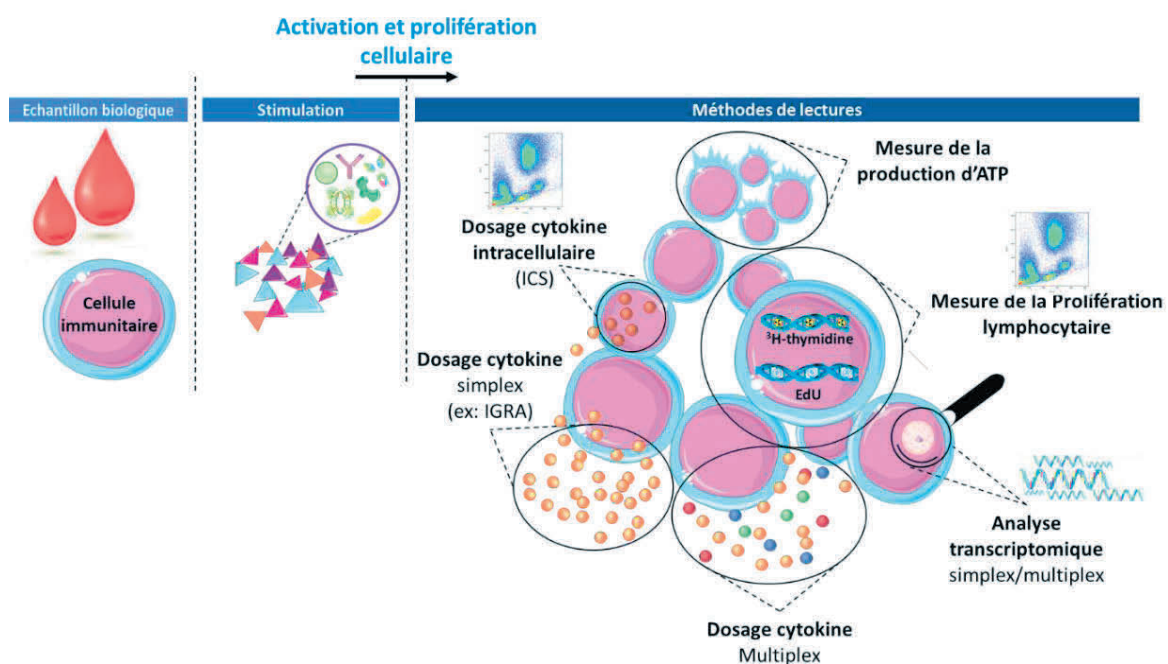
Ce test, que nous décrivons dans la partie méthode de lecture ci-après, peut être réalisé à façon au laboratoire ou via l'utilisation de kit commerciaux de stimulation sur sang total.

Ces tests sont utilisés pour estimer un risque infectieux, comme pour CMV dans le contexte de la transplantation (QuantiFERON-CMV et T-SPOT.CMV) ou pour le diagnostic d'une infection, telle que *Mycobacterium tuberculosis*, (T-spot TB (243) et QuantiFERON-TB Gold Plus (244,245)). Le QuantiFERON-TB Gold Plus représente, avec le test historique de l'intradermoréaction à la tuberculine (IDR), un gold standard en France pour le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente. Le principe de détection de ces kits repose sur le dénombrement des cellules réactives par technique ELISpot ou le dosage de cytokine sécrétée par technique ELISA. Ces différents kits commerciaux ne diffèrent donc que par leur méthode de lecture, correspondant à la dernière étape de la réalisation d'un IFA.

3.2.3. Méthode de lecture

La dernière étape d'un IFA est la lecture de la réponse immunitaire induite par la stimulation. Une variété de méthodes de lecture existe, et sont résumées dans le **tableau 16 (Figure 31)**.

Figure 31. Liste non exhaustive des méthodes de lecture utilisables post stimulation – Source personnelle



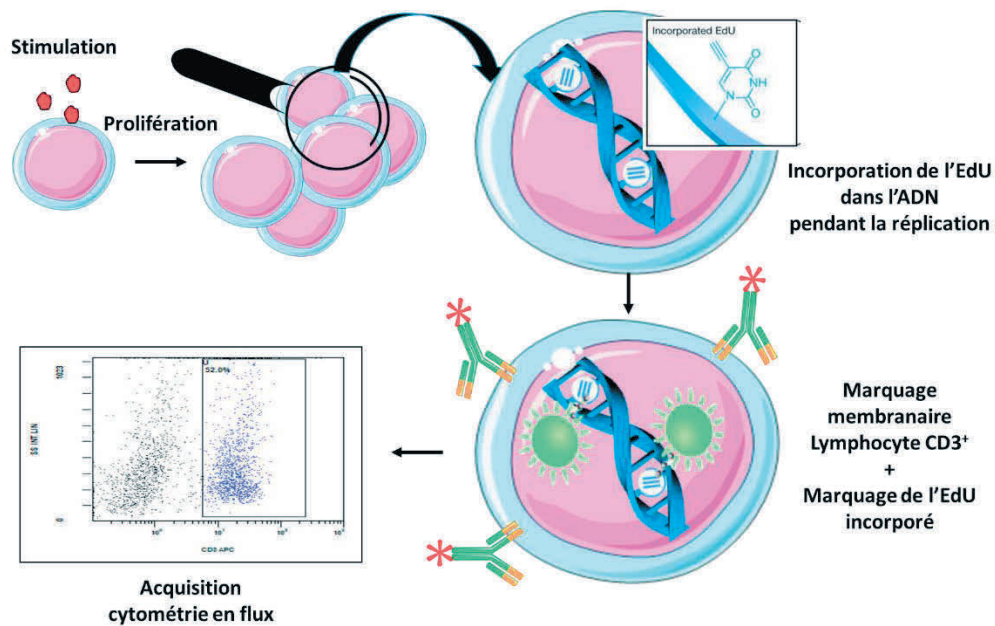
Les tests les plus couramment employés sont les IGRA. Ils permettent, post-stimulation, de quantifier la production de l'IFN- γ , notamment par les lymphocytes T réactifs à la présentation antigénique. En effet, l'IFN- γ est une cytokine principalement sécrétée par les lymphocytes T activés et les cellules NK impliquées dans l'immunité antivirale et antibactérienne, la présentation de l'antigène, la régulation de l'équilibre Th1 /Th2 ou encore le contrôle la prolifération cellulaire et l'apoptose (246).

Comme décrit ci-dessus, il existe plusieurs IGRA commerciaux. Néanmoins ils peuvent également être réalisables sans avoir recours à des kits prêts à l'emploi en adaptant le protocole avec un stimulant relatif au type d'immunité recherché (**Tableau 16**). Sur le même principe que les IGRA, d'autres cytokines d'intérêts peuvent également être mesurées après une stimulation, par exemple en mesurant la sécrétion de TNF- α post stimulation avec le LPS pour révéler une anergie cellulaire (247).

Il existe également d'autres méthodes originales permettant de regarder l'activité des lymphocytes T, tel que le ImmunKnow (Cylex, Inc., Columbia, MD, États-Unis), un test développé pour évaluer le risque d'infection et prédire le rejet d'une greffe d'organe (248). Ce test mesure l'ATP intracellulaire produit par des lymphocytes T CD4⁺ purifiés après une incubation *in vitro* sur sang total en présence de PHA. Les échantillons sont incubés pendant 15-18 h (avec ou sans PHA) et la production d'ATP après stimulation est comparée au niveau basal d'ATP. Plusieurs études ont rapportées une corrélation entre des niveaux inférieurs d'ATP et un risque d'infection plus élevé, tandis qu'une production accrue d'ATP semble être associée au rejet (249,250) (**Tableau 16**).

La cytométrie en flux est également une méthode couramment utilisée pour la réalisation de tests fonctionnels. Ce système permet par exemple d'évaluer la capacité de prolifération des lymphocytes post stimulation avec des mitogènes ou des antigènes de rappels via l'utilisation de marqueurs de division cellulaire (**Figure 32**).

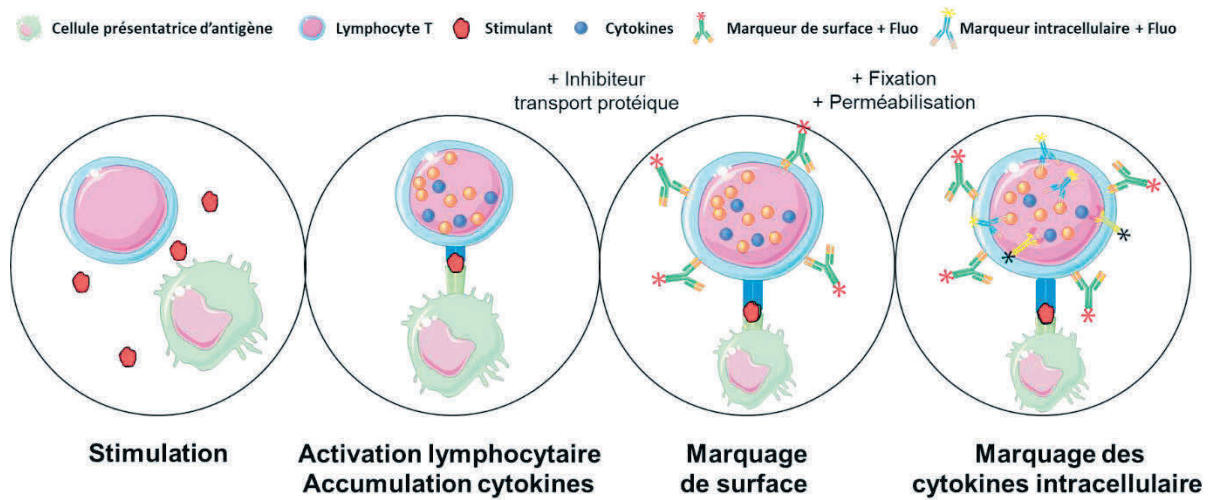
Figure 32. Les principales étapes de la mesure de la prolifération lymphocytaire, exemple du marquage par EdU – Source personnelle



Ces tests de prolifération lymphocytaire présentent un intérêt particulier dans des contextes d'altérations fonctionnelles spécifiques des lymphocytes T malgré un nombre de cellules normal (251). L'évaluation de la réponse proliférative lymphocytaire repose essentiellement sur la détection de l'incorporation de [3H]-thymidine dans l'ADN pendant la réplication cellulaire induite par la stimulation. Cependant, même si des alternatives existent pour éviter l'utilisation de la radioactivité, telle que le 5-éthynil-2'-désoxyuridine (EdU) (252), de tels tests restent lourds et difficiles à mettre en œuvre (**Tableau 16**).

La cytométrie en flux permet également d'étudier la production de cytokines au niveau monocellulaire via la technique d'ICS (de l'anglais, *Intracellular cytokine staining*). Cette technique réalisable sur sang total ou PBMC permet, post stimulation, d'identifier et de mesurer le pourcentage de sous-population cellulaire productrices de cytokines d'intérêt. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet l'évaluation simultanée de plusieurs cytokines ou marqueurs de surfaces en réalisant une coloration multi-paramétrique (**Figure 33**).

Figure 33. Les différentes étapes de la coloration de cytokines intracellulaires avant acquisition en cytométrie en flux – Source personnelle



Dernier exemple, la cytométrie en flux peut être utilisée dans le contexte des allergies pour réaliser un test d'activation des basophiles (BAT, de l'anglais *Basophil activation test*). Ce test de stimulation par un allergène *in vitro* sur sang total ou PBMC est basé sur l'évaluation de l'expression, à la surface des basophiles, de marqueurs d'identification tels que CCR3/CD203c et d'activation tels que CD107a/CD107b. Le BAT est apparu en complément des tests cutanés et des mesures de sécrétion *in vitro* de médiateurs tel que l'histamine, ces derniers pouvant présenter une plus faible sensibilité ainsi que des limitations techniques et analytiques (Tableau 16)(253).

Tableau 16. Applications des IFA dans différentes pathologies - mises à jour d'après (254)

Domaine d'application	Test immunitaire fonctionnel	Exemple de commercialisation	Objectif du test	Technique d'évaluation	Echantillon biologique	Stimulant	Délais de stimulation	Référence
DIP	Prolifération lymphocytaire	BrdU cell proliferation assay Elisa Kit	Diagnostic des DIP	Mesure de la prolifération lymphocytaire	PBMC	Mitogène (ex: PHA)	Variable De 72h à 6-7 jours	(255)
	Explosion oxydative des neutrophiles	PHAGOBURST™	Diagnostic des DIP	Mesure de l'activité de la NADPH oxydase (NOX)	Sang total	Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	10 min	(256,257)
	Activité du complément	AH50/CH50 HaemoScan ClniSciences Mybiosource	Diagnostic des DIP	Mesure de l'activité des votes classique/alternative	Sérum/plasma	/	30 min	(258)
	Activité des NK	FlowX Human NK Cell Killing (bioTechne)	Diagnostic des DIP	Mesure l'activité cytotoxique des NK (marqueurs cellulaires)	PBMC	Cellules cibles (ex: K562)	Variable de 2h à 24h	(259,260)
Tuberculose	IGRA	QuantIFERON® -TB (QIAGEN) T-Spot TB (ELISpot)	Détection de l'infection par <i>Mtb</i>	Mesure de la libération de l'IFN γ	Sang total	Peptides simulant ESAT-6 et CFP-10	16h à 24h	(244)
Immuno-supression	IGRA	QuantIFERON-CMV® (QIAGEN)	Stratification du risque de réactivation virale Prédiction du risque infectieux	Mesure de la libération de l'IFN γ	Sang total	CMV antigen	16h à 24h	(248)
Transplantation	Production d'ATP	ImmuKnow assay® (Cylex)	Gestion du niveau d'immunodépression Evaluation du risque infectieux	Mesure la production d'ATP des lymphocytes T CD4+	Sang total	PHA	15h à 18h	(249,250)
	IGRA	QuantIFERON Monitor (QIAGEN)	Gestion clinique des patients TOS	Mesure de la libération de l'IFN γ	Sang total	Agoniste TLR7 + anticorps anti-CD3	16h à 24h	(261)

Domaine d'application	Test immunitaire fonctionnel	Exemple de commercialisation	Objectif du test	Technique d'évaluation	Echantillon biologique	Stimulant	Délais de stimulation	Référence
	Prolifération lymphocytaire	Click-iT™ EdU (thermoFischer)	Evaluation de la fonction immunitaire cellulaire spécifique	Mesure de la prolifération lymphocytaire	PBMC	Spécifique de l'antigène cible	Variable selon stimulant De 72h à 6-7 jours	(252,262)
Vaccination	Test d'opsonophagocytose	Test personnalisable	Evaluation de la fonction immunitaire humorale spécifique	Quantification d'anticorps sériques pour opsoniser au moins 50% de bactéries	Lignées cellulaires	Stimulant personnalisable	1h environ	(263,264)
	Seroneutralisation	Test personnalisable		Quantification du titre d'anticorps neutralisants contre un virus.	Lignées cellulaires	Stimulant personnalisable	Variable selon virus De 72h à 5 jours	(265–267)
Auto-immunité	IGRA	QuantIFERON-TB Gold (QIAGEN) T-SPOT.TB test (T-SPOT)	Evaluation des effets des thérapies immunosuppressives	Mesure de la libération de l'IFN γ	Sang total PBMC	Peptides simulant ESA-T-6 et CFP-10	16h à 24h 16h à 20h	(268,269)
Allergie	Libération d'histamine	ImmuSmol Abcam	Evaluation des allergènes responsable d'allergie de type 1	Mesure par fluorométrie de la libération d'histamine	Sang total	Stimulant personnalisable	2h environ	(270)
	Test cutané	Test personnalisable	Diagnostic des allergies (acariens, pollens, alimentaires)	Mesure du diamètre de la papule	Peau	Stimulant personnalisable	15-20 min	(271,272)
	Activation des basophiles	Flow CAST® (Bühlmann)	Diagnostic des allergies (alimentaires, médicamenteuses)	Mesure de l'activation des basophiles	Sang total	Stimulant personnalisable	1h environ	(273,274)

ATP, adénosine triphosphate ; DIP, Déficit immunitaire primitif ; IGRA, Interferon gamma release assay ; IFN γ , Interferon ; NK, Natural killer ; PBMC, Peripheral blood mononuclear cells ; PHA, Phytohémmagglutinine

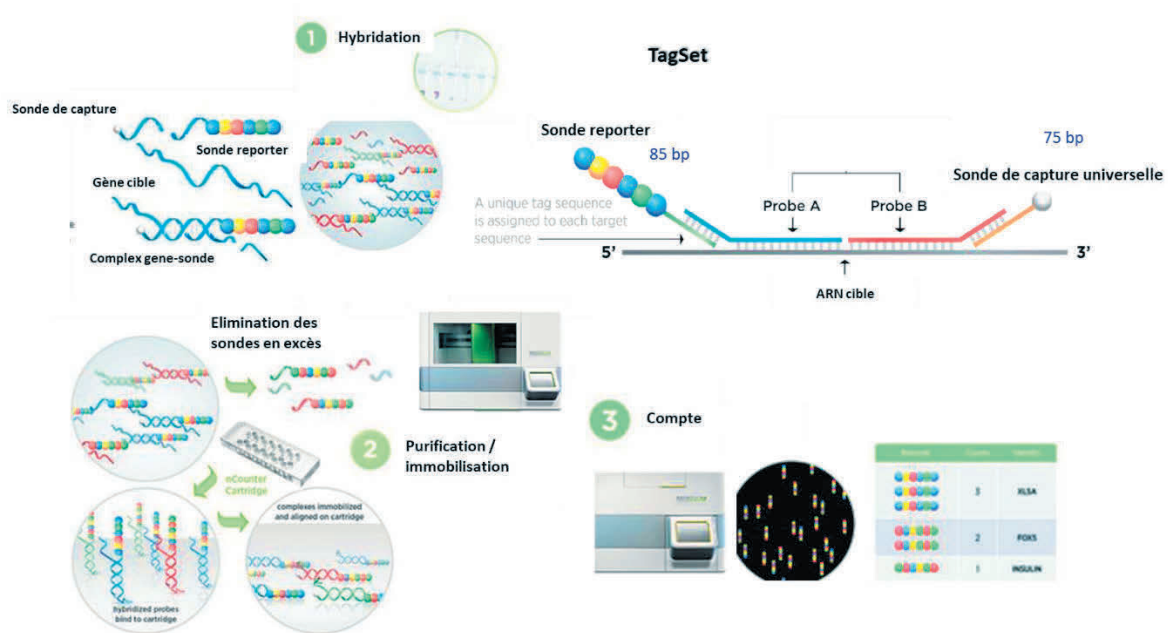
Néanmoins, les différents IFA détaillés dans le **tableau 16** n'évaluent, pour la plupart, qu'un seul composant ou mécanisme de la réponse immunitaire, et, bien que dans certains cas l'utilisation d'un seul biomarqueur a pu montrer un intérêt, cela ne reflète probablement pas entièrement la complexité de la réponse immunitaire. Une combinaison de biomarqueurs semble ainsi plus pertinente pour obtenir une vue globale de l'état immunitaire des patients. Dans ce sens, l'émergence des études en « -omique » a conduit au développement de technologies avancées et de dispositifs prêts à l'emploi. Le multiplexage en protéomique et en transcriptomique permet l'analyse simultanée d'un grand nombre d'analytes ciblés sur un seul et même échantillon.

Au niveau protéomique différentes plateformes automatisées ont été développées sur le principe d'un ELISA telles que Luminex™ (R&D Systems, BIO-Techne LTD), ELLA nanofluidic system (Biotechne, Minneapolis, MI, USA) ou encore SIMOA™ HD-1 Analyzer (QUANTERIX). Leur utilisation permet une détection de protéines sécrétées du pg/mL au fg/mL pour la dernière citée.

A titre d'exemple en 2021 une étude multicentrique sur plus de 3000 patients a permis de mettre en évidence la plus-value de la combinaison des cytokines IFN- γ /IL-2 afin de différencier la tuberculose active des autres maladies pulmonaires comparativement au seul marqueur IFN- γ . La sensibilité et la spécificité globale passant respectivement de 83,8 % et 81,5 % pour l'IFN- γ à 87,9 % et 79,8 % pour la combinaison IFN- γ /IL-2 (275). Une seconde étude de 2021 décrit, au sein de deux cohortes pédiatriques indépendantes, qu'une triple combinaison de cytokines TNF α /IL-2/IL-17A permet d'obtenir un meilleur pouvoir discriminant (sensibilité/spécificité 100%, AUC=1) pour distinguer une tuberculose active comparativement au dosage d'une seule cytokine (276).

Au niveau transcriptomique, le développement de plateformes multiplexes permet également d'avoir un aperçu général des réponses immunitaires via l'expression de larges panel de gènes. La plateforme Nanostring, par exemple, permet d'analyser plus de 800 gènes cibles sans aucune étape enzymatique, à l'aide d'un protocole automatisé simple ne nécessitant que 15 minutes de manipulation (**Figure 34**).

Figure 34. Les différentes étapes de la technologie Nanostring – Source personnelle



Cette plateforme permet la quantification de l'expression de gènes avec une capacité de multiplexage élevée sur une quantité minimale d'ARN, à travers de panels prêts à l'emploi affiliés à diverses thématiques ou via la confection de panels personnalisables à partir des gènes cibles disponibles.

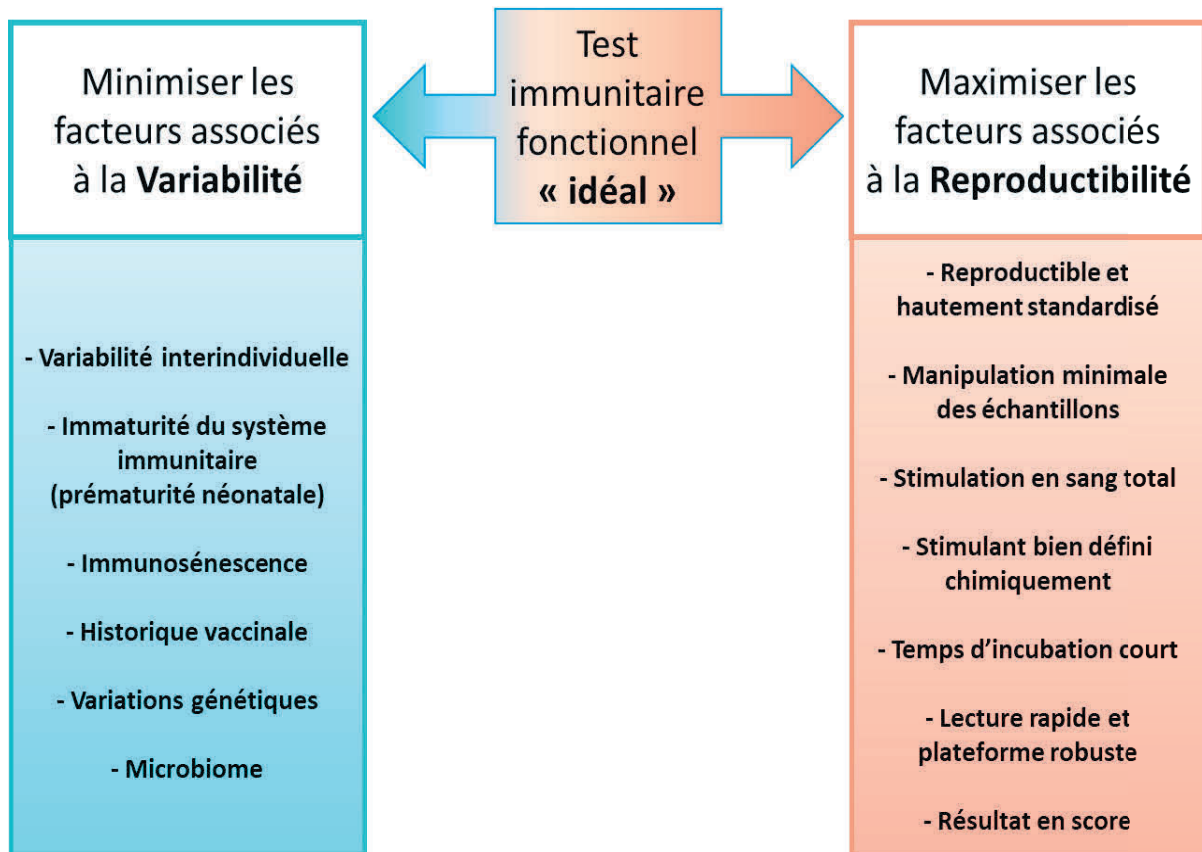
Une étude de 2020 a notamment utilisé cet outil pour caractériser, à partir de deux cohortes indépendantes, les altérations sous-jacentes de la réponse immunitaire de l'hôte au sein d'une population de patient présentant un sepsis. Les auteurs décrivent que l'analyse de l'expression d'un panel de 96 gènes en réponse à une stimulation par le SEB semble offrir une valeur ajoutée en permettant une stratification supplémentaire de la population septique par rapport à un seul paramètre statique, tel que le mHLA-DR (277).

Cependant, en fonction du contexte d'étude, la nécessité d'un délai rapide de rendu des résultats influencera le choix de la méthode de lecture, pouvant être un frein à l'utilisation des approches « -omiques ».

En outre, la principale limite à l'implémentation en routine clinique des tests fonctionnels est l'importante variabilité interindividuelle liée à des facteurs intrinsèques tels que l'âge, le sexe, les comorbidités, l'hétérogénéité de la composition sanguine et des facteurs génétiques qui peuvent compliquer l'interprétation de ces résultats (278–282).

Il est donc indispensable de limiter la variabilité technique provenant de chacune des trois étapes qui composent un test immunitaire fonctionnel afin de faciliter son utilisation et ainsi obtenir un test idéal (Figure 35) (283).

Figure 35. Test immunitaire fonctionnel « idéal » - Adapté d'après (283)



3.2.4. Revue scientifique

La revue présentée ci-dessous nommée " Place des tests immunitaires fonctionnels dans la prise en charge du risque infectieux et de la gestion des thérapies immunosuppressives chez les patients immunodéprimés non-VIH "(254) soumis à « la revue de médecine interne », décrit les différents tests immunitaires fonctionnelles (IFA) développés et/ou commercialisés ainsi que leur utilisation dans le contexte des déficits immunitaires secondaires hors-VIH.

Après une introduction générale sur le suivi immunologique des déficits immunitaires, le positionnement, l'intérêt et le principe de différents IFA sont abordés dans trois contextes spécifiques. : I) la gestion du risque infectieux, ii) la réponse vaccinale et iii) la gestion des thérapies immunosuppressives.

L'objectif de cette revue était de décrire les IFA disponibles dans le cadre d'un déficit immunitaire acquis non lié au VIH et de présenter leurs avantages et leurs inconvénients.

Publication

Functional immunoassays in the setting of infectious risk and immunosuppressive therapy of non-HIV immunocompromised patients

Mathilde Boccard ; Chloé Albert Vega ; **William Mouton** , Isabelle Durieu ; Karen Brengel-
Pesce ; Fabienne Venet F ; Sophie Trouillet-Assant ; Florence Ader

2020

Published in Rev Med Interne: doi: 10.1016/j.revmed.2020.04.008



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



Carrefour des spécialités

Place des tests immunitaires fonctionnels dans la prise en charge du risque infectieux et de la gestion des thérapies immunosuppressives chez les patients immunodéprimés non-VIH

Functional immunoassays in the setting of infectious risk and immunosuppressive therapy of non-HIV immunocompromised patients

M. Boccard ^{a,b,c,*}, C. Albert-Vega ^c, W. Mouton ^{c,d}, I. Durieu ^b, K. Brengel-Pesce ^c, F. Venet ^{c,e,f}, S. Trouillet-Assant ^{c,d}, F. Ader ^{a,g,1}

^a Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Inserm 1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, F-69007, Lyon, France

^b Département de médecine interne et vasculaire, centre hospitalier Lyon Sud, Hospices civils de Lyon, 69310 Pierre-Bénite, France

^c Unité mixte Hospices civils de Lyon–bioMérieux, centre hospitalier Lyon Sud, Hospices civils de Lyon, Pierre-Bénite, 69495 Lyon, France

^d Laboratoire virologie et pathologies humaines (VirPath), faculté de médecine Lyon Est, université Claude-Bernard Lyon 1, 69008 Lyon, France

^e Laboratoire d'immunologie, hôpital Édouard-Herriot, Hospices civils de Lyon, 69003 Lyon, France

^f EA7426 Pathophysiology of injury-induced immunosuppression, université Claude-Bernard Lyon 1, 69008 Lyon, France

^g Département des maladies infectieuses et tropicales, hôpital de la Croix-Rousse, Hospices civils de Lyon, 69004 Lyon, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Disponible sur Internet le 3 juillet 2020

Mots-clés :

Immunodépression
Monitoring immunitaire
Risque infectieux
Transplantation
Vaccination

Keywords:

Immunosuppression
Immunomonitoring
Infectious risk
Transplantation
Vaccination

RÉSUMÉ

L'approche holistique du système immunitaire humain repose sur l'analyse de ses composants déterminant collectivement une réponse à un stimulus immunogène. L'étude de la réponse immunitaire induite ex vivo est basée sur la reproduction d'une condition pour mesurer une altération immunitaire fonctionnelle. Les domaines d'application de ces tests de fonctionnalité immunitaire sont vastes et croissants, allant du diagnostic des déficits immunitaires primaires ou secondaires, à l'immunothérapie dans le cancer, à la gestion du risque infectieux dont l'immunoprophylaxie vaccinale. Ces tests sont des outils de monitoring immunitaire contribuant à une évolution des pratiques vers une médecine de précision et personnalisée.

Le but de cette revue est de présenter les tests immunitaires fonctionnels disponibles dans le contexte des déficits immunitaires secondaires non-VIH. Leurs intérêts seront d'abord expliqués dans le contexte du risque infectieux (notamment des réactivations virales), puis dans le domaine de la vaccination et de la gestion des thérapies immunosuppressives.

© 2020 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

ABSTRACT

The holistic approach of the human immune system is based on the study of its components collectively driving a functional response to an immunogenic stimulus. To appreciate a specific immune dysfunction, a condition is mimicked ex vivo and the immune response induced is assessed. The application field of such assays are broad and expanding, from the diagnosis of primary and secondary immunodeficiencies, immunotherapy for cancer to the management of patients at-risk for infections and vaccination. These assays are immune monitoring tools that may contribute to a personalised and precision medicine.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : mathilde.boccard@chu-lyon.fr (M. Boccard).

¹Au nom du Lyon HEMINF study group : F. Ader, V. Alcazer, E. Bachy, M. Balsat, F. Barraco, M. Boccard, G. Billaud, C. Chidiac, A. Conrad, S. Ducastelle-Leprêtre, O. Dumitrescu, D. Dupont, V. Escuret, T. Ferry, E. Frobert, H. Ghesquière, M. Heiblig, H. Labussière-Wallet, M.-V. Larcher, F. Laurent, B. Lina, G. Lina, C. Malcus, J. Menotti, P. Miaillhes, G. Monneret, F. Morfin-Sherpa, T. Perpoint, F. Poitevin-Latter, M. Rabodonirina, M. Renault, C. Roure-Sobas, G. Salles, X. Thomas, S. Trouillet-Assant, F. Valour, F. Venet, F. Wallet, M. Wallon.

<https://doi.org/10.1016/j.revmed.2020.04.008>

0248-8663/© 2020 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

The purpose of this review is to describe immune functional assays available in the setting of non-HIV acquired immune deficiency. First, we will address the use of these assays in the diagnosis of opportunistic infections such as viral reactivation. Secondly, we will report the usefulness of these assays to assess vaccine efficacy and to manage immunosuppressive therapies.

© 2020 Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Le système immunitaire est un système complexe, organisé en réseaux interconnectés capable de déployer des stratégies d'adaptation, de compensation et de redondance fonctionnelle pour maintenir un état d'homéostasie [1]. Son rôle principal est la défense de l'organisme contre des agressions internes ou externes. Ainsi, une ou des cascade(s) d'événement(s) générant un déséquilibre durable du système peut aboutir à une pathologie aiguë ou chronique déterminée par un excès ou une insuffisance de réponse immunitaire (susceptibilité aux infections, inflammation, auto-immunité, allergie, oncogénèse) [2,3].

Le système immunitaire comprend une multitude de composants cellulaires et moléculaires répartis dans tout l'organisme et rapidement mobilisables. La connaissance des mécanismes régissant son fonctionnement a considérablement progressé en peu de temps, favorisée par des avancées majeures telles que la vaccination, les techniques de transplantations, jusqu'aux immunothérapies actuelles en plein essor [3]. Outre sa composition, la complexité de ce système tient aussi à la succession de phénomènes dynamiques. Ainsi, les tests disponibles en routine comme le compte cellulaire, la mesure de marqueurs solubles ou de surface (cytokines, anticorps ou système de complément) et l'analyse du phénotype cellulaire en cytométrie de flux ont leurs limites et peuvent méconnaître des altérations fonctionnelles. Contrairement à ces marqueurs traditionnels explorant des déficits quantitatifs ou phénotypiques, les tests évaluant la réponse immunitaire induite après stimulation ont pour but de mimer une condition in vivo permettant d'appréhender une altération immunitaire fonctionnelle [4]. Ces tests que nous appellerons IFAs, acronyme anglophone de *immune functional assays*, sont connus depuis longtemps, en l'occurrence lors des premiers essais antivarioliques. Depuis, ils sont accessibles en routine dans le cadre nosologique de l'infection tuberculeuse latente (c'est à dire, intradermoréaction à la tuberculine ou test de production d'interféron [IFN- γ]) et le diagnostic des déficits immunitaires primitifs [5]. Actuellement, ils font partie du panel ou « immunomonitoring » des patients atteints de déficit immunitaire, pour des prises en charge liées à la vaccinologie, l'infectiologie, la transplantation d'organes solides (TOS) et de cellules souches hématopoïétiques (CSH), l'allergologie, la cancérologie et les immunothérapies plus récentes [6].

L'enjeu actuel est le positionnement des IFAs dans le concept plus large « d'immunologie des systèmes ». Ce concept résulte de la rapidité des avancées technologiques à partir d'un échantillon sanguin et la capacité à générer et à analyser une somme très importante de données à une échelle individuelle. Cela permet de développer une approche translationnelle, connectant la pratique médicale clinique aux avancées fondamentales et technologiques (« from bench to bedside ») [1,7]. Dans une optique de médecine personnalisée, son but est la stratification des patients et la modélisation de biomarqueurs accessibles et reproductibles [1]. La possibilité de « cartographier » un statut immunitaire est une avancée majeure en immunologie clinique, car l'application des connaissances développées à partir des modèles expérimentaux mammifères (le plus souvent murins) s'est avérée souvent limitée [4].

L'objet de cette revue est de décrire les applications des IFAs dans le suivi immunologique des déficits immunitaires acquis, notamment au sein de populations dont le nombre et la diversité croissent, tels que les receveurs de TOS ou de CSH (hors infection par le VIH).

2. IFAs et risques infectieux

Le développement des IFAs est particulièrement adapté au domaine de l'infectiologie car ils permettent de quantifier la réponse immunitaire contre un microorganisme grâce à une stimulation ex vivo d'un agent immunogène précis. Actuellement, les IFAs sont utilisés comme marqueurs biologiques pour l'évaluation du risque infectieux lié à une pathologie affectant le système immunitaire ou lié à une immunodépression induite par des thérapies. Ils permettent également d'évaluer l'efficacité vaccinale notamment lorsque la réponse vaccinale est impactée en cas d'immunosénescence et d'immunodépression secondaire.

Citons d'abord leur développement dans la prise en charge de l'infection à *Mycobacterium tuberculosis*. La réponse immunitaire cellulaire joue un rôle pivot dans le contrôle de l'infection via la production d'interféron-gamma (IFN- γ). La détection de l'infection tuberculeuse latente est l'élément majeur du dispositif préemptif visant à diminuer le risque de tuberculose maladie. Dans ce cas, la mise en culture d'un échantillon par les techniques classiques de microbiologie pour l'identification du *M. tuberculosis* est vouée à l'échec. Outre l'intradermoréaction classique décrite par Koch et al. en 1890 qui mesure la réponse d'hypersensibilité retardée dépendante des lymphocytes T in vivo après exposition intradermique à la protéine ubiquitaire mycobactérienne tuberculine. Les tests récents cherchent à améliorer les performances diagnostiques ex vivo. Il s'agit de tests appelés *interferon-gamma release assays* (IGRAs) détectant l'IFN- γ sécrété après stimulation du sang total par des antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* [5]. La détection de production d'IFN- γ quantifiée en comparaison aux contrôles simultanés négatif et positif indique la présence dans l'échantillon de sang total de lymphocytes T réactifs à la présentation spécifique de l'antigène de *M. tuberculosis*. Cette réponse indique un signal mémoriel sans discrimination temporelle de la primo-infection ni valeur prédictive positive du développement ultérieur d'une tuberculose maladie. En conséquence, les IGRAs ne permettent pas la distinction entre une infection tuberculeuse latente et une tuberculose maladie. Ce test à la spécificité élevée est indiqué dans les cas suivants : (1) pour l'enquête autour d'un cas confirmé ; (2) lors de l'embauche des professionnels à risque d'exposition, dont les professionnels de santé ; (3) pour l'aide à l'orientation diagnostique des formes extrapulmonaires de la tuberculose-maladie ; (4) avant la mise en route d'un traitement par anti-TNF α (*tumor necrosis factor-alpha*) ; (5) chez le patient infecté par le VIH ; (6) chez les enfants migrants de moins de 15 ans [8]. Deux IGRA commerciaux sont disponibles en France : le QuantiFERON-TB Gold in Tube® et le T-SPOT-TB®. Le premier quantifie la production ex vivo d'IFN- γ après stimulation de sang total par les protéines spécifiques de *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP10 et TB7.7) grâce à la technique elisa (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Le deuxième test repose sur l'utilisation de la technique elispot (*enzyme-linked immunosorbent spot*). Il s'agit d'une stimulation par des protéines spécifiques de *M. tuberculosis* (ESAT-6 et CFP10) d'un nombre défini de cellules mononuclées du sang périphériques préalablement purifiées, le nombre de spots mesurés révèle la quantité d'IFN- γ sécrétée à l'échelle cellulaire ce qui suggère une meilleure sensibilité de ce test. Ainsi le T-SPOT-TB® est préférablement utilisé en routine chez les patients immunodéprimés ou avant la mise en route d'un traitement par anti-TNF α . Même si la sensibilité des IGRA est supérieure à celle de l>IDR dans ces contextes, le manque de données

comparant ces deux IGRA suggère de combiner leur résultat en cas d'incertitude [9,10].

Des travaux en cours testent le principe de l'IGRA en réponse à une adhésion de membrane de *M. tuberculosis* nommée HBHA (*heparin-binding haemagglutinin adhesin*), ligand immunogène puissant des lymphocytes T (en particulier des lymphocytes T CD4⁺ disposant d'une fonction cytotoxique) associés à l'immunisation contre la maladie [11]. Les premiers résultats cliniques suggèrent que l'IGRA HBHA serait un test immunologique diagnostique de tuberculose maladie et possiblement pronostique dans la mesure où une forte réactivité à la protéine HBHA serait associée à un contrôle de la maladie [12].

2.1. IFAs et réactivations virales chez le patient immunodéprimé

Le domaine d'application de l'IGRA concerne aussi les virus, notamment dans le contexte de TOS ou de transplantation de CSH. Dans le contexte de la TOS, la prise d'immunosuppresseurs antirejet à vie est responsable d'une dysimmunité cellulaire, parfois aggravée par des facteurs en lien avec la maladie sous-jacente ou des comorbidités associées. Dans le contexte de transplantation de CSH, les traitements immunosuppresseurs sont en théorie stoppés dans des délais variables selon le type d'hémodialyse sous-jacente et les modalités de transplantation. Néanmoins, après une transplantation allogénique de CSH, la présence d'une maladie du greffon contre l'hôte peut nécessiter le maintien d'un traitement immunosuppresseur. Dans ces circonstances, la latence de certains pathogènes endogènes opportunistes ne peut être maintenue en l'état par une immunité cellulaire sous-optimale, avec des conséquences sur le pronostic de la greffe et la survie des receveurs [13,14].

Les principaux virus concernés appartiennent à la famille des *Herpesviridae*, comme le cytomégalovirus (CMV), le virus d'Epstein-Barr (EBV) et le virus de la varicelle-zona (VZV), *herpes virus* humain 6 (HHV-6). La plupart des réactivations virales sont accessibles à des stratégies thérapeutiques prophylactiques et préemptives guidées par le suivi des charges virales sanguines mesurées par *polymerase chain reaction* (PCR). Comme nous l'avons déjà évoqué, la problématique est de disposer d'outils de mesure du seuil immunitaire permettant de prédire le risque de réactivation virale et d'adapter le traitement prophylactique.

2.1.1. IFAs et cymétomégalovirus

Les principales études concernent la détection de réactivation du CMV dont la prévalence atteint 37 % après transplantation allogénique de CSH et 30 % après TOS [15]. L'infection de l'hôte par le CMV est responsable d'une augmentation de la morbi-mortalité en lien avec des effets pathogènes directs (maladie à CMV) et indirects en affectant le greffon via une immunomodulation [13].

Le principe de ces tests repose sur la mesure *ex vivo* de l'immunité cellulaire spécifique anti-CMV après stimulation par des antigènes du virus [16,17]. En dehors de protocoles individuels utilisés dans les laboratoires, il existe deux principaux tests validés par le consensus International du CMV et possédant le certificat de conformité européenne pour le monitoring de l'immunité cellulaire anti-CMV dans les TOS [16–18].

Le premier test appelé QuantiFERON-CMV® (QF-CMV, Cellestis, Qjagen, Melbourne, Australie), est le plus fréquemment utilisé et le plus simple. Il repose sur la quantification d'IFN- γ produit par les lymphocytes T CD8⁺ après stimulation de sang total *ex vivo* par un ensemble d'épitopes de protéines immunogènes du CMV (incluant la gB, l'IE-1, la pp65 et la pp50, qui sont spécifiques des molécules HLA de classe I) préalablement coatés dans un tube de prélèvement standardisé puis quantifiés par un test elisa. Ce test a été évalué dans différentes problématiques liées à la réactivation CMV après TOS telles que : (1) la stratification du risque de réactivation en fonction du test réalisé en pré-greffe chez les receveurs CMV-séropositifs (R+) ; (2) la

prédiction d'une occurrence tardive après arrêt de la prophylaxie en cas de donneur CMV-séropositif et receveur CMV-séronégatif (D +/R-); (3) la mise en évidence d'une protection immunitaire cellulaire spécifique efficace en lien avec des virémies CMV asymptomatiques chez les receveurs D +/R+ ; (4) la prédiction de récurrence de maladie ou virémie à CMV chez les receveurs R+ recevant un traitement préemptif ou une prophylaxie secondaire [19–22]. Ces études montrent l'intérêt de réaliser l'immunomonitoring anti-CMV pour guider la prophylaxie antivirale de manière personnalisée [22].

Le deuxième test nommé T-Track CMV® (Lophius Biosciences GmbH, Regensburg, Allemagne) repose sur un test ELISpot. Il a montré un intérêt similaire, voire supérieur à celui du QF-CMV® en termes de prédiction du risque de réactivation CMV dans la greffe rénale [23–25]. L'inconvénient de ce test est lié à sa technique qui entraîne un coût et un temps de manipulation élevé ainsi que l'absence de seuil de significativité universel.

Les deux tests cités ci-dessus appliqués à une cohorte de 94 receveurs de transplantation allogénique de CSH ont montré une association significative entre une faible production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8⁺ et le risque de réactivation et de maladie à CMV avec des valeurs prédictives positive et négative élevées (83 et 98 % respectivement) [26]. Les auteurs soulignent les avantages techniques pour des résultats similaires en faveur du QF-CMV®. Le QF-CMV® a également été évalué dans plusieurs cohortes pédiatriques d'allogreffes de CSH montrant son intérêt dans l'immunomonitoring de la réactivation CMV et sa récurrence [27].

Face à ces tests, la mesure de la prolifération lymphocytaire T en réponse à un antigène de rappel comme le CMV est largement utilisée dans le contexte de protocole de laboratoire individuel [4,28]. Mais la reproductibilité inter laboratoire de ces tests n'est pas connue du fait d'un manque de standardisation et leur utilisation est plus complexe que celle des IGRA. Le principe de ce test est d'évaluer *ex vivo* la capacité de réponse des lymphocytes T en réponse à une stimulation non spécifique par des mitogènes ou antigènes (viraux ou bactériens) induisant la division cellulaire. Des marqueurs de division cellulaire sont utilisés pour mesurer la capacité de prolifération évaluée en cytométrie de flux. L'alternative au marqueur radioactif de la thymidine tritiée est l'utilisation de l'ester carboxyfluorocéine succinimidyle (CFSE) ou le laser violet, colorants excitables (CellTrace Violet : CTV). Plus récemment, le 5-éthynyl-2'-désoxyuridine (EdU) vient remplacer l'utilisation du 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU) car il permet d'éviter la dénaturation de l'ADN permettant une meilleure reproductibilité et d'améliorer la complexité des protocoles [29].

2.1.2. IFAs et autres réactivations virales de l'immunodéprimé (EBV, BK polyomavirus, VZV)

Par analogie, les IGRA ont été étudiées pour d'autres réactivations virales dans le contexte de TOS ou transplantation de CSH, comme la réactivation EBV et BK polyomavirus (BKPyV). Après la greffe, la réactivation EBV peut induire une lymphoprolifération maligne (répondant à l'abréviation anglophone de PTL, *post-transplant lymphoproliferative disease*) dans moins de 2 % des cas et peut atteindre 20 % dans les cas de forte immunosuppression, ce qui amène à proposer des stratégies de thérapie préemptive via l'administration de l'anticorps monoclonal chimérique spécifique des lymphocytes B anti-CD20⁺ [30]. En dépit du fait que le site de latence à vie de l'EBV soit les lymphocytes B, il est démontré que le contrôle de la réactivation à EBV est sous le contrôle des lymphocytes T cytotoxiques [31]. Ainsi, des travaux ont démontré la possibilité de mesurer la réponse immunitaire cellulaire T EBV-spécifique mais l'application en pratique clinique reste pour l'instant limitée [17]. Par exemple, la technique d'elispot en réponse à des peptides d'EBV (EBNA) combinée à la charge virale EBV permet de guider la prophylaxie anti-infectieuse après TOS et greffe de CSH [32,33]. Quant au BKPyV, responsable de néphropathie et rejet après greffe rénale, les résultats des études préliminaires basées sur la technique elispot (après stimulation par des particules antigéniques du BKPyV)

étaient en faveur d'une élimination du virus en cas de sécrétion d'IFN- γ plus élevée. Ces résultats soulignent l'utilité de ces tests pour guider la gestion des immunosuppresseurs après TOS et diminuer le risque de rejet de greffon [34].

Dans la greffe de CSH, l'intérêt d'un immunomonitoring de l'immunité cellulaire T anti-VZV a été démontré mais il n'existe pas en routine de kit commercial standardisé. Après la greffe de CSH, le déclin immunitaire expose à des complications de la réactivation à VZV, de la névralgie post-zostérienne au zona viscéral disséminé mettant en jeu le pronostic vital. Ex vivo, des tests de prolifération lymphocytaire après stimulation de cellules mononucléées du sang périphérique par le VZV ont montré un intérêt pour la détection d'une restauration de l'immunité cellulaire anti-VZV [35]. Les IGRA (par technique elisa ou elispot) ont eux aussi trouvé leur place dans la détection de l'immunité cellulaire anti-VZV avec une sensibilité similaire et une meilleure faisabilité par rapport aux tests de prolifération lymphocytaires. Ces travaux augurent d'une application potentielle en routine pour guider la durée de la prophylaxie anti-VZV et évaluer l'efficacité de candidats vaccins anti-VZV après greffe de CSH [28,36].

2.2. IFAs et risques infectieux non spécifiques de l'immunodéprimé

De façon similaire, un IGRA appelé QuantiFERON Monitor® (QFM, Qiagen) est utilisé comme biomarqueur prédictif du risque infectieux dans des cohortes d'immunodéprimés. Il repose sur l'évaluation ex vivo de l'immunité non spécifique par la technique elisa de l'IFN- γ sécrété dans le surnageant de culture cellulaire. La stimulation de l'échantillon de sang total est obtenue par des microsphères agrégeant un ligand anti-CD3 induisant une stimulation lymphocytaire T et le ligand R848 induisant une stimulation innée via le *Toll-like receptor* (TLR)-7 et le TLR-8 identifiant des particules virales. Mian et al. a appliqué ce test chez 137 patients greffés d'organe solide (greffe d'origine rénale, hépatique et pulmonaire) alors qu'étaient colligés les épisodes d'infections bactériennes, virales et fongiques [37]. Le résultat principal associait de façon significative le risque de développer une infection (au moins un épisode) à une faible production d'IFN- γ jusqu'à 6 mois après la greffe. Pour une mesure d'IFN- γ ≤ 10 UI/mL, le risque infectieux était multiplié par 2 ou 3, selon le délai après la greffe. De la même manière, chez 44 patients cirrhotiques non greffés et 64 patients greffés cardiaques, il existait un sur-risque infectieux significatif (toute infection confondue) en cas de détection plus faible d'IFN- γ après stimulation [38,39].

Un autre IFA a montré une corrélation entre le risque infectieux et la mesure de l'immunité cellulaire. Ce test, commercialisé sous le nom d'ImmunoKnow assay® (Cylex, Inc.), a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) dans le cadre de la transplantation requérant l'utilisation d'immunosuppresseurs majorant le risque infectieux et impactant le pronostic et la survie. Son principe est d'évaluer la réponse des lymphocytes T CD4⁺ en réponse à un stimulant lymphocytaire non spécifique appelé mitogène (phytohématagglutinine) par la mesure de l'adénosine triphosphate (ATP) produit. L'ATP est la principale source d'énergie cellulaire et est libérée dans les premières heures suivant l'activation des lymphocytes T permettant une évaluation rapide de la fonctionnalité cellulaire. Brièvement, la technique consiste à stimuler du sang total pendant 15 à 18 heures avec de la phytohématagglutinine puis de sélectionner les lymphocytes CD4⁺ et de mesurer l'ATP intracellulaire produit après lyse cellulaire par une technique de bioluminescence (luciférase). Dans une méta-analyse de 504 receveurs de TOS, une réponse diminuée au test ImmunoKnow® (< 25 ng/mL) était associé à un risque infectieux 12 fois plus élevé [40]. Utilisé en pour le suivi immunologique chez 175 greffés pulmonaires, il a permis d'identifier un sous-groupe de receveurs à haut risque infectieux (*odds ratio* 2,81) et un sous-groupe de receveurs colonisés fongiques à risque de développer une infection fongique invasive [41]. Ce test est donc positionné actuellement

comme une aide à la gestion du niveau d'immunosuppression après la greffe.

Les IFAs sont performants dans la mesure fonctionnelle de l'immunité cellulaire. Cependant, l'étude de l'immunité innée après stimulation ex vivo peut également être informative et l'étude de Vallin et al. en fait la démonstration. Cette étude a montré que chez 45 cas de greffe rénale, une diminution de la synthèse du TNF- α par les monocytes (CD14⁺ CD16⁺) en réponse à un peptide de l'EBV était associée à plus de complications infectieuses après la transplantation [42].

3. Évaluation de la réponse vaccinale chez les patients immunodéprimés

Les IFAs représentent également le moyen d'évaluer la réponse vaccinale chez le patient immunodéprimé ou dans le contexte d'immunosénescence. Ces deux catégories incluent des patients de compétence immunitaire très variable. C'est pourquoi, malgré des recommandations vaccinales spécifiques à chaque groupe, il est nécessaire dans les années à venir d'affiner les facteurs associés à l'échec vaccinal, à une moindre réponse vaccinale ainsi que la durabilité de la réponse vaccinale [43]. Historiquement, le marqueur de réponse vaccinale est la sérologie mais elle ne permet pas d'évaluer la mémoire à long terme et le titre d'anticorps peut être mésestimé par la supplémentation en dérivés de produits sanguins comme les perfusions d'immunoglobulines polyvalentes ou spécifiques. Le principe des IFAs dans ce domaine repose sur l'utilisation d'antigène de rappel appartenant à la souche vaccinale mise en contact avec tout ou partie des effecteurs cellulaires immunitaires. L'évaluation de la réponse immunitaire fonctionnelle en réponse à l'antigène vaccinal dépend de la nature du vaccin. Les antigènes de type protéiques (vaccins vivants, inactivés, toxoïdes ou des sous-unités du virus de l'hépatite B, coqueluche et grippe) induisent une réponse cellulaire B dépendante des lymphocytes T grâce à une coopération active des lymphocytes T-helper (CD4⁺) produisant des anticorps de forte affinité et une mémoire vaccinale prolongée. Inversement, les antigènes de type polysaccharidiques ou glyco conjugués (pneumocoque, méningocoque et *Haemophilus influenzae*) engendrent une réponse lymphocytaire B T-indépendante avec une production d'anticorps spécifiques rapide mais transitoire, de faible affinité et n'induisant peu ou pas de mémoire immunitaire [44].

3.1. IFAs et réponse vaccinale T-dépendante

Pour évaluer la réponse vaccinale cellulaire T-dépendante, les principaux IFAs utilisés sont le test de prolifération lymphocytaire T et la détection de cytokines de type Th1 (principalement l'IFN- γ) après stimulation par l'antigène de rappel ex vivo. L'intérêt de ces tests est donc de mesurer l'efficacité de la réponse vaccinale non humorale en cas d'immunosuppression. En effet, l'activité lymphocytaire T a un rôle direct dans la clairance virale d'un virus tel. que la grippe, via la libération de cytokines par les lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺), l'activation Fas-FasL liée au programme de mort cellulaire et la potentialisation de l'effet cytotoxique cellulaire et de l'immunité humorale par les lymphocytes T-helper (CD4⁺) [45].

Il s'agit donc d'utiliser des tests similaires à ceux cités précédemment : mesure de cytokines par test elisa ou elispot [4]. La technique ELISpot est la plus utilisée en laboratoire de recherche, elle permet de quantifier avec une grande sensibilité le nombre de cellules sécrétrices d'IFN- γ (cellules mémoires et effectrices T) après leur stimulation avec un antigène viral. Des données sont néanmoins disponibles sur la protection vaccinale antigrippale chez des personnes âgées [46]. Dans une autre étude d'Avetisyan et al., la réponse à un antigène grippal a été mesurée chez des patients transplantés de CSH en comparaison à des volontaires sains par un test ELISpot effectué 4 semaines après la vaccination. La réponse IFN- γ générées par les lymphocytes T CD8⁺

était significativement augmentée dans les deux groupes, tandis que le taux d'anticorps au seuil de protection contre le sérotype H1N1 de la grippe n'était observé que chez 29 % des receveurs de transplantation [47].

Quant aux tests de prolifération lymphocytaire, les protocoles utilisent de manière similaire un antigène de rappel vaccinal (diphthérie, ténanos, etc.). Après purification, les cellules mononuclées du sang périphérique sont stimulées *in vitro* par l'antigène de rappel pendant plusieurs jours. C'est la division cellulaire qui est mesurée après l'application d'un marqueur en cytométrie de flux. Une différentielle de la capacité d'opsonophagocytation des anticorps spécifiques de l'antigène polysaccharidique. Il a été décrit en 1997 par Romero-Steiner et al. pour mesurer la fonctionnalité des anticorps anti-pneumococques [48]. Il est utilisé comme corrélat de protection par mesure *in vitro* des capacités fonctionnelles des anticorps produits grâce à la vaccination. C'est un outil de sélection de vaccin pertinent par la mesure des anticorps vaccinaux induits capables d'activer la voie du complément et par conséquent la destruction du pathogène par opsonophagocytation [49]. Par exemple pour le vaccin anti-pneumococque, il permet d'évaluer l'immunogénicité de chaque polysaccharide présent dans la préparation vaccinale permettant d'optimiser l'immunogénicité vaccinale [50]. Nived et al. ont mesuré la réponse vaccinale anti-pneumococque au vaccin conjugué 13-valent du pneumocoque par la technique d'opsonophagocytation chez 49 patients atteints de vascularite systémique traités par immunosuppresseur et/ou corticoïdes [51]. La réponse vaccinale était diminuée significativement chez les patients recevant du cyclophosphamide, de l'azathioprine ou du méthotrexate par comparaison aux patients recevant seulement des corticoïdes. Cela souligne l'importance d'administrer les vaccins polysaccharidiques aux patients atteints de maladie systémique préalablement à l'introduction des immunosuppresseurs.

3.2. IFAs et réponse vaccinale T-indépendante

Pour évaluer la réponse cellulaire B T-indépendante, il existe des tests ELISpot B mais ils sont peu utilisés du fait de difficultés techniques liées à la faible fréquence des lymphocytes B spécifiques. L'autre test permettant d'observer l'efficacité de ce type de vaccin est l'évaluation de la capacité d'opsonophagocytation des anticorps spécifiques de l'antigène polysaccharidique. Il a été décrit en 1997 par Romero-Steiner et al. pour mesurer la fonctionnalité des anticorps anti-pneumococques [48]. Il est utilisé comme corrélat de protection par mesure *in vitro* des capacités fonctionnelles des anticorps produits grâce à la vaccination. C'est un outil de sélection de vaccin pertinent par la mesure des anticorps vaccinaux induits capables d'activer la voie du complément et par conséquent la destruction du pathogène par opsonophagocytation [49]. Par exemple pour le vaccin anti-pneumococque, il permet d'évaluer l'immunogénicité de chaque polysaccharide présent dans la préparation vaccinale permettant d'optimiser l'immunogénicité vaccinale [50]. Nived et al. ont mesuré la réponse vaccinale anti-pneumococque au vaccin conjugué 13-valent du pneumocoque par la technique d'opsonophagocytation chez 49 patients atteints de vascularite systémique traités par immunosuppresseur et/ou corticoïdes [51]. La réponse vaccinale était diminuée significativement chez les patients recevant du cyclophosphamide, de l'azathioprine ou du méthotrexate par comparaison aux patients recevant seulement des corticoïdes. Cela souligne l'importance d'administrer les vaccins polysaccharidiques aux patients atteints de maladie systémique préalablement à l'introduction des immunosuppresseurs.

3.3. Utilisation en routine des IFAs et perspectives

En raison de leur complexité, du coût et du temps technique requis, les IFAs ne peuvent être qu'une alternative de deuxième ligne aux tests immunitaires conventionnels de routine. Néanmoins, en s'appuyant sur les résultats cités ci-dessus, nous soulignons que l'IFA ne peut être substituée par un marqueur traditionnel.

Dans la pratique clinique, certains centres élaborent des protocoles utilisant ces tests en routine notamment pour évaluer la réponse au calendrier vaccinal post-transplantation de CSH ou dans le cadre des déficits immunitaires primitifs. Dans ces cas, l'enjeu est double. D'une part, il est nécessaire d'évaluer la capacité fonctionnelle du système immunitaire à répondre à une stimulation antigénique permettant de valider le bon timing vaccinal; d'autre part il est nécessaire de vérifier le niveau de protection vaccinale. C'est ce que propose le Centre de référence des déficits immunitaires héréditaires (Ceredih) chez des enfants receveur de greffe allogénique de CSH dans le cadre d'un déficit immunitaire primitif. De la même manière, le Haut conseil de santé publique (HCSP) recommande de réaliser un test de prolifération lymphocytaire en réponse à une stimulation non spécifique (mitogène) *ex vivo* avant l'injection de vaccin vivant atténué dans le syndrome de

Di George (déficit immunitaire primitif) responsable d'une lymphopénie dont la sévérité expose à des effets secondaires de ces vaccins. Cependant, ce test ne préjuge pas de la protection vaccinale induite [43].

Certaines limites sont importantes à mentionner : les études récentes soulignent une variabilité inter- et intra-individuelle notable dépendante de critères démographiques (âge, sexe, état métabolique ou inflammation chronique) et socio économiques constituant un nouveau défi pour les essais de réponse vaccinale et de développement de vaccins. Ainsi le concept d'immunologie des systèmes s'applique de la même manière à la « vaccinologie des systèmes » qui a été développée par Pulendran et al [52]. Cette approche utilise des « omics », c'est-à-dire un ensemble d'outils générant une quantité massive de données composites afférentes à la protéomique, la transcriptomique ou la génomique dont l'analyse *in silico* aura pour but d'identifier des marqueurs prédictifs de la réponse immune innée ou adaptative post-vaccinale [52,53]. La première application de cette approche a permis d'identifier une signature précoce permettant de prédire l'amplitude de la réponse T CD8⁺ au vaccin de la fièvre jaune [54]. Une autre approche s'intéressait à prédire la réponse vaccinale en fonction de la voie d'injection du vaccin (sous-cutanée, intradermique ou intramusculaire) par le biais d'une signature de gène de l'immunité innée corrélée à la qualité de la réponse lymphocytaire cytotoxique (CD8⁺) [53]. Les IFAs ont leur place dans ce type d'approche et c'est une équipe de recherche de l'Institut Pasteur qui a récemment développé un IFA standardisé dont les domaines d'application en immunologie clinique sont larges incluant celui de la vaccination [6]. Il s'agit d'une étude de la variance immunologique de l'être humain appelé « Milieu intérieur » qui définit une gamme de réponse immunitaire « normale » en réponse à une stimulation *ex vivo* par l'évaluation d'une signature moléculaire [55].

4. IFAs : outils d'évaluation des thérapies immunosuppressives

En dehors du contexte de la vaccination, les IFAs ont leur place dans la gestion des thérapies tels que les immunosuppresseurs à visée antirejet dans le contexte de la TOS. Le rejet de greffe est secondaire au développement d'une réponse cellulaire immunitaire du donneur vis-à-vis du greffon allogénique ; les antirejets sont donc des immunosuppresseurs diminuant cette réponse immunitaire cellulaire. La gestion des antirejets repose sur le dosage du taux sanguin de la molécule.

Le test ImmunoKnow assay® (Cylex, Inc.) cité précédemment dans l'évaluation du risque infectieux en post-greffe a aussi montré un intérêt dans l'évaluation du risque de rejet de greffe. Avant une greffe rénale, une augmentation du taux d'ATP intracellulaire des lymphocytes T CD4⁺ était associée à un risque relatif (RR) de rejet de greffe de 1,2 et lorsque le taux augmentait entre les phases pré- et post-greffe, ce risque était majoré (RR = 15,4) [56]. Dans une autre étude portant sur 126 cas de greffe rénale, un taux élevé d'ATP avant la greffe était associé à des signes histologiques de rejet de greffe cellulaire et des dysfonctions du greffon et ceux présentant un rejet cellulaire aigu étaient associés à un taux d'ATP augmenté après la greffe [57]. Dans la méta-analyse de Kowalski et al. citée ci-dessus, un taux élevé d'ATP intracellulaire > supérieur à 700 ng/mL était associé à un risque de rejet cellulaire (RR = 30). Ainsi, ce test présente un intérêt dans l'immunomonitoring de TOS pour l'évaluation du risque infectieux et celui du rejet afin d'aider à la gestion des immunosuppresseurs et la prédiction des complications.

St Pierre et al. ont exposé un concept d'évaluation de l'impact des thérapies immunosuppressives sur le système immunitaire dans le contexte des désordres immunitaires. Ils ont développé une plateforme de tests immunitaires fonctionnels permettant d'évaluer l'impact qualitatif et quantitatif des modulateurs pharmacologiques au profit de la prédiction de l'efficacité thérapeutique et risques notamment infectieux [58]. Les IFAs utilisés en réponse à chaque

immunomodulateur sont les tests mesurant la prolifération lymphocytaire, la fonction des cellules *naturalkiller*, la capacité de phagocytose et la réponse des TLR à des stimulants. De manière similaire, les IFAs sont utilisés pour l'évaluation thérapeutique des immunothérapies du traitement des cancers par la mesure de la réponse spécifique cellulaire T antitumorale [59,60].

5. Conclusion

Le développement de stratégies d'immunomonitoring « à la carte » associées aux traitements des maladies de système, des déficits immunitaires héréditaires, en oncologie avec l'émergence de l'immunothérapie active ou en médecine de transplantation est l'avenir. Dans cette revue, nous montrons que les IFAs permettent d'obtenir une approche fonctionnelle via l'immunomonitoring de la réponse au traitement, de prédire un risque infectieux et d'évaluer la réponse vaccinale dans certaines populations de patients immunodéprimés. La limite de ces approches est la prise en compte de la variance immunitaire générant un certain nombre de contraintes technologiques, méthodologiques de standardisation et d'interprétation qu'il conviendra de maîtriser. Pour les patients, l'accès à l'immunomonitoring est l'ouverture vers une médecine personnalisée.

Déclaration de liens d'intérêts

Aucun.

Remerciements

Nous remercions le département de Recherche clinique et innovations des Hospices civils de Lyon et les membres du laboratoire commun de recherche Hospices civils de Lyon-bioMérieux pour leur soutien et encouragement.

Contribution des auteurs

MB a contribué à la conception, au recueil des références et à l'écriture du manuscrit et à sa révision. CAV et WM ont contribué à l'élaboration de la base de données, à la relecture et la révision. ID, KBP et FV ont contribué à la relecture. STA et FA ont contribué à l'élaboration du manuscrit et la relecture.

Tous les auteurs ont lu et approuvé la version finale du manuscrit.

Références

- [1] Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol* 2017;17:21–9.
- [2] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454:428–35.
- [3] Murphy K, Weaver C. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science; 2016.
- [4] Lindemann M. Ex vivo assessment of cellular immune function - applications in patient care and clinical studies. *Tissue Antigens* 2014;84:439–49.
- [5] Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000;356:1099–104.
- [6] Duffy D. Standardized immunomonitoring: separating the signals from the noise. *Trends Biotechnol* 2018;36:1107–15.
- [7] Feldman AM. Bench-to bedside; clinical and translational research; personalized medicine; precision medicine-what's in a name? *Clin Transl Sci* 2015;8:171–3.
- [8] Haute Autorité de Santé. Tests in vitro de dépistage de l'infection tuberculeuse latente par détection de production d'interféron gamma. https://www.has-sante.fr/jcms/c_2021762/fr/tests-in-vitro-de-depistage-de-l-infection-tuberculeuse-latente-par-detection-de-production-d-interferon-gamma. [Accès au site le 27 août 2019].
- [9] Bocchino M, Matarese A, Bellofiore B, Giacomelli P, Santoro G, Balato N, et al. Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27:907–13.
- [10] Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K, et al. Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection - United States, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010;59:1–25.
- [11] Aerts L, Selis E, Corbière V, Smits K, Praet AV, Dauby N, et al. HBHA-induced polycytotoxic CD4+ T lymphocytes are associated with the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection in humans. *J Immunol* 2019;202:421–7.
- [12] Sali M, Buonsenso D, D'Alfonso P, de Maio F, Ceccarelli M, Battah B, et al. Combined use of quantiferon and HBHA-based IGRA supports tuberculosis diagnosis and therapy management in children. *J Infect* 2018;77:526–33.
- [13] Torre-Cisneros J, Aguado JM, Caston JJ, Almenar L, Alonso A, Cantisán S, et al. Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: SET/GESITRA-SEIMC/REIP recommendations. *Transplant Rev* 2016;30:119–43.
- [14] Ljungman P. CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008;42:S70–2.
- [15] Styczynski J. Who is the patient at risk of CMV recurrence: a review of the current scientific evidence with a focus on hematopoietic cell transplantation. *Infect Dis Ther* 2018;7:1–16.
- [16] Han SH. Immunological prediction of cytomegalovirus (CMV) replication risk in solid organ transplantation recipients: approaches for regulating the targeted anti-CMV prevention strategies. *Infect Chemother* 2017;49:161–75.
- [17] Fernández-Ruiz M, Kumar D, Humar A. Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clin Transl Immunology* 2014;3:e12.
- [18] Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2013;96:333–60.
- [19] Manuel O, Husain S, Kumar D, Zayas C, Mawhorter S, Levi ME, et al. Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin Infect Dis* 2013;56:817–24.
- [20] Cantisán S, Lara R, Montejó M, Redel J, Rodríguez-Benot A, Gutiérrez-Aroca J, et al. Pretransplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8+ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am J Transplant* 2013;13:738–45.
- [21] Kumar D, Chernenko S, Moussa G, Cobos I, Manuel O, Preiksaitis J, et al. Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9:1214–22.
- [22] Kumar D, Mian M, Singer L, Humar A. An interventional study using cell-mediated immunity to personalize therapy for cytomegalovirus infection after transplantation. *Am J Transplant* 2017;17:2468–73.
- [23] Abate D, Saldan A, Mengoli C, Fison M, Silvestre C, Fallico L, et al. Comparison of cytomegalovirus (CMV) enzyme-linked immunosorbent spot and CMV quantiferon gamma interferon-releasing assays in assessing risk of CMV infection in kidney transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2013;51:2501–7.
- [24] Lee H, Park KH, Ryu JH, Choi A-R, Yu JH, Lim J, et al. Cytomegalovirus (CMV) immune monitoring with ELISPOT and quantiferon-CMV assay in seropositive kidney transplant recipients. *PLoS One* 2017;12:e0189488.
- [25] Ruan Y, Guo W, Liang S, Xu Z, Niu T. Diagnostic performance of cytomegalovirus (CMV) immune monitoring with ELISPOT and quantiferon-CMV assay in kidney transplantation: a PRISMA-compliant article. *Medicine* 2019;98:e15228.
- [26] Yong MK, Cameron PU, Slavin M, Morrissey CO, Bergin K, Spencer A, et al. Identifying cytomegalovirus complications using the quantiferon-CMV assay after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Dis* 2017;215:1684–94.
- [27] Pauri B, Soldatou A, Petrakou E, Theodosaki M, Tsentidis C, Kaisari K, et al. Quantiferon-cytomegalovirus assay: a potentially useful tool in the evaluation of CMV-specific CD8+ T-cell reconstitution in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Pediatr Transplant* 2018;22:e13220.
- [28] Merindol N, Salem Fourati I, Brito R-M, Grenier A-J, Charrier E, Cordeiro P, et al. Reconstitution of protective immune responses against cytomegalovirus and varicella zoster virus does not require disease development in pediatric recipients of umbilical cord blood transplantation. *J Immunol* 2012;189:5016–28.
- [29] Pouljot F, Monneret G, Friggeri A, Rimmelé T, Malcus C, Poitevin-Later F, et al. Flow cytometric evaluation of lymphocyte transformation test based on 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation as a clinical alternative to tritiated thymidine uptake measurement. *J Immunol Methods* 2014;415:71–9.
- [30] Allen UD, Preiksaitis JK, AST Infectious Diseases Community of Practice. Post-transplant lymphoproliferative disorders, Epstein-Barr virus infection, and disease in solid organ transplantation: guidelines from the American society of transplantation infectious diseases community of practice. *Clin Transplant* 2019:e13652.
- [31] Cohen JL. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000;343:481–92.
- [32] Calarota SA, Chiesa A, Zelini P, Comolli G, Minoli L, Baldanti F. Detection of Epstein-Barr virus-specific memory CD4+ T cells using a peptide-based cultured enzyme-linked immunospot assay. *Immunology* 2013;139:533–44.
- [33] D'Aveni M, Aïssi-Rothé L, Venard V, Salmon A, Falenga A, Decot V, et al. The clinical value of concomitant Epstein Barr virus (EBV)-DNA load and specific immune reconstitution monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol* 2011;24:224–32.
- [34] Schachtner T, Müller K, Stein M, Diezemann C, Seifried A, Babel N, et al. BK virus-specific immunity kinetics: a predictor of recovery from polyomavirus BK-associated nephropathy. *Am J Transplant* 2011;11:2443–52.
- [35] Ljungman P, Lonnqvist B, Gahrton G, Ringden O, Sundqvist VA, Wahren B. Clinical and subclinical reactivations of varicella-zoster virus in immunocompromised patients. *J Infect Dis* 1986;153:840–7.
- [36] Distler E, Schnurer E, Wagner E, von Auer C, Plachter B, Wehler D, et al. Recovery of varicella-zoster virus-specific T cell immunity after T cell-depleted allogeneic transplantation requires symptomatic virus reactivation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:1417–24.
- [37] Mian M, Natori Y, Ferreira V, Selzner N, Husain S, Singer L, et al. Evaluation of a novel global immunity assay to predict infection in organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2018;66:1392–7.

- [38] Sood S, Yu L, Visvanathan K, Angus PW, Gow PJ, Testro AG. Immune function biomarker quantiferon-monitor is associated with infection risk in cirrhotic patients. *World J Hepatol* 2016;8:1569–75.
- [39] Potena L, Righini L, Manfredini V, Borgese L, Sgreccia D, Chierighin A, et al. Quantiferon monitor: a novel assay for prediction of infectious risk in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2016;35:S106.
- [40] Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, Sebastian A, Wright HI, Sigle G, et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation* 2006;82:663–8.
- [41] Husain S, Raza K, Pilewski JM, Zaltonis D, Crespo M, Toyoda Y, et al. Experience with immune monitoring in lung transplant recipients: correlation of low immune function with infection. *Transplantation* 2009;87:1852–7.
- [42] Vallin P, Désy O, Béland S, Bouchard-Boivin F, Houde I, de Serres SA. Impaired secretion of TNF- α by monocytes stimulated with EBV peptides associates with infectious complications after kidney transplantation. *Transplantation* 2018;102:1005–13.
- [43] Haut Conseil de la Santé Publique. Vaccination des personnes immunodéprimées ou aspléniques. <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=504..> [Accès au site le 16 mai 2018].
- [44] Siegrist CA. Vaccine immunology. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P, editors. *Vaccines* 6th ed. Elsevier; 2013. p. 14–32.
- [45] Coughlan L, Lambe T. Measuring cellular immunity to influenza: methods of detection, applications and challenges. *Vaccines* 2015;3:293–319.
- [46] McElhanev JE, Kuchel GA, Zhou X, Swain SL, Haynes L. T-cell immunity to influenza in older adults: a pathophysiological framework for development of more effective vaccines. *Front Immunol* 2016;7:41.
- [47] Avetisyan G, Aschan J, Hassan M, Ljungman P. Evaluation of immune responses to seasonal influenza vaccination in healthy volunteers and in patients after stem cell transplantation. *Transplantation* 2008;86:257–63.
- [48] Romero-Steiner S, Frasch CE, Carlone G, Fleck RA, Goldblatt D, Nahm MH. Use of opsonophagocytosis for serological evaluation of pneumococcal vaccines. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:165–9.
- [49] Dwyer M, Gadjeva M. Opsonophagocytic assay. *Methods Mol Biol* 2014;1100:373–9.
- [50] Soininen A, Karpala M, Wahlman S-L, Lehtonen H, Käyhty H. Specificities and opsonophagocytic activities of antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides in sera of unimmunized young children. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1032–8.
- [51] Nived P, Nagel J, Saxne T, Geborek P, Jönsson G, Skattum L, et al. Immune response to pneumococcal conjugate vaccine in patients with systemic vasculitis receiving standard of care therapy. *Vaccine* 2017;35:3639–46.
- [52] Pulendran B. Systems vaccinology: probing humanity's diverse immune systems with vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:12300–6.
- [53] Gonçalves E, Bonduelle O, Soria A, Loulergue P, Rousseau A, Cachanado M, et al. Innate gene signature distinguishes humoral versus cytotoxic responses to influenza vaccination. *J Clin Invest* 2019;129:1960–71.
- [54] Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol* 2009;10:116–25.
- [55] Urrutia A, Duffy D, Rouilly V, Posseme C, Djebali R, Illanes G, et al. Standardized whole-blood transcriptional profiling enables the deconvolution of complex induced immune responses. *Cell Rep* 2016;16:2777–91.
- [56] Cadillo-Chávez R, de Echegaray S, Santiago-Delpín EA, Rodríguez-Trinidad AT, Camacho-Carrazo B, Alfaro T, et al. Assessing the risk of infection and rejection in hispanic renal transplant recipients by means of an adenosine triphosphate release assay. *Transplant Proc* 2006;38:918–20.
- [57] Reinsmoen NL, Cornett KMM, Kloehn R, Burnette AD, McHugh L, Flewellen BK, et al. Pretransplant donor-specific and non-specific immune parameters associated with early acute rejection. *Transplantation* 2008;85:462–70.
- [58] St Pierre C, Guo J, Shin JD, Engstrom LW, Lee H-H, Herbert A, et al. A human tissue-based functional assay platform to evaluate the immune function impact of small molecule inhibitors that target the immune system. *PLoS One* 2017;12:e0180870.
- [59] Lyerly HK. Quantitating cellular immune responses to cancer vaccines. *Semin Oncol* 2003;30:9–16.
- [60] Macchia I, Urbani F, Proietti E. Immune monitoring in cancer vaccine clinical trials: critical issues of functional flow cytometry-based assays. *Biomed Res Int* 2013;2013:726239.

Problématique

PROBLEMATIQUE

Comme souligné dans la partie introduction, les personnes immunodéprimées représentent une population hétérogène en raison des origines diverses de la source d'immunodépression et de l'importante variabilité interindividuelle. L'une des problématiques communes aux personnes immunodéprimées est l'importante morbi-mortalité liée aux infections communautaires, nosocomiales ou opportunistes. Sur le versant infectieux, l'apparition croissante de germes antibiorésistants suggère un usage non adapté des prophylaxies anti-infectieuses. Sur le versant immunitaire les outils de mesure quantitatifs ou phénotypiques permettant d'apprécier le degré d'immunodépression ont montré certaines limites, démontrant le besoin d'utiliser des tests fiables reflétant le statut fonctionnel de la réponse immunitaire afin d'optimiser les prophylaxies anti-infectieuses.

Les tests de fonctions immunitaires sont des outils de monitoring de la réponse de l'hôte. Informatifs sur la fonction des cellules, ils permettent notamment d'appréhender les altérations immunitaires, l'une des caractéristiques de l'état d'immunodépression. L'état de l'art concernant l'application des tests de fonctionnalité immunitaire dans le suivi immunologique des déficits immunitaires secondaires a été résumé dans la revue **"Place des tests immunitaires fonctionnels dans la prise en charge du risque infectieux et de la gestion des thérapies immunosuppressives chez les patients immunodéprimés non-VIH"**, publiée en 2020 dans « La revue de médecine interne ». Cette revue a permis de mettre en avant l'intérêt de la mesure de la fonction immunitaire dans des populations immunodéprimées via une approche d'immunomonitoring fonctionnelle dans i) la prédiction du risque infectieux, ii) la réponse au traitement et iii) l'évaluation de la réponse vaccinale.

Cependant, étant donné l'hétérogénéité des altérations immunitaires au sein des populations immunodéprimées, cette revue soulève le besoin d'un outil standardisé et reproductible minimisant la variabilité technique et limitant la complexité de l'interprétation, afin d'être capable d'évaluer la fonction immunitaire. Une première étude du consortium *Milieu Intérieur* avait révélé le potentiel de l'utilisation des tubes Trucultures® pour évaluer de manière reproductible les réponses immunitaires innées ou adaptatives induites après une stimulation sur sang total chez une population saine.

Nous avons réalisé une étude distincte à partir d'une cohorte indépendante de volontaires sains, puis nous avons comparé nos données transcriptomiques et protéiques obtenues post stimulations en tubes Truculture® avec les données publiques de cette première étude. Une forte corrélation a été mise en évidence, validant ainsi la reproductibilité de la méthode. Ces résultats font l'objet de l'article « **Towards standardisation of immunofunctional assays** », publié dans « Clinical Immunology », en 2019.

Par la suite, nous avons utilisé cette même approche dans une population de patients immunodéprimés receveurs d'une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (allo-CSH). L'objectif était de faire un état des lieux de la reconstitution immunitaire par analyse transcriptomique afin de décrire précisément la fonctionnalité des cellules immunitaires innées et adaptatives à la période charnière de 6 mois post greffe.

Dans cette étude preuve de concept, nous avons également tenté d'identifier des profils immunitaires spécifiques associés à la qualité de la reconstitution immunitaire et/ou à la survenue de complications infectieuses. Cette étude associant données transcriptomiques, données biologiques et informations cliniques fait l'objet d'un article en préparation intitulé " **Transcriptomic analysis reveals distinct profiles of functional immune reconstitution at six-months after allo-HSCT** ".

En plus de l'intérêt de ces tests de fonctions immunitaires pour la mise en évidence d'altérations fonctionnelles non-spécifiques, ils sont également très utiles dans le domaine de l'infectiologie en quantifiant la réponse immunitaire spécifique d'un microorganisme par stimulation avec un agent immunogène précis. Chez les personnes immunodéprimées comme dans le cadre de l'allogreffe, le risque infectieux est l'une des complications majeures. Disposer d'outils permettant d'apprécier la réponse immunitaire fonctionnelle, étroitement liées au risque infectieux, permettrait ainsi d'optimiser la prise en charge des patients en adaptant les prophylaxies ou en évaluant l'efficacité vaccinale. C'est notamment le cas pour le Varicella-Zoster virus (VZV), qui en cas de réactivation, peut induire des complications potentiellement fatales chez les personnes immunodéprimées et pour lesquels une surveillance de la mémoire immunitaire individuelle est nécessaire.

Afin de répondre à cet objectif, nous avons évalué par trois méthodes différentes le statut fonctionnel de l'immunité à médiation cellulaire spécifique au VZV de patients post allogreffe de CSH.

Cette étude combine les comparaisons des données générées par les différentes méthodes et leur corrélation avec les numérations cellulaires, les données sérologiques et les données cliniques. Ces résultats ont fait l'objet de l'article "**A cross-sectional study of varicella zoster virus (VZV) specific cell-mediated immunity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation to enhance prevention of VZV reactivation**", en cours de révision dans la revue scientifique « *Frontiers in immunology* ».

Ces dernières investigations nous ont permis de mettre en évidence que l'étude de la mémoire spécifique cellulaire vis-à-vis d'un agent pathogène pouvait apporter une plus-value par rapport aux données sérologiques. Le contexte de la pandémie à la COVID-19 nous a poussé également à poser cette question pour le SARS-CoV-2.

De manière similaire au VZV, la fonction des lymphocytes T spécifiques du SARS-CoV-2 est un facteur clé du contrôle de l'infection et de l'intégrité des patients. La mesure de la réponse cellulaire au SARS-CoV-2, en complément des mesures sérologiques, apparaît nécessaire dans l'évaluation de la mémoire immunitaire individuelle post infection et/ou vaccination. Dans cette étude, nous avons tenté de répondre à cette problématique en mettant au point un test de la fonction immunitaire semi-automatisé. Ce test est basé sur la mesure de la libération d'interféron gamma IFN- γ (IGRA, de l'anglais *interferon gamma release assay*) après une stimulation sur sang total de différentes cibles protéiques du SARS-CoV-2.

Ces recherches évaluent la spécificité, décrivent les différents niveaux de sécrétions d'IFN- γ et comparent les données de fonctionnalité immunitaire aux données sérologiques. Les résultats obtenus ont fait l'objet de la publication "**Specific detection of memory T-cells in COVID-19 patients using standardized whole-blood Interferon gamma release assay**" publiée en 2021 dans la revue scientifique « *European Journal of Immunology* ».

Travaux Personnels

TRAVAUX PERSONNELS

1. PREMIERE PUBLICATION : Towards standardization of Immune function

Afin de pouvoir évaluer la fonctionnalité du système immunitaire, des outils reproductibles et standardisés sont nécessaires. Les méthodes classiques de stimulation en PBMC utilisées telles que les tests de prolifération lymphocytaire ou de mesure de sécrétion de cytokines ayant montré de nombreuses limites. Des études du consortium Milieu intérieur (Institut Pasteur) ont permis d'évaluer un système de stimulation sur sang total standardisé nommé TruCulture®, dans une cohorte de volontaires sains. Ces études ont permis d'identifier une signature de 44 transcripts « *capable de saisir la diversité des réponses immunitaires complexes* » (284) de « *fournir des valeurs de référence pour des cytokines et chimiokines induites par une large gamme de stimulants innés et adaptatifs* » (285).

Après une réanalyse interne des données publiques issues de l'étude fonctionnelle du consortium *Milieu Intérieur* (285), le lipopolysaccharide (LPS) et l'entérotoxine B *staphylococcique* (SEB) ont été sélectionnés comme étant les deux stimulants modulant le plus grand nombre de cytokines et, de surcroit, de manière complémentaire en terme de sécrétion. Le LPS est un composant de la membrane externe des bactéries Gram négatif et un ligand spécifique du TLR-4 (de l'anglais *Toll Like Receptor*), récepteur membranaire exprimé sur différentes cellules de l'immunité innée comme les macrophages ou les cellules dendritiques. L'interaction LPS/TLR-4 induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires ainsi que la maturation fonctionnelle des cellules présentatrices d'antigènes du système immunitaire inné. Le SEB quant à lui est une entérotoxine produite par la bactérie gram-positif *Staphylococcus aureus* ayant des propriétés superantigéniques. Le SEB se lie simultanément sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimé sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et sur le récepteur membranaire des lymphocytes T (TCR de l'anglais *T cell receptor*). Cette double liaison va ainsi induire une régulation à la hausse des marqueurs d'activation et la prolifération des lymphocytes, acteurs principaux de la réponse immunitaire adaptative, ainsi qu'une libération massive de cytokines pro-inflammatoires. L'utilisation de ces deux stimulants permet donc d'évaluer la réponse immunitaire globale à travers l'activation des pans inné et adaptatif.

Au cours de cette étude, à l'aide d'une cohorte indépendante de 20 volontaires sains, nous avons évalué la reproductibilité et la robustesse de cette méthode sur l'ensemble du processus, de la stimulation du sang total dans les tubes Trucultures® à l'analyse de la réponse des 44 transcrits. En parallèle, nous avons également mesuré la sécrétion de la protéine IFN γ post stimulation avec le SEB, cytokine classiquement mesurée dans les tests de fonction immunitaire, notamment pour le diagnostic de la tuberculose (TB) en clinique (TB-IGRA pour *Interferon-gamma release assay*). Enfin, une évaluation de la corrélation entre l'expression du gène (*IFNG*) et la sécrétion de la protéine qui lui est associée (IFN γ) a été réalisée.

Les résultats obtenus mettent en évidence une très grande reproductibilité de la méthode, pourtant évaluée sur deux cohortes complètement indépendantes, suggérant ainsi que ce système standardisé permet de restreindre la variabilité provenant des stimulants (LPS ou SEB) et d'étudier dans un environnement plus contrôlé la réponse immunitaire.

Cette étude démontre que des méthodes standardisées pour l'évaluation de la fonction immunitaire existent et pourraient être mises en œuvre dans des recherches à plus grande échelle. Ceci suggère également que ce système standardisé pourrait être un outil pertinent afin de révéler le dysfonctionnement de l'immunité innée et adaptative chez des patients souffrant de troubles liés à l'immunité.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de l'article « **Towards standardization of Immune Functional Assays** », publié en 2019 dans la revue scientifique « *Clinical Immunology* ».

Publication

Towards standardization of Immune Functional Assays

William Mouton* ; Chloé Albert Vega* ; Mathilde Boccard ; François Bartolo ;
Guy Oriol ; Jonathan Lopez ; Alexandre Pachot ; Julien Textoris ; François Mallet ;
Karen Brengel-Pesce ; Sophie Trouillet-Assant

*Equally contributed to this work

2019

Published in Clinical Immunology: [10.1016/j.clim.2019.108312](https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.108312)



Brief Communication

Towards standardization of immune functional assays

William Mouton^{a,b,c,1,*}, Chloé Albert-Vega^{a,b,1}, Mathilde Boccard^a, François Bartolo^{a,d},
Guy Oriol^{a,b}, Jonathan Lopez^{e,h,i}, Alexandre Pachot^b, Julien Textoris^{f,g}, François Mallet^{a,b,f},
Karen Brengel-Pesce^{a,b}, Sophie Trouillet-Assant^{a,c}

^a Joint Research Unit Hospices Civils de Lyon-bioMérieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon Sud Hospital, Pierre-Bénite, France

^b Open Innovation & Partnerships (OIP), bioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, France

^c Virologie et Pathologie Humaine - Virpath Team, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, France

^d Soladis, Lyon, France

^e Hospices Civils de Lyon, Plateforme de Recherche de Transfert en Oncologie, Department of Biochemistry and Molecular biology, Lyon Sud Hospital, Pierre-Bénite, France.

^f Joint Research Unit Hospices Civils de Lyon-bioMérieux, EA 7426 Pathophysiology of Injury-Induced Immunosuppression, PI3, Claude Bernard Lyon 1 University, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France.

^g Hospices Civils de Lyon, Department of Anesthesia and Critical Care Medicine, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France.

^h Université de Lyon, Claude Bernard Lyon 1 University, Faculté de Médecine Lyon Est, Lyon, France.

ⁱ Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR5286, Lyon, France.



ARTICLE INFO

Keywords:

Immune functional assay
Host response
Stimulation
Independent validation
Standardization

ABSTRACT

Recent advances in the immunotherapy field require evaluation of the immune function to adapt therapeutic decisions. Immune functional assays (IFA) are able to reveal the immune status and would be useful to further adapt and/or improve patient's care. However, standardized methods are needed to implement IFA in clinical settings. We carried out an independent validation of a published method used to characterize the underlying host response to infectious conditions using an IFA. We evaluated the reproducibility and robustness of this IFA and the associated readout using an independent healthy volunteers (HV) cohort. Expression of a 44-gene signature and IFN γ protein secretion was assessed after stimulation. We observed a strong host-response correlation between the two cohorts. We also highlight that standardized methods for immune function evaluation exist and could be implemented in larger-scale studies. This IFA could be a relevant tool to reveal innate and adaptive immune dysfunction in immune-related disorders patients.

1. Introduction

The increase in patients suffering from immune-related disorders led to the improvement in precise knowledge concerning the components and function of the immune system. Whether of physiological or pathophysiological origin, *i.e.* immunosenescence [1] or autoimmune diseases [2,3], the identification of immune alterations requires close monitoring of the immune status. Their ever-increasing number and severity make these disorders a major public health problem. Several therapies targeting the immune system, such as anti-inflammatory agents or immunostimulatory therapy, are currently used to re-balance the immune system in immunocompromised patients. Nevertheless,

clinicians lack the tools to decipher immune status, and more precisely, immune function, in order to adapt therapeutic decisions and personalize patient care.

In some clinical situations, the use of immune functional assays (IFAs) could help improve management and reveal valuable information compared to the use of circulating biomarkers such as cell counting or measurement of soluble and cell surface biomarkers. Based on the evaluation of the immune response after an *in vitro* stimulation with antigen, IFAs allow assessing the immune function as well as anticipate the ability to respond to therapy or fight a pathogen. In the last few years, T-cell mediated immunity (blood-based) assays, such as interferon gamma release assays (IGRA), have been developed and have

Abbreviations: HV, healthy volunteers; IFA, immune functional assays; IFN- γ , interferon gamma; IGRA, interferon gamma release assays; LPS, lipopolysaccharide; LTI, latent tuberculosis infection; MI, milieu intérieur; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; SEB, staphylococcal enterotoxin B

* Corresponding author at: Laboratoire Commun de Recherche Hospices Civils de Lyon-bioMérieux, Centre Hospitalier Lyon Sud, Bâtiment 3F, Pierre-Bénite 69495, France.

E-mail address: william.mouton1@biomerieux.com (W. Mouton).

¹ Equally contributed to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.108312>

Received 29 July 2019; Received in revised form 16 October 2019; Accepted 18 November 2019

Available online 21 November 2019

1521-6616/ © 2019 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

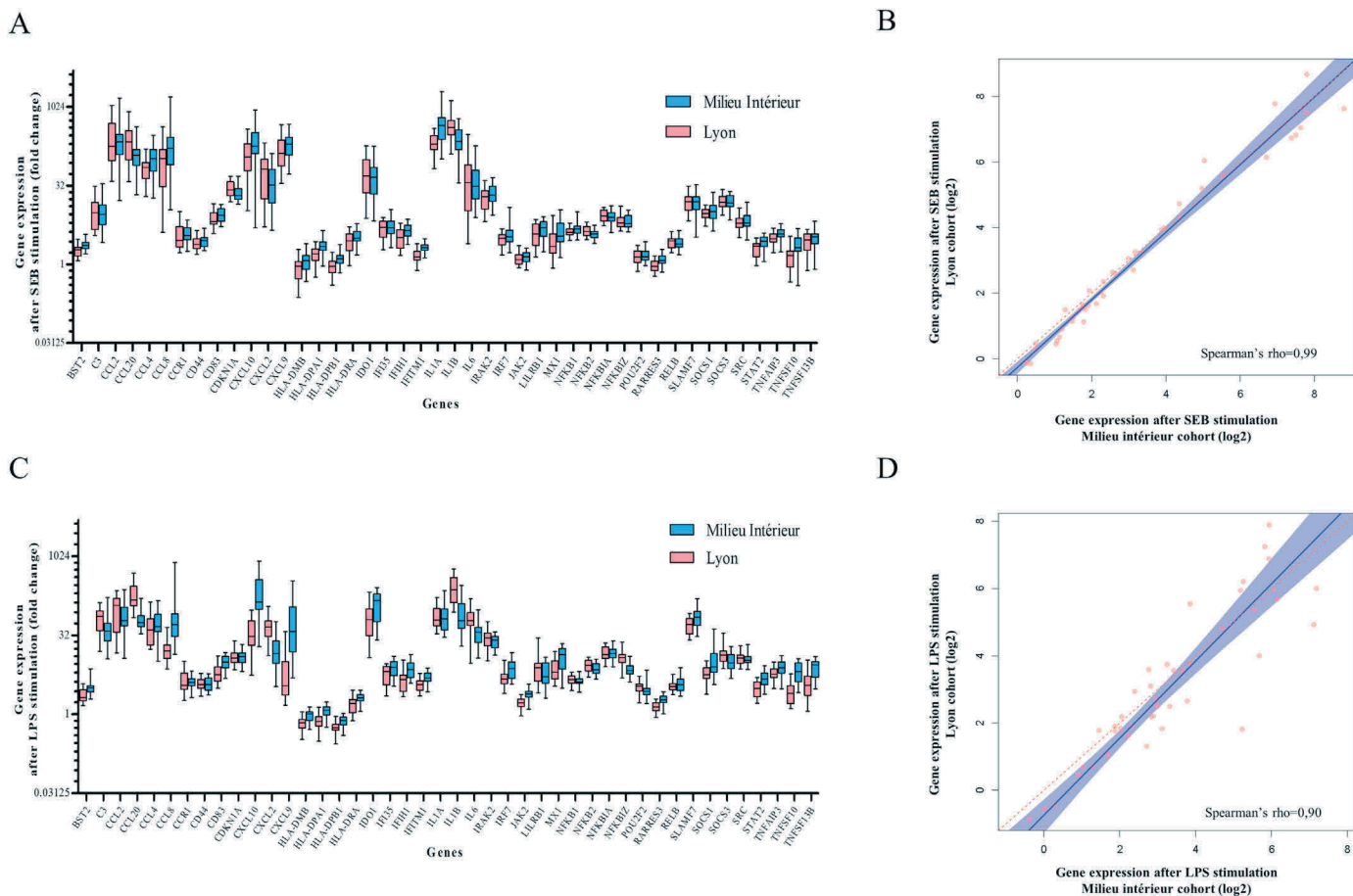


Fig. 1. Gene expression after SEB- and LPS-whole blood stimulation.

Whole blood from 25 healthy volunteers enrolled in the *Milieu Intérieur* cohort (blue) and from 20 healthy volunteers included in the Lyon study cohort (red) was stimulated in TruCulture tubes during 24 h. After mRNA extraction, gene expression was quantified using Nanostring nCounter® technology and normalized using NSolver® software using four housekeeping genes (*HPRT1*, *POLR2A*, *RPL19* and *TBP*). Fold changes are used to describe gene expression variation between the stimulated condition (SEB (A) or LPS (C)) and the control condition (NULL) for the 44-gene signature studied. The *Milieu Intérieur* data was obtained from Gene Expression Omnibus (GEO) DataSets (GSE85176) [12]. Comparison of both cohorts was performed using a Deming regression analysis on gene expression medians following SEB (B) or LPS (D) stimulation. A Spearman's correlation coefficient was calculated for each condition and indicated on each graphical representation. The orange dots represent individual gene expression, the blue beam represents the confidence interval, the blue line the Deming regression and the red dotted line the theoretical 100% identity. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

revolutionized the detection of latent tuberculosis infection (LTI). This type of test enables clinicians to be more accurate and effective in the management of patients suffering from specific disorders. Research, as well as clinical studies, use and adapt these IFAs to try to respond to specific questions, such as the capacity of specific patients to respond to vaccination [4–6]. Despite encouraging results, the main challenge which complicates the implementation of IFAs in clinical settings is the need for standardization in order to perform these methods in any laboratory, in a reliable and reproducible way [7].

Such tests should minimize the number of steps during sample preparation and ideally use the biological matrix directly sampled from the patient to limit technical variability and eliminate the pre-analytical error. As already described for cytokine release assay [8,9], use of direct measurement in whole blood sampling would be the relevant solution to minimize the risk of contamination and avoid causing non-specific cell activation or cell death [10]. Indeed, the use of whole blood rather than peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation preserves all interactions between circulating immune cells and reflects the internal environment of the subject [11]. Nevertheless, in addition to this pressing need for standardization, the second difficulty encountered is the inter-individual variability exhibited by the immune system.

In this context, the *Milieu Intérieur* team (MI) used a whole blood, semi-closed stimulation system built into syringe-based medical

devices, with the ambition to define the boundaries of a healthy immune response [12]. Using a cohort of 25 healthy volunteers (HV) (aged between 30 and 39 years) stratified by gender (13 women, 12 men), they challenged whole blood with complex stimuli (mimicking fungi, bacteria, and virus infection) and established a 44-gene expression signature, capturing the diversity of complex immune responses. In this study, an independent validation of the protocol developed by Urrutia *et al.* was performed step by step in order to evaluate the reproducibility of the technical process before its potential implementation for the management of patients with immune-related disorders in clinical settings.

2. Material and methods

2.1. Blood stimulation

According to EFS standardized procedures for blood donation and to provisions of the articles R.1243–49 and following ones of the French public health code, a written non-opposition to the use of donated blood for research purposes was obtained from HV. The blood donors' personal data were anonymized before transfer to our research laboratory. We obtained the favourable notice of the local ethical committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Est II, Bâtiment Pinel,

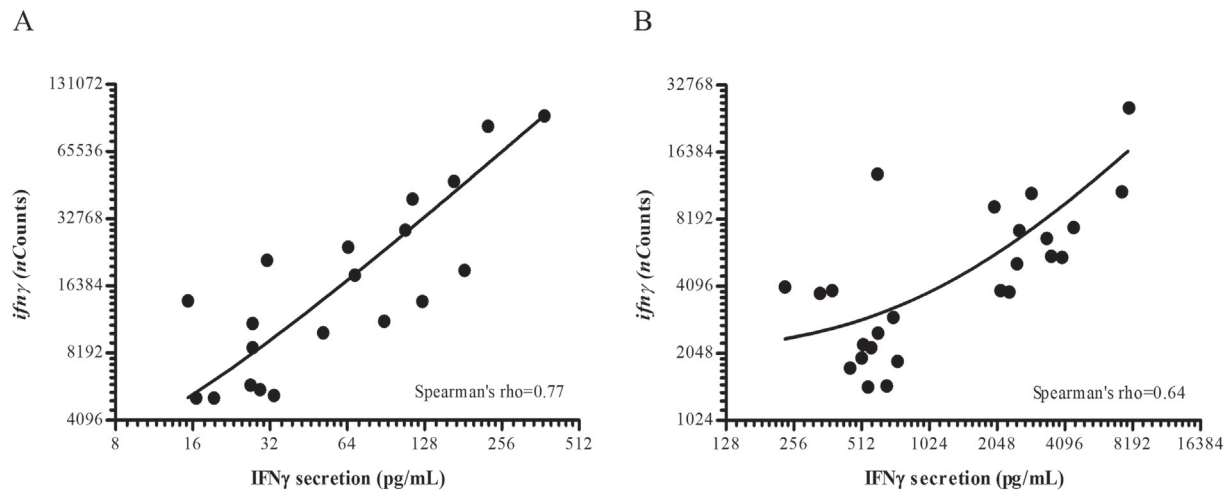


Fig. 2. Interferon- γ induction after whole-blood SEB stimulation.

Whole blood from 20 healthy volunteers included in the Lyon study cohort (A) and from 25 healthy volunteers enrolled in the *Milieu Intérieur* (MI) cohort (B) was stimulated with SEB in TruCulture tubes for 24 h. Comparison between IFN γ mRNA and protein expression was assessed separately for each healthy cohort due to the use of a different method for cytokine secretion measurement. For protein quantification, IFN γ release was quantified in TruCulture supernatant using Luminex xMAP[®] for the MI cohort and using VIDAS[®] platform (bioMérieux) for the Lyon cohort. Count number for mRNA *ifn-gamma* gene expression was normalized by the geometric mean of *HPRT1*, *POLR2A*, *RPL19* and *TBP* housekeeping genes. Gene data from the MI study was obtained from Gene Expression Omnibus (GEO) DataSets (GSE85176) [12] and protein data extracted from *Duffy et al.* supplementary information [15]. Spearman's correlation coefficient (ρ) was calculated for each condition and indicated on each graphical representation.

59 Boulevard Pinel, 69,500 Bron) and the acceptance of the French ministry of research (Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, DC-2008-64) for handling and conservation of these samples.

Whole blood from healthy volunteers ($n = 20$), stratified by gender (10 women and 10 men), and with a median age of 52 years (range: 25–65 years), was distributed (1 mL) into pre-warmed TruCulture tubes (Myriad Rbm, Austin, TX, USA) containing either medium alone (Null), staphylococcal enterotoxin B (SEB; 400 ng/mL), or lipopolysaccharide (LPS; 100 ng/mL (E.coli, O55:B5)). These were then inserted into a dry block incubator and maintained at 37 °C. After 24 h of stimulation, the pellet was separated from the supernatant using a valve and kept in TRI Reagent[®] LS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). This protocol was adapted from Urrutia et al. [12].

2.2. Cytokine and transcriptomic assays

Interferon gamma (IFN- γ) release was quantified from TruCulture's supernatant using an immunoassay in the VIDAS[®] platform (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

As previously described, RNA extraction was performed using a modified protocol of the NucleoSpin 96 RNA tissue kit (Macherey-Nagel GmbH&Co. KG, Düren, Germany) and using a vacuum system [12]. Nanostring technology was used for mRNA detection of a 44 gene panel (details in supplementary table S1), an hybridization-based multiplex assay characterised by its amplification-free step; 300 ng of RNA were hybridized to the probes at 67 °C for 18 h using a thermocycler (Bio-metra, Tprofessional TRIO, Analytik Jena AG, Jena, Germany). After removal of excessive probes, samples were loaded into the nCounter Prep Station (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) for purification and immobilization onto the internal surface of a sample cartridge for 2–3 h. The sample cartridge was then transferred and imaged on the nCounter Digital Analyzer (NanoString Technologies) where colour codes were counted and tabulated for the 44 genes.

2.3. Genes expression analysis

As previously described, each sample was analyzed in a separate multiplexed reaction that each included eight negative probes and six

serial concentrations of positive control probes. Negative control analysis was performed to determine the background for each sample. Data was imported into nSolver[®] analysis software (version 4.0) for quality checking and normalization of data. Briefly, to normalize differences in RNA input, geometric means were calculated over four housekeeping genes (*RPL19*, *TBP*, *POLR2A*, and *HPRT1*) according to the *Milieu Intérieur* study (details in supplementary material and method S1) [12].

2.4. Statistical analysis

Data obtained from our independent healthy volunteers cohort were compared to public Urrutia et al. dataset (Gene Expression Omnibus (GEO) DataSets (GSE85176)). Non-parametric Deming regression and Spearman's correlation were calculated for all parameter comparisons using R software V3.6.1. A p-value < .05 was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Transcriptomic response

Immune response after stimulation with SEB (Fig. 1A) or LPS (Fig. 1C) showed a strong correlation between the two independent healthy cohorts for the 44-gene expression signature, after followed the same protocol than Urrutia et al. [12]. This was confirmed by Deming regression on medians (Spearman's correlation coefficient $\rho = 0.99$ for SEB and 0.90 for LPS; p-values < .001; Fig. 1B and D) and on interdeciles (Spearman's correlation coefficient $\rho = 0.96$ for SEB and 0.94 for LPS; p-values < .001; details in supplementary fig. S1).

3.2. Interferon gamma response

In a second time, following SEB stimulation of HV, a comparison of *ifn-gamma* gene expression (in the corresponding TruCulture) and IFN- γ release in the supernatant (Fig. 2) was performed. The latter is described as a marker of T-cell mediated immunity and used as a diagnostic tool in research and clinical settings (IGRA) [13,14]. A strong correlation was observed between protein and gene expression for the 20 HV from Lyon (Fig. 2A) and the 25 HV from MI (Fig. 2B) (Spearman's correlation

coefficient $\rho \geq 0.64$ for both cohorts and $p\text{-value} < .0005$).

4. Discussion and conclusion

In this study, we carried out an independent validation of a published method used to characterize the underlying host response to infectious conditions using an IFA. We evaluate the reproducibility and robustness of this IFA and associated readout using an independent HV cohort.

The strong host response correlation between the two cohorts highlights that standardized methods for immune function evaluation exist and could be implemented in larger-scale studies.

Also, based on the strong correlation observed, IFN- γ mRNA measurement might be a reliable and robust readout to assess T-cell functionality. Besides, the 24 h stimulation of whole blood in standardized TruCulture tubes, which limits technical manipulation bias, renders this method a versatile tool for clinical use [11].

In conclusion, this standardized IFA could be a relevant tool to reveal innate and adaptive immune dysfunction in patients suffering from immune-related disorders.

Declaration of Competing Interest

William Mouton, Chloé Albert Vega, Guy Oriol, Alexandre Pachot, Julien Textoris, François Mallet and Karen Brengel-Pesce, are employed at bioMérieux, an *in-vitro* diagnostic company.

François Bartolo is an employee of Soladis, a services company specialized in data-related projects management.

Acknowledgements

We thank Pauline Desormeaux and Isabelle Mosnier for their technical assistance concerning nanostring molecular biology. We thank Verena Landel for language editing and critical reading of the manuscript. This work was supported by Marie Skłodowska-Curie Innovative Training H2020-MSCA-ITN-2015.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.108312>.

References

- [1] J.J. Goronzy, C.M. Weyand, Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines, *Nat. Immunol.* 14 (2013) 428–436, <https://doi.org/10.1038/ni.2588>.
- [2] D.A. Smith, D.R. Germolec, Introduction to immunology and autoimmunity, *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 661–665, <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s5661>.
- [3] Y. Zhang, J.D. Rowley, Leukemias, lymphomas, and other related disorders, *Emerg. Infect. Dis.* 19 (2013) 1–44, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383834-6.00079-3>.
- [4] I. Macchia, F. Urbani, E. Proietti, Immune monitoring in cancer vaccine clinical trials: critical issues of functional flow cytometry-based assays, *Biomed. Res. Int.* 2013 (2013) 1–11, <https://doi.org/10.1155/2013/726239>.
- [5] T.M. Clay, A.C. Hobeika, P.J. Mosca, H.K. Lyerly, M.A. Morse, Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7 (2001) 1127–1135.
- [6] A. Conrad, M. Boccard, F. Valour, V. Alcazer, A.-T. Tovar Sanchez, C. Chidiac, F. Laurent, P. Vanhems, G. Salles, K. Brengel-Pesce, B. Meunier, S. Trouillet-Assant, F. Ader, VaccHemInf project: protocol for a prospective cohort study of efficacy, safety and characterisation of immune functional response to vaccinations in haematopoietic stem cell transplant recipients, *BMJ Open* 9 (2019) e026093, <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-026093>.
- [7] C. Albert-Vega, D.M. Tawfik, S. Trouillet-Assant, L. Vachot, F. Mallet, J. Textoris, Immune functional assays, from custom to standardized tests for precision medicine, *Front. Immunol.* 9 (2018) 2367, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02367>.
- [8] C.W. Thurm, J.F. Halsey, Measurement of cytokine production using whole blood, in: J.E. Coligan, B.E. Bierer, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober (Eds.), *Curr. Protoc. Immunol.*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2005, <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0718bs66> (p. im0718bs66).
- [9] B. Yang, T.-H. Pham, R. Goldbach-Mansky, M. Gadina, Accurate and simple measurement of the pro-inflammatory cytokine IL-1β using a whole blood stimulation assay, *J. Vis. Exp.* (2011) 2662, <https://doi.org/10.3791/2662>.
- [10] P. Brodin, D. Duffy, L. Quintana-Murci, A call for blood—in human immunology, *Immunity* 50 (2019) 1335–1336, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.012>.
- [11] D. Duffy, V. Rouilly, C. Braudeau, V. Corbière, R. Djebali, M.-N. Ungeheuer, R. Josien, S.T. LaBrie, O. Lantz, D. Louis, E. Martinez-Caceres, F. Mascart, J.G. Ruiz de Morales, C. Ottone, L. Redjah, N.S.-L. Guen, A. Savenay, M. Schmolz, A. Toubert, M.L. Albert, Standardized whole blood stimulation improves immunomonitoring of induced immune responses in multi-center study, *Clin. Immunol.* 183 (2017) 325–335, <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.09.019>.
- [12] A. Urrutia, D. Duffy, V. Rouilly, C. Posseme, R. Djebali, G. Illanes, V. Libri, B. Albaud, D. Gentien, B. Piasecka, M. Hasan, M. Fontes, L. Quintana-Murci, M.L. Albert, L. Abel, A. Alcover, K. Astrom, P. Bousso, P. Bruhns, A. Cumano, C. Demangel, L. Deriano, J. Di Santo, F. Dromer, G. Eberl, J. Enninga, J. Fellay, A. Freitas, O. Gelpi, I. Gomperts-Boneca, S. Hercberg, O. Lantz, C. Leclerc, H. Mouquet, S. Pellegrini, S. Pol, L. Rogge, A. Sakuntabhai, O. Schwartz, B. Schwikowski, S. Shorte, V. Soumelis, F. Tangy, E. Tartour, A. Toubert, M.-N. Ungeheuer, L. Quintana-Murci, M.L. Albert, Standardized whole-blood transcriptional profiling enables the deconvolution of complex induced immune responses, *Cell Rep.* 16 (2016) 2777–2791, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.011>.
- [13] Q. Yin, S. El-Ashram, H. Liu, X. Sun, X. Zhao, X. Liu, X. Suo, Interferon-gamma release assay: an effective tool to detect early toxoplasma gondii infection in mice, *PLoS One* 10 (2015) e0137808, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137808>.
- [14] M. Ang, W. Wong, C.C.L. Ngan, S.-P. Chee, Interferon-gamma release assay as a diagnostic test for tuberculosis-associated uveitis, *Eye.* 26 (2012) 658–665, <https://doi.org/10.1038/eye.2012.1>.

[1] J.J. Goronzy, C.M. Weyand, Understanding immunosenescence to improve

2. DEUXIEME PUBLICATION : Transcriptomic analysis reveals distinct profiles of functional immune reconstitution at six-months after allo-HSCT

La reproductibilité du système Truculture® pour l'analyse de la fonction immunitaire ayant été démontrée à partir d'une cohorte de volontaires sains, nous avons souhaité l'utiliser chez une population de patients ayant reçu une greffe allogénique de CSH.

La période post transplantation de CSH est un moment charnière pour le patient. Elle est associée à un profond déficit immunitaire chiffrable en mois, voire années, ce qui augmente considérablement le risque de développer des infections ou une rechute de la maladie sous-jacente. Ce déficit est suivi d'une reconstitution immunitaire progressive, graduelle et individuelle dont la qualité est dépendante des caractéristiques hématologiques et des complications liées à la transplantation. La qualité de la reconstitution immunitaire étant également étroitement liée au risque de complications infectieuses post-transplantation, son évaluation fait partie intégrante de la prise en charge de ces patients

Néanmoins, l'évaluation des capacités immunitaires au cours de la phase de reconstitution est basée majoritairement sur l'utilisation de marqueurs biologiques traditionnels telles que les numérations cellulaires. Nous souhaitons évaluer si la mesure de la fonctionnalité immunitaire apporte des informations complémentaires aux marqueurs classiquement utilisés, afin de mieux caractériser la reconstitution immunitaire.

Pour ce faire, la fonction immunitaire de 60 patients receveurs d'une allogreffe de CSH inclus prospectivement dans l'étude clinique "VaccHemInf" (NCT03659773)(171), ainsi que de 10 volontaires sains (EFS) a été évaluée après une stimulation standardisée sur sang total (Truculture®) par du LPS (lipopolysaccharide) ou du SEB (*Staphylococcal* enterotoxin B), initiant respectivement une réponse immunitaire innée ou adaptative. Une analyse transcriptomique de la réponse cellulaire obtenue post stimulation a été réalisée par la technologie Nanostring™. Cette technologie permet, à partir d'une quantité minimale d'ARN, de quantifier l'expression d'un large panel de 144 gènes impliqués dans les processus immunitaires des principaux acteurs de l'immunité. L'ensemble des données transcriptomiques générées ont été analysées par des approches bio-informatiques et bio-statistiques au regard des données cliniques recueillies (variables liées à la transplantation ou aux complications infectieuses).

L'objectif de notre étude étant de faire un état des lieux et de caractériser la reconstitution immunitaire des receveurs d'allogreffe de CSH à la période charnière de 6 mois post greffe, afin de décrire les altérations immunitaires et de rechercher des associations entre des profils immunitaires spécifiques et des caractéristiques cliniques, biologiques ou infectieuses.

L'étude de la réponse immunitaire post stimulation avec LPS et SEB nous a permis d'observer que les receveurs d'allo-CSH 6 mois après la greffe étaient capables d'activer des gènes liés à la réponse immunitaire innée et adaptative, avec néanmoins un défaut d'intensité d'activation comparativement à une population saine. Ce défaut d'intensité était principalement lié à un plus faible nombre de gènes activés et à une plus faible expression de gènes impliqués dans les processus de réponse inflammatoire et de régulation de la réponse immunitaire. Nous avons également pu identifier les gènes, voies biologiques et fonctions les plus affectées. De plus, nous avons mis en évidence l'hétérogénéité et le caractère individuel de la réponse immunitaire des patients post allogreffe de CSH et identifié des défauts d'expression de gènes spécifiquement associés à un traitement par immunosuppresseur ou à une réactivation virale en cours aux *Herpesviridae*. Néanmoins, nous n'avons pas mis en évidence d'association entre les altérations immunitaires fonctionnelles révélées par notre méthode de stimulation et des numérations cellulaires. Ceci suggère qu'une évaluation individuelle des compétences immunitaires avec des informations précises sur la fonction serait une approche pertinente pour la gestion et l'optimisation de la prise en charge des patients.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de l'article « **Transcriptomic analysis reveals distinct profiles of functional immune reconstitution at six-months after allo-HSCT** », en cours de préparation pour soumission et a fait l'objet d'une communication orale lors du 32^{ème} European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases de 2022 (ECCMID).

Publication

Transcriptomic analysis reveals distinct profiles of functional immune reconstitution at six-months after allo-HSCT

William Mouton*; Anne Conrad*; Vincent Alcazer ; Mathilde Boccard ; Guy Oriol ; Fabien Subtil ; Maxime Bodinier ; Hélène Labussier e-Wallet ; Sophie Ducastelle-Lepretre ; Fiorenza Barraco ; Marie Balsat ; Ga elle Fossard ; Karen Brengel-Pesce ; Florence Ader* and Sophie Trouillet-Assant*

*Equally contributed to this work

2021

under preparation

1 **Transcriptomic analysis reveals distinct profiles of functional immune reconstitution at**
2 **six-months after allo-HSCT**

3 William Mouton^{1, 2, 3*}, Anne Conrad^{4, 5, 6*}, Vincent Alcazer⁷⁻⁸, Mathilde Boccard^{1, 4, 5}, Guy
4 Oriol^{1, 2}, Fabien Subtil⁹, Maxime Bodinier^{1, 2}, Hélène Labussiere-Wallet⁷, Sophie Ducastelle-
5 Lepretre⁷, Fiorenza Barraco⁷, Marie Balsat⁷, Ga elle Fossard⁷, Karen Brengel-Pesce^{1, 2},
6 Florence Ader^{4, 5, 6\$} and Sophie Trouillet-Assant^{1, 3\$}.

7 ¹ Joint Research Unit Hospices Civils de Lyon-bioM erieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon Sud
8 Hospital, Pierre-Bénite, 69310, France.

9 ² Open Innovation & Partnerships (OIP), bioM erieux S.A., 69280, Marcy l'Etoile, France.

10 ³ Virology and Human Pathology - Virpath Team, International Centre for Research in
11 Infectiology (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Claude Bernard Lyon 1
12 University, Lyon, 69008, France.

13 ⁴ Legionella Pathogenesis Team, International Centre for Research in Infectiology (CIRI),
14 INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon,
15 69364, France.

16 ⁵ Infectious and Tropical Diseases Department, Hospices Civils de Lyon, Croix-Rousse
17 Hospital, Lyon, 69004, France.

18 ⁶ Claude Bernard Lyon I University, Villeurbanne, 69100, France.

19 ⁷ Clinical hematology department, Hospices Civils de Lyon, Lyon Sud Hospital, Pierre-Bénite,
20 69310, France.

21 ⁸ LIB TEAM, International Centre for Research in Infectiology (CIRI), INSERM U1111, CNRS
22 UMR5308, Oullins, 69921, France

23 ⁹ Biostatistics department, Hospices Civils de Lyon, Lyon France; Lyon 1 University,
24 Villeurbanne, France; CNRS, Biometrics and Evolutionary Biology Laboratory UMR 5558,
25 Villeurbanne, France.

26

27 *co-first authors

28 \$co-corresponding authors

29

30 **Corresponding author:**

31 Florence ADER, M.D., Ph.D. Département des Maladies infectieuses et tropicales, Hôpital de
32 la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, 103 Grande-Rue de la Croix-Rousse, 69317 Lyon
33 cedex 04, France.

34 Tel:+33 (0)472 071 560; Fax:+33 (0)472 072 441; mail : florence.ader@chu-lyon.fr

35 **Running title:** Transcriptomic immunoprofiling after allo-HSCT

36 **Word count text:** 3714

37 **Word count abstract:** 250

38 **Figure/table count:** Four figures and three tables, 2 supplementary figures and 2
39 supplementary table.

40 **Reference count:** 75

41 **ABSTRACT**

42 Immune reconstitution after allogeneic-hematopoietic-stem-cell transplantation (allo-HSCT) is
43 a complex and individual process. In this cross-sectional study, whole-blood (WB) immune
44 functional assay (IFA) was used to characterize immune function by assessing immune-related
45 gene/pathway alterations. The usefulness of this tool in the context of infection, 6 months post-
46 transplantation, was evaluated.

47 Sixty allo-HSCT recipients at 6-month [5-8] post-transplant and 10 healthy volunteers (HV)
48 were included. WB was stimulated in standardized TruCulture[®] tubes using
49 lipopolysaccharides (LPS) and *Staphylococcal* enterotoxin B (SEB). Gene expression was
50 quantified using a custom 144-gene panel using NanoString nCounter[®] technology and
51 analyzed using Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN). The relationships between immune
52 function and clinical characteristics, immune cell counts, and post-transplant infections were
53 assessed.

54 Allo-HSCT recipients were able to activate similar networks of the innate and adaptive immune
55 response compared to HV, with, nevertheless, a lower intensity. A reduced number and a lower
56 expression of genes associated with immunoregulatory and inflammatory processes were
57 observed in allo-HSCT recipients. The protracted immune reconstitution revealed by
58 transcriptomic immunoprofiling was mainly related to the use of immunosuppressive
59 treatments but not revealed by immune cell counts. Moreover, the expression of a set of genes,
60 including *CCL3/CCL4*, was significantly lower in patients with *Herpesviridae* reactivation
61 (32%, 19/60) who could not be identified using classical immune cell counts.

62 Transcriptional IFA revealed the heterogeneity among allo-HSCT recipients with a reduced
63 immune function which could not be captured by circulating immune cell counts, highlighting
64 the potential added-value of this tool for the personalized care management of
65 immunocompromised patients.

66 **Keywords:** Hematopoietic stem cell transplantation; Allogeneic; Immune functional assay;
67 Gene expression; *Herpesviridae* reactivation

68 **Key points:**

- 69
- 70 • Transcriptomic profiling allows to better characterize immune function than cell
71 counts in allo-HSCT recipients at 6 months post-transplant
 - 72 • Recipients with *Herpesviridae* reactivation display a distinct profile in the activation
of a set of genes related to immune function

73 INTRODUCTION

74 Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a cellular therapy aiming at
75 curing malignant and non-malignant hematological diseases or primary immunodeficiencies^{1,2}.
76 From an immunological point of view, allo-HSCT recipients are a complex and heterogeneous
77 population who undergo a state of complete immunosuppression followed by an individual and
78 gradual immune reconstitution. This dynamic process is routinely monitored by cell count
79 measurements³⁻⁸. Several underlying conditions and post-transplant complications such as
80 graft-versus-host-disease (GvHD) and associated immunosuppressive treatments can impact
81 immune reconstitution and lead to immune deficiency and/or dysregulation. Protracted immune
82 reconstitution is associated with an increased infectious risk which represents a major cause of
83 morbidity and mortality⁹⁻¹⁴.

84 A recent study found a 23.8% mortality rate related to infections, from a wide spectrum of
85 infectious agents which can be specific to the post-transplant period¹⁵. The spectrum of
86 infections after allo-HSCT appears to be related to the kinetics of immune reconstitution
87 notably during the late phase post-engraftment where a close relationship is suggested between
88 infections and the recovery of immune function¹². In case of deficient or altered immune system,
89 the reactivation of latent viruses mainly belonging to the *Herpesviridae* family
90 (Cytomegalovirus (CMV), Human Herpesvirus-6 (HHV6), or Epstein-Barr virus (EBV)) may
91 result in symptomatic infections which can lead to fatal complications¹⁶⁻¹⁸.

92 In the post-transplant time-course, a better comprehension of the relationship between immune
93 cell function and the occurrence of infections would thus be essential. Despite the routine use
94 of traditional biological markers, only limited information is available regarding the
95 functionality of immune cells. Indeed, immune reconstitution is mainly monitored through
96 static readouts such as quantitative cell counts or soluble/surface marker measurements which
97 do not reflect functional alterations. An assessment using reproducible, economical, and
98 standardized tools is thus needed¹⁹⁻²⁵.

99 In this context, we hypothesized that immune functional assays (IFA), performed on whole-
100 blood samples, could allow a more accurate description of the functionality of innate and
101 adaptive immune cells compared to quantitative measurements^{6,26} and could be a useful tool as
102 already described in healthy volunteers (HV)²⁷, in septic patients²⁸, and very recently in the
103 setting of allo-HSCT²⁹. A snapshot of an individual's immune system functionality could be
104 relevant to personalize care strategies.

105 This proof-of-concept study aimed to characterize the immune reconstitution of allo-HSCT
106 recipients at the pivotal period of 6-month post-transplant in comparison to HV. Immune
107 function was assessed in standardized whole-blood stimulation assays (Truculture®) after
108 stimulation by lipopolysaccharides (LPS), a Toll-like receptor (TLR)-4 and -2 ligand which
109 triggers the innate immunity^{30,31}, or *Staphylococcal* enterotoxin B (SEB), a superantigen
110 binding simultaneously to the major histocompatibility complex (MHC) class II and to the T
111 cell receptor (TCR), initiating the adaptive response^{32,33}. The objectives were to decipher
112 immune alterations at the transcriptional level in allo-HSCT recipients and their potential
113 effects on biological pathways and functions, and to search for associations between
114 transcriptomic profiles and clinical or transplant-related characteristics. The post-stimulation
115 gene expression profile in the context of *Herpesviridae* infections was also assessed.

116

117 **METHODS**

118 Study population

119 Adult (≥ 18 year-old) allo-HSCT recipients transplanted at the hematology department of the
120 Lyon university hospital (France) and enrolled in the prospective, single-center cohort study
121 “VaccHemInf” were included between May 2018 and August 2020³⁴. Blood sampling was
122 performed approximately 6 months after transplantation, before the initiation of the
123 recommended vaccination schedule³⁵.

124 The cohort was approved by the regional ethics committee (*Comité de Protection des Personnes*
125 *Sud-Est V*, Grenoble, France, number 69HCL17_0769) and is registered in *ClinicalTrials.gov*
126 (NCT03659773). At inclusion, demographics (age, sex), hematological and transplant-related
127 characteristics (underlying disease, conditioning regimen, stem cell source, donor type), as well
128 as post-transplant characteristics (GvHD, immunosuppressive treatment, post-transplant
129 infections) were retrieved from medical records through an electronic case report form (eCRF).
130 All infectious episodes occurring within 2 weeks around blood sampling were retained, no
131 specific additional microbiological investigation was performed for the study. Regarding
132 reactivations of *Herpesviridae*, CMV and EBV DNA-emia was monitored at least weekly up
133 to 100 days post-transplant, then monthly during the first year post-transplant, and on demand
134 (as for HHV-6) in case of clinical symptoms compatible with viral disease. In the absence of
135 consensual cut-off values for viral DNA-emia, viral reactivations were deemed significant and
136 recorded in case of attributable symptoms or based on the viral load in the absence of symptoms
137 (≥ 3 log copies IU/mL for CMV once or more, ≥ 3 log copies IU/mL for EBV twice or more, ≥ 4
138 log copies IU/mL for HHV-6). CMV DNA-emia ≥ 3 log copies IU/mL prompted pre-emptive
139 treatment, whereas EBV and HHV-6 reactivations were handled according to the rate of
140 increase of EBV copy number or the presence of HHV-6 related clinical symptoms^{36–39}.
141 Concomitantly, 10 HV were recruited among donors at the Lyon blood bank center
142 (*Etablissement Français du Sang*, EFS) and were evaluated as a control group. According to
143 the EFS standardized procedures for blood donation and to the provisions of the article R.1243–
144 49, and following one of the French public health codes, a written non-opposition to the use of
145 donated blood for research purposes was obtained from the HV. The personal data from the
146 blood donors were anonymized before being transferred to our research laboratory.

147

148 Regulatory authorizations for the handling and conservation of these samples were obtained
149 from the regional ethics committee (*Comité de Protection des Personnes Sud-Est II*) and the
150 French ministry of research (*Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de*
151 *l'Innovation*, DC-2008–64).

152 Post-transplant T-cell immunophenotyping

153 Extensive immunophenotyping by flow cytometry on whole-blood was performed at the
154 immunology laboratory of the Lyon university hospital. Counts of white blood cells,
155 polynuclear neutrophils, monocytes, natural killer cells, total T-cell, naive CD4⁺ and CD8⁺
156 (CD45RA⁺CCR7⁺) T-cells, central memory (CD45RA⁻CCR7⁺) CD4⁺ and CD8⁺ T-cells,
157 effector memory (CD45RA⁻CCR7⁻) CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, differentiated memory CD4⁺ and
158 CD8⁺ T-cells (CD45RA⁺CCR7⁻) were determined (cells/ μ L) as previously described³⁴.

159 Immune functional assays: Truculture[®] stimulation

160 Blood from patients and HV was drawn on site and heparinized whole-blood (1 mL) was
161 subsequently distributed within 1,5 hours (\pm 30 minutes) after sampling into pre-warmed
162 standardized ready-to-use tubes (Truculture[®], Myriad Rbm, Austin, TX, USA) containing the
163 medium alone (NUL) or the medium with LPS (100 ng/mL) or the medium with SEB (400
164 ng/mL). As previously described, tubes were then inserted into a dry block incubator and
165 maintained at 37°C for 24 hours²⁷. Following incubation, cellular pellets were harvested and
166 re-suspended in 2 mL TRI Reagent[®] LS (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany), vortexed for
167 2 minutes, and rested for 10 minutes at room temperature before storage at -80°C.

168 RNA extraction

169 For TruCulture cell pellet handling and RNA processing and detection, the protocol was carried
170 out according to the study by Urrutia et al.⁴⁰.

171 Cell pellets from TruCulture stimulations kept in TRI Reagent LS (Sigma-Aldrich) were thawed
172 under agitation. Before processing, thawed samples were centrifuged (3.000 g for 5 minutes at
173 4°C) to pellet cellular debris generated during the Trizol lysis. For extraction, a modified
174 protocol of the NucleoSpin 96 RNA tissue kit (Macherey-Nagel) was followed using a vacuum
175 system. Briefly, 600 µL of clarified Trizol lysate was transferred to a tube preloaded with 900
176 µL of 100% ethanol. The mixture was transferred into the columns, washed with buffers MW1
177 and MW2 (x2) and RNA was eluted using 30 µl RNase-free water. Aliquots for gene expression
178 analysis were prepared and frozen at -80°C until use. RNA concentration was estimated using
179 the Nanodrop One™ spectrophotometer (Thermo Scientific™) according to the process
180 provided by the manufacturer.

181 Gene expression analysis

182 The NanoString nCounter® technology⁴¹, a hybridization-based multiplex assay characterized
183 by its amplification-free step, was used for mRNA detection of an 144-gene panel
184 (Supplementary Table S1, online) designed with genes from a previous publication⁴⁰ and genes
185 known to be crucial in the immune response. According to manufacturer's instructions 300 ng
186 of RNA were hybridized to the probes at 67°C for 18 hours using a thermocycler. After removal
187 of excessive probes, samples were loaded into the nCounter Prep Station (NanoString
188 Technologies, Seattle, WA, USA) for purification and immobilization onto the internal surface
189 of a sample cartridge for 2-3 hours. The sample cartridge was then transferred and imaged on
190 the nCounter Digital Analyzer (NanoString Technologies) where color codes were counted and
191 tabulated for the 144 genes. Data treatment and normalization were next performed using
192 nSolver analysis software (version 4.0, NanoString technologies). Each sample was analyzed
193 in a separate multiplexed reaction each including 8 negative probes and 6 serial concentrations
194 of positive control probes.

195 Negative control analysis was performed to determine the background for each sample. A first
196 step of normalization using the internal positive controls allowed correction of a potential
197 source of variation associated with the technical platform.

198 To do so, we calculated for all samples the background level as the median +3 SD across the
199 six negative probe counts (obtained threshold: 30). Every sample under the background level
200 was fixed to this value. Next, we calculated for each sample the geometric mean of the positive
201 probe counts. A scaling factor for a sample was a ratio of the geometric mean of the sample and
202 the average across all geometric means. For each sample, we divided all gene counts by the
203 corresponding scaling factor. To normalize for differences in RNA input we used the same
204 method as in the positive control normalization, except that geometric means were calculated
205 over three housekeeping genes (DEC1 (NM_001359.1), HPRT1 (NM_000194.1) and
206 POLR2A (NM_000937.2). The 3 housekeeping genes were selected using NormFinder,
207 GeNorm, BestKeeper, and DeltaCT methods; an established approach for the identification of
208 stable housekeeping genes within and between groups, from the 6 candidate genes included in
209 the custom panel⁴²⁻⁴⁵.

210 Gene expression interpretation

211 After normalization steps, the ratio between stimulated condition (either LPS or SEB) and the
212 control condition (NUL) were calculated in order to compare gene expression levels between
213 allo-HSCT recipients and HV. Results were expressed as fold change (FC) induction.
214 Differentially-expressed genes (DEG) post-stimulation were defined as a gene expression with
215 a minimum of 2FC (up or down) between the 2 conditions (NUL vs LPS or SEB). Of note, for
216 this analysis, the 3 housekeeping genes were removed from the panel as well as genes with a
217 raw count below the background noise threshold (30 counts) in more than 75% of individuals
218 (n = 3 and n=7, post-SEB and post-LPS, respectively).

219 Biological network enrichment was performed using the “core analysis” function of the
220 Ingenuity Pathway Analysis software (IPA, QIAGEN) by adding the list of DEG [False
221 discovery rate FDR (adjusted p.value <0.05 and FC >2], with identifiers and corresponding
222 expression values (FC). The Fisher's exact test p.value was used as a readout for the assessment
223 of biological network activation. The different algorithms used have been previously
224 described^{46,47}. Activation score for each biological networks was calculated as previously
225 described⁴⁸, see details in supplementary method.

226 Protein detection

227 Interleukin (IL)-6, IL10, CXCL10 and Interferon gamma (IFN γ) protein from healthy
228 volunteers and allo-HSCT recipients in TruCulture supernatant was quantified on
229 Simple/Multi-plex cartridges (ProteinSimple, San Jose, California, USA) using ELLA
230 nanofluidic system (Biotechne, Minneapolis, MI, USA), according to the manufacturers'
231 instructions. Results are expressed in pg/ml.

232 Statistical Analysis

233 Normality testing was performed using the Shapiro-Wilk normality test. Distribution of
234 quantitative data was expressed as mean (range) or median [interquartile range, IQR] where
235 appropriate. For HV and allo-HSCT recipient datasets, analysis of variance was performed
236 using *F*-tests and differences were calculated using a parametric unpaired Student's t test with
237 Welch's correction. Gaussian data were analyzed using ANOVA and non-gaussian data using
238 the Kruskal-Wallis test or the Mann-Whitney test, when appropriate. Area under receiver
239 operating characteristic (ROC) curves (AUC [95% confidence interval, 95%CI]) and
240 volcano/whisker plots were plotted using GraphPad Prism® software (version 8; GraphPad
241 software, La Jolla, CA, USA). ROC curves were built to identify the most differentially
242 expressed genes between patients with or without viral infectious episodes.

243 Principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering was carried out using Partek®
244 Genomics Suite® software (version 7.0; Partek Inc., St. Louis, MO, USA). The analysis
245 according to the administration of immunosuppressive treatments was conducted using Linear
246 Discriminant Analysis applied on the 5 first component of the PCA in order to get 80% of the
247 explained variability using “adeget” R package⁴⁹. The impact on gene expression of clinical
248 characteristics known to determine speed and quality of immune reconstitution (age, sex,
249 underlying disease, parameters of Tcells reconstitution, parameters of allo-HSCT procedure,
250 GvHD, ongoing immunosuppressive treatment) was analyzed using Wilcoxon test^{3,50}. Heatmap
251 was generated by scaling and centering log10-transformed gene expressions and the dendrogram
252 was drawn based on hierarchical clustering analysis (Euclidean distance matrix with Ward’s
253 method). Statistical analyses were conducted using R (version 3.6.2.). A *p.value* or a *p.adj*
254 (when specified) of at least <0.05 was considered significant.

255

256 **RESULTS**

257 **Participant characteristics**

258 Overall, 60 patients who underwent allo-HSCT after myeloablative (37%, n=22) or reduced-
259 intensity conditioning (63%, n=38) were included at a median [IQR] time of 6 [5-8] months
260 post-transplant. Acute myeloid leukemia was the most common underlying disease (52%,
261 n=31). Manifestations of acute and chronic GvHD (aGvHD, cGvHD) were reported in 70%
262 (n=42) and 13% (n=8) of allo-HSCT recipients before inclusion, respectively. At inclusion, 32%
263 (n=19) of recipients were on immunosuppressive therapy, and 68% (n=41) had received
264 intravenous Ig infusions at a median [IQR] time of 4 [3-6] months before inclusion (Table 1).
265 Concomitantly, 10 HV were included, matched for age (median [IQR]: 49.0 [33.5-56] vs. 44.5
266 [34-60] years for allo-HSCT, p=0.98) and sex (sex ratio, 0.7 vs. 1.3 for allo-HSCT, p=0.50).

267 **Allo-HSCT recipients and HV are able to activate similar biological networks upon SEB**
268 **and LPS whole-blood stimulation**

269 First, an unsupervised analysis of the full gene-panel transcriptomic data using PCA showed a
270 robust space aggregation of each experimental condition (i.e. NUL, SEB, and LPS stimulation)
271 in both populations with an explained variance of 81.6% and 68.0% for HV and allo-HSCT
272 recipients, respectively (Figure 1A-B). Combining the HV and allo-HSCT populations, the
273 variance was mainly explained by stimulation (PC1 46.7%) and by the stimulant-related effect
274 (PC2 14.8%). Next, in both populations, the activation of biological networks represented by
275 the top 5 activated canonical pathways, upstream regulators, and disease and functions upon
276 SEB (Figure 1D) and LPS (Figure 1E) stimulation was assessed. Among the 15 biological
277 networks described, 11 were induced both by LPS and SEB stimulation, among which 4
278 canonical pathways, 3 upstream regulators and 4 diseases and functions (Figure 1D-E). The
279 other biological networks activated were stimulant-dependent. Complete results of the IPA
280 analysis are available in supplementary data (Supplementary data S1, online).

281 Interestingly, the biological networks activated in HV were also activated in allo-HSCT
282 recipients, suggesting that both stimulants induced similar canonical pathways in both
283 populations, driven by common upstream regulators, and leading to the activation of similar
284 diseases and biological functions. Taken together, these results suggest that allo-HSCT
285 recipients are able to activate immune responses similarly to HV in response to stimulation,
286 without taking into account activation levels.

287 **Allo-HSCT patients harbor alterations in inflammation and regulation processes**

288 We then evaluated the variation in global gene expression post-stimulation (full gene panel per
289 stimulant). Upon SEB stimulation (Figure 2A), 97/138 (70.3%) and 84/138 (60.9%) genes were
290 differentially expressed compared to the control condition, in HV and allo-HSCT recipients

291 respectively. After LPS stimulation (Figure 2B), 85/134 (64.9%) and 64/134 (47.8%) genes
292 were differentially expressed in HV and allo-HSCT recipients, respectively. Of note, all genes
293 differentially expressed after LPS or SEB stimulation in allo-HSCT recipients were also
294 differentially expressed in HV. These results highlight that the number of genes associated with
295 innate or adaptive immune responses that are differentially expressed upon stimulation is lower
296 in the allo-HSCT population compared to HV.

297 Volcano plots were then used to identify the genes for which the expression differed
298 significantly between both populations (FDR corrected $p_{adj} < 0.05$; 2-FC threshold). Post-SEB
299 stimulation (Figure 2C), 20/138 (14%) genes were significantly and differentially expressed
300 between allo-HSCT recipients and HV; the expression of most of them ($n=18$) was lower and
301 the 10 most impacted genes (squares) were involved in immunoregulatory and inflammatory
302 processes (*CCL20*, *CCL23*, *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL10*, *IL2*, *IFNG*, *SOCS3*, and *SPPI*). Upon
303 LPS stimulation (Figure 2D), 27/135 (20%) genes were significantly and differentially
304 expressed between allo-HSCT and HV; once again, the expression of most of them ($n=25$) was
305 lower and the 10 most impacted genes (squares) were involved in complement cascade and
306 immunoregulatory and inflammatory processes (*C3*, *CCL19*, *CCL23*, *GBP5*, *IFNG*, *IP10*,
307 *MCPI*, *SERPING1*, *SPPI*, and *TNFAIP6*). Three genes with a lower expression were common
308 to both SEB and LPS stimulation (*CCL23*, *IFNG*, *SPPI*). This suggests a potential delay in the
309 regulation of immune response and inflammatory processes in the allo-HSCT population at 6
310 months post-transplant compared to HV. Of note, the 4 genes whose expression was higher in
311 allo-HSCT recipients were only weakly induced post-stimulation and thus not biologically
312 relevant.

313 The lower number of DEGs associated with a lower expression level post-stimulation of these
314 DEGs in allo-HSCT recipients led us to compare the enrichment of the biological networks
315 implicated between both populations using an activation score in order to quantitatively

316 evaluate the functional immune response post LPS or SEB challenge. Regardless of the
317 stimulant used and despite the ability of allo-HSCT recipients to activate pathways, upstream
318 regulators, and biological diseases and functions common to HV (Figure 1D-E), the intensity
319 of this activation was significantly lower ($p_{\text{adj}} < 0.05$) in allo-HSCT recipients than in HV for
320 almost all parameters (Figure 2E and 2F).

321 **Transcriptomic IFA allows to identify immune functional alteration unrevealed by** 322 **cellular counts**

323 Individual immune responses were observed through PCA performed on three datasets; the first
324 two were obtained post-stimulation with either LPS or SEB, respectively, and the last one was
325 obtained by combining the datasets obtained post-LPS and SEB stimulation (cumulative
326 condition). Samples projected onto the first 2 PC revealed an overall variability of 39.0%,
327 40.2%, and 34.2% in the LPS, SEB and cumulative conditions, respectively. Interestingly,
328 among the three datasets we observed a group of allo-HSCT recipients clustered closely to all
329 HV located on the upper right side of PCA, while some patients were distant from HV,
330 suggesting distinct transcriptomic profiles (Figure 3A, Figure S1 A-B). These observations
331 highlight the heterogeneous nature of the post allo-HSCT immune reconstitution, and suggest
332 that the patients located close to HV have a more advanced functional immune reconstitution
333 than others. To obtain a quantitative characterization of the immune alteration, we calculated,
334 using PCA projection, a Euclidean distance of each allo-HSCT recipient to the centroid of HV
335 population (green square) which serves as a reference value of a functional immune response
336 (Figure 3A, Figure S1 A-B). We hypothesized, that the greater the distance is, the more allo-
337 HSCT recipients had an altered immune response. We then explored whether main biological-
338 or transplant-related factors can be associated to this Euclidean distance. Interestingly,
339 thresholds classically used to describe an immunosuppression state^{51,52} such as a TCD4+ cell
340 count $>200\text{cells}/\mu\text{L}$ or a CD4+/CD8+ ratio >1 did not allow to identify allo-HSCT recipients

341 with an altered immune response, i.e. with a high Euclidean distance (Table S2). Moreover,
342 ongoing immunosuppressive therapy was the only transplant-related factor statistically
343 associated with an increased Euclidean distance (Wilcoxon $p.value < 0.05$) compared to those
344 without, within the cumulative dataset (median [IQR] 15.37 [13.2-20.29] vs. 11.34 [5.14-14.39]
345 $p.adj < 0.029$) (Table S2).

346 We then assessed if the immune alteration induced by immunosuppressive treatment could be
347 revealed by immune cell counts. No significant difference (Wilcoxon $p.adj > 0.53$) was observed
348 between treated ($n=19$) and untreated individuals ($n=41$) using a large immunophenotyping
349 panel (Table 3). These results underlined an added-value of transcriptomic IFA to depict
350 immune reconstitution in addition to cellular counts routinely used.

351 Next, in order to precisely characterize which transcriptomic features allows to separate allo-
352 HSCT recipients with or without immunosuppressive treatments and HV samples, we used an
353 LDA approach (Figure 3B). As observed, the three groups are distinctly separated along the
354 first axis of the LDA, we then identified the top 10 of genes that contribute to the construction
355 of this axis: (*CCL19*, *CSF2*, *CXCL10*, *IFNG*, *IL10*, *IL21*, *IL6*, *LIF*, and *LTA*). Those genes were
356 mainly obtained post SEB stimulation (7/10) compared to LPS (3/10) and were significantly
357 lower expressed ($p.adj < 0.05$) in allo-HSCT recipients with an ongoing immunosuppressive
358 treatment compared to those without or to the HV population (Figure 3C). Of note, similar
359 results were also observed for the proteins encoded by four of these genes, with at least two
360 fold lower secretion in patients with immunosuppressive treatments than those without, for
361 IFN- γ , IL6 and IL10 post SEB and CXCL10 post LPS stimulation (Figure 3D).

362 Overall, our results highlight the potential of transcriptomic IFA for the individual assessment
363 of immune function and to reveal specific immune alteration.

364 **Reactivation of *Herpesviridae* was associated with a lower expression of *CCL4* and *CCL3***
365 **genes.**

366 Finally, as immune function is closely related to infectious complications, we next assessed the
367 immune transcriptomic profile of allo-HSCT recipients according to ongoing infections.

368 Nineteen (32%) allo-HSCT recipients experienced at least one infectious episode within 28
369 days around inclusion. Infectious episodes were exclusively related to *Herpesviridae*
370 reactivation (>3 log copy/mL) with a large prevalence of EBV reactivation (17/19, 89%).

371 No significant difference (*Bonferroni* p . $adj > .99$) was found between recipients with (n=19) or
372 without (n=41) infectious episodes, in terms of demographic and transplant-related-
373 characteristics nor in terms of quantitative cell count measurements (Table 2, Figure S2).
374 Strikingly, classical thresholds used in clinical routine were not useful to discriminate patients
375 with or without infectious episodes as 12/19 (63%) and 25/41 (61%) had a TCD4⁺ count >200
376 cells/ μ L (p .value > 0.99), and 3/19 (16%) and 12/41 (29%) had a CD4⁺/CD8⁺ ratio >1 (p .value
377 0.35), respectively.

378 After LPS or SEB stimulation, 17 genes were found to be differentially expressed (FDR
379 Benjamini-Hochberg corrected p . $adj < 0.05$; 2-FC threshold) between patients with and without
380 *Herpesviridae* reactivation. A supervised analysis revealed a lower expression of these 17 genes
381 post-stimulation in allo-HSCT recipients with *Herpesviridae* reactivation compared to those
382 without (Figure 4A). The 5 genes whose expression were the most significantly lower
383 (p . $adj < 0.01$) in recipients with *Herpesviridae* reactivation compared to those without were
384 *CCL4* (post-LPS, FC 6.9 vs. 23.3, post-SEB, FC 12.6 vs. 30.2), *CCL3* (post-LPS, FC 23.2 vs.
385 53.7), *SLAMF7* (post-LPS, FC 8.8 vs. 19.4), and *CD274* (post-LPS, FC 10.4 vs. 30.4; Figure
386 4B). The AUC associated to those genes was >0.79 suggesting a relevant difference in terms of
387 post-stimulation expression between infected and uninfected allo-HSCT recipients.
388 Interestingly, the discriminating power of quantitative cell counts was significantly lower than

389 that obtained by post-stimulation transcriptomic approach, the highest ratio being 0.69 [0.54-
390 0.84] for CD4⁺/CD8⁺ ratio (Figure 4C).

391

392 **DISCUSSION**

393 The present cohort of allo-HSCT recipients was analyzed using a whole-blood IFA following
394 SEB or LPS stimulation at approximately 6 months post-transplant. This late post-transplant
395 time-point is a pivotal period for allo-HSCT recipients, as immunosuppressive treatment is
396 weaned, prophylactic therapies are adapted, and vaccination schedule is initiated¹³. Furthermore,
397 while innate immunity is quantitatively normal and lymphocyte counts representing adaptive
398 immunity are only mildly or moderately abnormal, their functionality remains to be
399 characterized.

400 The use of whole-blood IFA enabled to demonstrate the ability of allo-HSCT recipients to
401 activate the same immune networks than HV in response to immune challenges. Nevertheless,
402 allo-HSCT recipients had a fewer number of DEG than HV, leading to an immune response of
403 weaker intensity upon both SEB and LPS stimulation. Genes with a lower expression were
404 mainly involved in immunoregulatory and inflammatory processes. Indeed, post-SEB
405 stimulation, the genes with the most significant lower expression were *IL2*, a marker of T-cell
406 activation⁵³, *IL1*-related genes, and *IL10*, both regulating inflammatory and immune
407 responses^{41,54}. Post-LPS stimulation, an altered expression of *C3* was observed, a gene related
408 to the activation of the complement system acting as a functional bridge between innate and
409 adaptive immunity that leads to the production of proinflammatory molecules^{55,56}. A reduced
410 expression of *MCPI* (also known as *CCL2*) was highlighted. This gene encodes for a
411 chemoattractant of myeloid and lymphoid cells during the inflammatory process and acts as an
412 effector of T-cell differentiation⁵⁷, previously reported to be activated by inflammatory stimuli
413 such as LPS⁵⁸. Furthermore, the observed lower expression of *IFNG* with both stimulants

414 potentially reflects a slower functional reconstitution of NK-and/or T-cells, the main IFN- γ
415 producing cells⁵⁹. The lower expression of genes identified through volcano plotting explained
416 the weaker biological networks' intensity in allo-HSCT recipients compared to HV. The
417 canonical pathways altered in allo-HSCT recipients were mainly linked to the recognition of
418 infectious agents and the induction of inflammatory reaction or adaptive response. Altogether,
419 the genes with an altered expression were associated with defects in key biological functions,
420 not necessarily specific of a cellular component or system, but involved in many immune
421 response processes.

422 The assessment of individual post-stimulation transcriptomic profiles revealed that immune
423 reconstitution in allo-HSCT recipients is highly heterogeneous. Some allo-HSCT recipients
424 displayed a transcriptomic profile similar to that observed in HV, suggesting a more advanced
425 process of immune reconstitution. Interestingly, we identified that subjects with the most
426 distinct transcriptomic responses of HVs were mainly represented by allo-HSCT recipients
427 with an ongoing immunosuppressive treatments. These subjects were characterized by a lower
428 expression of key genes of the immune response such as *CSF2*, *IFNG*, *IL10*, *IL21* or *IL6*
429 resulting for some of them in a lower secretion of related encoded proteins. This is line with
430 previous data reporting the deleterious effect of immunosuppressive treatments, such as
431 calcineurin inhibitors that affect NFAT pathway-related gene expression and protein
432 secretion⁶⁰⁻⁶⁴. In addition, no association between a specific transcriptomic profile and other
433 major clinical characteristic such as GvHD was found. Furthermore, cell counts classically
434 performed during post-transplant management such as TCD4+ cell count and CD4+ /CD8+
435 ratio are not able to reveal these alterations^{51,52}.

436 Several studies have shown the interest of evaluating the immune response using a post-
437 stimulation approach with Truculture[®] tubes in healthy populations^{27,40,65}, in an infectious
438 context^{28,66}, and in the context of solid organ transplantation (SOT)⁶⁷. In the allo-HSCT setting,

439 a recent study revealed the magnitude and the heterogeneity of functional immune responses
440 reflected by the variation in cytokine responses before and early post-transplant²⁹. Thus, to the
441 best of our knowledge, this is the first study to report post-stimulation transcriptional
442 immunoprofiling in the late post-transplant period in allo-HSCT recipients.

443 Finally, we were able to identify a set of genes associated with ongoing infectious episodes,
444 only related in this study to *Herpesviridae* reactivation, which are frequent events in
445 immunocompromised populations such as post allo-HSCT recipients⁶⁸. A recent study
446 described an altered immune response against *Herpesviridae* in older people⁶⁹. Interestingly,
447 the state of immunosenescence occurring in older people could be in some way compared to
448 what is observed in allo-HSCT recipients, notably regarding phenotypes of immune cells which
449 are mainly made up of memory phenotypes and highly restricted to naive phenotypes or effector
450 cells. In the present study, allo-HSCT recipients with *Herpesviridae* reactivation presented a
451 significantly lower expression of *CCL3* and *CCL4* genes post-stimulation. These chemokines
452 are potent chemoattractants of innate and adaptive immune cells during inflammatory processes,
453 and their dysregulation has been linked to an increased susceptibility to infection^{70,71}.
454 Interestingly, the allo-HSCT recipients with *Herpesviridae* reactivation had again no specific
455 clinical features, and the quantitative biomarkers used in routine practice failed to discriminate
456 patients with or without infections, notably T-cell counts (total or naïve), which are described
457 as key controllers of infections post-HSCT⁷²⁻⁷⁴. Altogether, the present results confirm the
458 potential added-value of IFA in providing additional information on immunocompetence in the
459 allo-HSCT setting, as previously suggested^{6,29,75}.

460 There are some limitations to this study. In this pilot study, performed at a single institution,
461 the number of patients included was limited and the results need to be confirmed. Immune
462 function assessment herein is only representative of the selected stimuli (LPS and SEB).
463 Functional immune reconstitution was studied at a single time point, but the ongoing follow-up

464 of the cohort should enable to provide dynamic data regarding the kinetics of immune
465 reconstitution overtime. Moreover, the biological network assessment might be biased by the
466 custom gene-panel. Finally, it cannot be excluded that the important inter-individual variability
467 observed, with no evident link to clinical characteristics, is due to the heterogeneity of allo-
468 HSCT recipients included in the study. Indeed, no specific selection was applied in terms of
469 participants who were representative of the HSCT patient population in our institution, but this
470 might lead to a lack of power.

471 In conclusion, this study demonstrated the interest of assessing individual immune function
472 profiles in the setting of allo-HSCT, which cannot be captured by the quantity of circulating
473 cells in the perspective of personalized care management.

474 **FOOTNOTE PAGE**

475 **Acknowledgements**

476 We thank Jonathan Lopez, Pauline Desormeaux, Isabelle Mosnier, Fleur Bourdelaix, and
477 Jimmy Perrot for their technical assistance on NanoString molecular biology. We thank Véréna
478 Landel for language editing and critical reading of the manuscript.

479 This research was funded by an internal grant from the *Hospices Civils de Lyon (Appel d'Offre*
480 *Jeune Chercheur* 2018, to AC) and by the *Région Auvergne-Rhône-Alpes (Pack Ambition*
481 *Recherche* 2019, to FA). The authors gratefully acknowledge the staff of the *Centre de*
482 *Ressources Biologiques Sud* for biobanking of samples from the VaccHemInf- FIGHT cohort,
483 the *Centre de Recherche Clinique Hématologie Sud* and the nurses from the hematology
484 department of the *Hospices Civils de Lyon* for their assistance during the entire study.

485 The results of this study have been presented in the 32nd European Congress of Clinical
486 Microbiology & Infections Diseases in Lisbon, Portugal (23-26 April 2022).

487 **Authorship Contributions**

488 All authors were involved in the analysis and interpretation of data as well as drafting the
489 manuscript or revising it critically for important intellectual content. WM, AC, MB, FA and
490 STA made substantial contributions to the conception and design of the study and designed the
491 experiments. AC, HLW, SDL, FB, MBa, GF and FA were involved in patient care. WM and
492 MB performed the experiments. WM, MB, AC, VA, GO, FS, MBod, KBP, FA and STA
493 performed the data analyses. WM, AC, FA and STA drafted the manuscript. All authors read
494 and approved the final manuscript. KBP, FA and STA take responsibility for the integrity of
495 the data analysis.

496 **Conflicts of Interest Disclosure**

497 WM has a Ph.D grant CIFRE 2019 (*Conventions Industrielles de Formation par la Recherche,*
498 *Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation*, Paris, France) half
499 funded by Lyon University and half-funded by BioMérieux SA. KBP, GO, MBod are
500 employees of bioMérieux SA, an *in vitro* diagnostic company. The other authors have no
501 relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial
502 interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript.
503 This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert
504 testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

505

506 REFERENCES

- 507 1. for the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Ljungman P, Bregni M, et
508 al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours
509 and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant.*
510 2010;45(2):219–234.
- 511 2. Copelan EA. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.*
512 2006;354(17):1813–1826.
- 513 3. Bosch M, Khan FM, Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell
514 transplantation: *Curr. Opin. Hematol.* 2012;19(4):324–335.
- 515 4. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, et al. Immune Reconstitution after Allogeneic
516 Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front. Immunol.* 2016;7:.
- 517 5. Carson K, Mehta J, Singhal S. Reimmunization after stem cell transplantation. *Hematop.*
518 *Stem Cell Transplant. Clin. Pract.* 2009;363–368.
- 519 6. de Silva HD, Ffrench RA, Korem M, et al. Contemporary analysis of functional immune
520 recovery to opportunistic and vaccine-preventable infections after allogeneic haemopoietic
521 stem cell transplantation. *Clin. Transl. Immunol.* 2018;7(10):e1040.
- 522 7. Storek J. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation – its relation
523 to the contents of the graft. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2008;8(5):583–597.
- 524 8. Bejanyan N, Brunstein CG, Cao Q, et al. Delayed immune reconstitution after allogeneic
525 transplantation increases the risks of mortality and chronic GVHD. *Blood Adv.*
526 2018;2(8):909–922.
- 527 9. Gratwohl A. Hematopoietic Stem Cell TransplantationA Global Perspective. *JAMA.*
528 2010;303(16):1617.
- 529 10. Pidala J. Graft-vs-Host Disease following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation.
530 *Cancer Control.* 2011;18(4):268–276.
- 531 11. Giaccone L, Felicetti F, Butera S, et al. Optimal Delivery of Follow-Up Care After
532 Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplant: Improving Patient Outcomes with a
533 Multidisciplinary Approach. *J. Blood Med.* 2020;11:141–162.
- 534 12. Sahin U, Toprak SK, Atilla PA, Atilla E, Demirer T. An overview of infectious
535 complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Infect. Chemother.*
536 *Off. J. Jpn. Soc. Chemother.* 2016;22(8):505–514.
- 537 13. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications
538 among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. *Biol. Blood*
539 *Marrow Transplant.* 2009;15(10):1143–1238.
- 540 14. Gratwohl A, Brand R, Frassoni F, et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem
541 cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious
542 complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36(9):757–
543 769.
- 544 15. for the Infectious Diseases Working Party EBMT, Styczyński J, Tridello G, et al. Death
545 after hematopoietic stem cell transplantation: changes over calendar year time, infections
546 and associated factors. *Bone Marrow Transplant.* 2020;55(1):126–136.
- 547 16. Lin R, Liu Q. Diagnosis and treatment of viral diseases in recipients of allogeneic
548 hematopoietic stem cell transplantation. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol.* 2013;6(1):94.
- 549 17. for the European Conference on Infections in Leukemia, Ljungman P, de la Camara R, et
550 al. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8)
551 infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow*
552 *Transplant.* 2008;42(4):227–240.
- 553 18. for the European Conference on Infections in Leukemia, Styczynski J, Reusser P, et al.
554 Management of HSV, VZV and EBV infections in patients with hematological

- 555 malignancies and after SCT: guidelines from the Second European Conference on
556 Infections in Leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43(10):757–770.
- 557 19. Kowalski RJ, Zeevi A, Mannon RB, Britz JA, Carruth LM. Immunodiagnostics: Evaluation
558 of Functional T-Cell Immunocompetence in Whole Blood Independent of Circulating Cell
559 Numbers. *J. Immunotoxicol*. 2007;4(3):225–232.
- 560 20. Luo Y, Xie Y, Zhang W, et al. Combination of lymphocyte number and function in
561 evaluating host immunity. *Aging*. 2019;11(24):12685–12707.
- 562 21. Janetzki S, Schaed S, Blachere NEB, et al. Evaluation of Elispot assays: influence of
563 method and operator on variability of results. *J. Immunol. Methods*. 2004;291(1–2):175–
564 183.
- 565 22. Smith SG, Joosten SA, Verscheure V, et al. Identification of Major Factors Influencing
566 ELISpot-Based Monitoring of Cellular Responses to Antigens from Mycobacterium
567 tuberculosis. *PLoS ONE*. 2009;4(11):e7972.
- 568 23. Smith JG, Liu X, Kaufhold RM, Clair J, Caulfield MJ. Development and Validation of a
569 Gamma Interferon ELISPOT Assay for Quantitation of Cellular Immune Responses to
570 Varicella-Zoster Virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 2001;8(5):871.
- 571 24. Vogt R, Schulte PA. Evaluation of immune responses. *IARC Sci. Publ*. 2011;(163):215–
572 239.
- 573 25. Albert-Vega C, Tawfik DM, Trouillet-Assant S, et al. Immune Functional Assays, From
574 Custom to Standardized Tests for Precision Medicine. *Front. Immunol*. 2018;9:2367.
- 575 26. Podgorny PJ, Pratt LM, Liu Y, et al. Low Counts of B Cells, Natural Killer Cells,
576 Monocytes, Dendritic Cells, Basophils, and Eosinophils are Associated with
577 Postengraftment Infections after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol.*
578 *Blood Marrow Transplant*. 2016;22(1):37–46.
- 579 27. Duffy D, Rouilly V, Libri V, et al. Functional Analysis via Standardized Whole-Blood
580 Stimulation Systems Defines the Boundaries of a Healthy Immune Response to Complex
581 Stimuli. *Immunity*. 2014;40(3):436–450.
- 582 28. Albert Vega C, Oriol G, Bartolo F, et al. Deciphering heterogeneity of septic shock patients
583 using immune functional assays: a proof of concept study. *Sci. Rep*. 2020;10(1):16136.
- 584 29. Gjørde LK, Brooks PT, Andersen NS, et al. Functional immune reconstitution early after
585 allogeneic haematopoietic cell transplantation: A comparison of pre- and post-
586 transplantation cytokine responses in stimulated whole blood. *Scand. J. Immunol*.
587 2021;94(1):.
- 588 30. Bohannon JK, Hernandez A, Enkhbaatar P, Adams WL, Sherwood ER. The
589 immunobiology of toll-like receptor 4 agonists: from endotoxin tolerance to
590 immunoadjuvants. *Shock Augusta Ga*. 2013;40(6):451–462.
- 591 31. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem*.
592 2002;71:635–700.
- 593 32. Fries BC, Varshney AK. Bacterial Toxins—Staphylococcal Enterotoxin B. *Microbiol.*
594 *Spectr*. 2013;1(2):.
- 595 33. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins*. 2010;2(8):2177–
596 2197.
- 597 34. Conrad A, Boccard M, Valour F, et al. VacHemInf project: protocol for a prospective
598 cohort study of efficacy, safety and characterisation of immune functional response to
599 vaccinations in haematopoietic stem cell transplant recipients. *BMJ Open*.
600 2019;9(2):e026093.
- 601 35. Cordonnier C, Einarsdottir S, Cesaro S, et al. Vaccination of haemopoietic stem cell
602 transplant recipients: guidelines of the 2017 European Conference on Infections in
603 Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect. Dis*. 2019;19(6):e200–e212.

- 604 36. Ljungman P, de la Camara R, Robin C, et al. Guidelines for the management of
605 cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell
606 transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7).
607 *Lancet Infect. Dis.* 2019;19(8):e260–e272.
- 608 37. Styczynski J, van der Velden W, Fox CP, et al. Management of Epstein-Barr Virus
609 infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic
610 hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in
611 Leukemia (ECIL-6) guidelines. *Haematologica.* 2016;101(7):803–811.
- 612 38. Ogata M, Satou T, Kadota J, et al. Human Herpesvirus 6 (HHV-6) Reactivation and HHV-
613 6 Encephalitis After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: A Multicenter,
614 Prospective Study. *Clin. Infect. Dis.* 2013;57(5):671–681.
- 615 39. Ward KN, Hill JA, Hubacek P, et al. Guidelines from the 2017 European Conference on
616 Infections in Leukaemia for management of HHV-6 infection in patients with hematologic
617 malignancies and after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.*
618 2019;104(11):2155–2163.
- 619 40. Urrutia A, Duffy D, Rouilly V, et al. Standardized Whole-Blood Transcriptional Profiling
620 Enables the Deconvolution of Complex Induced Immune Responses. *Cell Rep.*
621 2016;16(10):2777–2791.
- 622 41. Goytain A, Ng T. NanoString nCounter Technology: High-Throughput RNA Validation.
623 *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 2020;2079:125–139.
- 624 42. Ovesná J, Kučera L, Vaculová K, et al. Validation of the β -amy1 Transcription Profiling
625 Assay and Selection of Reference Genes Suited for a RT-qPCR Assay in Developing Barley
626 Caryopsis. *PLoS ONE.* 2012;7(7):e41886.
- 627 43. Zhang J, Xie W, Yu X, et al. Selection of Suitable Reference Genes for RT-qPCR Gene
628 Expression Analysis in Siberian Wild Rye (*Elymus sibiricus*) under Different Experimental
629 Conditions. *Genes.* 2019;10(6):451.
- 630 44. Nagy NA, Németh Z, Juhász E, et al. Evaluation of potential reference genes for real-time
631 qPCR analysis in a biparental beetle, *Lethrus apterus* (Coleoptera: Geotrupidae). *PeerJ.*
632 2017;5:e4047.
- 633 45. Sarker N, Fabijan J, Emes RD, et al. Identification of stable reference genes for quantitative
634 PCR in koalas. *Sci. Rep.* 2018;8(1):3364.
- 635 46. Krämer A, Green J, Pollard J, Tugendreich S. Causal analysis approaches in Ingenuity
636 Pathway Analysis. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2014;30(4):523–530.
- 637 47. Meng T, Chen H, Sun M, et al. Identification of differential gene expression profiles in
638 placentas from preeclamptic pregnancies versus normal pregnancies by DNA microarrays.
639 *Omics J. Integr. Biol.* 2012;16(6):301–311.
- 640 48. Lopez J, Mommert M, Mouton W, et al. Early nasal type I IFN immunity against SARS-
641 CoV-2 is compromised in patients with autoantibodies against type I IFNs. *J. Exp. Med.*
642 2021;218(10):e20211211.
- 643 49. Jombart T, Ahmed I. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data.
644 *Bioinformatics.* 2011;27(21):3070–3071.
- 645 50. Dekker L, de Koning C, Lindemans C, Nierkens S. Reconstitution of T Cell Subsets
646 Following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Cancers.* 2020;12(7):1974.
- 647 51. Stein DS, Korvick JA, Vermund SH. CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of
648 clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review. *J. Infect. Dis.*
649 1992;165(2):352–363.
- 650 52. Margolick JB, Gange SJ, Detels R, et al. Impact of inversion of the CD4/CD8 ratio on the
651 natural history of HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999. 2006;42(5):620–
652 626.

- 653 53. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the
654 immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2012;12(3):180–190.
- 655 54. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity.
656 *Immunol. Rev.* 2018;281(1):8–27.
- 657 55. Dunkelberger JR, Song W-C. Complement and its role in innate and adaptive immune
658 responses. *Cell Res.* 2010;20(1):34–50.
- 659 56. Carroll MC. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat. Immunol.*
660 2004;5(10):981–986.
- 661 57. Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat. Immunol.*
662 2001;2(2):102–107.
- 663 58. Gschwandtner M, Derler R, Midwood KS. More Than Just Attractive: How CCL2
664 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Front. Immunol.* 2019;10:2759.
- 665 59. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the
666 Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front. Immunol.* 2018;9:847.
- 667 60. Sommerer C, Meuer S, Zeier M, Giese T. Calcineurin inhibitors and NFAT-regulated gene
668 expression. *Clin. Chim. Acta.* 2012;413(17–18):1379–1386.
- 669 61. Tsuda K, Yamanaka K, Kitagawa H, et al. Calcineurin Inhibitors Suppress Cytokine
670 Production from Memory T Cells and Differentiation of Naïve T Cells into Cytokine-
671 Producing Mature T Cells. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e31465.
- 672 62. Pacocha SE, Oriente A, Huang S-K, Essayan DM. Regulation of antigen-induced human
673 T-lymphocyte responses by calcineurin antagonists. *J. Allergy Clin. Immunol.*
674 1999;104(4):828–835.
- 675 63. Kim H-P, Korn LL, Gamero AM, Leonard WJ. Calcium-dependent Activation of
676 Interleukin-21 Gene Expression in T Cells. *J. Biol. Chem.* 2005;280(26):25291–25297.
- 677 64. Bremer S, Vethe NT, Skauby M, et al. NFAT-regulated cytokine gene expression during
678 tacrolimus therapy early after renal transplantation: NFAT-regulated cytokine gene
679 expression during tacrolimus therapy. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2017;83(11):2494–2502.
- 680 65. Duffy D, Rouilly V, Braudeau C, et al. Standardized whole blood stimulation improves
681 immunomonitoring of induced immune responses in multi-center study. *Clin. Immunol.*
682 2017;183:325–335.
- 683 66. Duffy D, Nemes E, Llibre A, et al. Immune Profiling Enables Stratification of Patients With
684 Active Tuberculosis Disease or Mycobacterium tuberculosis Infection. *Clin. Infect. Dis. Off.*
685 *Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 2021;73(9):e3398–e3408.
- 686 67. Drabe CH, Sørensen SS, Rasmussen A, et al. Immune function as predictor of infectious
687 complications and clinical outcome in patients undergoing solid organ transplantation (the
688 ImmuneMo:SOT study): a prospective non-interventional observational trial. *BMC Infect.*
689 *Dis.* 2019;19(1):573.
- 690 68. Annaloro C, Serpenti F, Saporiti G, et al. Viral Infections in HSCT: Detection, Monitoring,
691 Clinical Management, and Immunologic Implications. *Front. Immunol.* 2020;11:569381.
- 692 69. Nicoli F, Clave E, Wanke K, et al. Primary immune responses are negatively impacted by
693 persistent herpesvirus infections in older people: results from an observational study on
694 healthy subjects and a vaccination trial on subjects aged more than 70 years old.
695 *eBioMedicine.* 2022;76:103852.
- 696 70. Ren M, Guo Q, Guo L, et al. Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and
697 clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *EMBO J.* 2010;29(23):3952–3966.
- 698 71. Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, et al. Chemokines enhance immunity by guiding
699 naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell–dendritic cell interaction. *Nature.*
700 2006;440(7086):890–895.
- 701 72. Moss P, Rickinson A. Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation.
702 *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5(1):9–20.

- 703 73. Basso S, Compagno F, Zelini P, et al. Harnessing T Cells to Control Infections After
704 Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front. Immunol.* 2020;11:567531.
705 74. Ljungman P. Prevention and treatment of viral infections in stem cell transplant recipients.
706 *Br. J. Haematol.* 2002;118(1):44–57.
707 75. Naik S, Vasileiou S, Aguayo-Hiraldo P, et al. Toward Functional Immune Monitoring in
708 Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients. *Biol. Blood Marrow Transplant.*
709 2020;S108387912030015X.
710

711 TABLES AND TABLE LEGENDS

712 Table 1. Characteristics of allo-HSCT recipients

Demographics	Allo-HSCT recipients n=60
Age, years, median [IQR]	44.5 [34-60]
Male, n (%)	34 (57)
<hr/>	
Time from transplantation, months, median [IQR]	6 [5-8]
<hr/>	
Hematological and transplant-related characteristics, n (%)	
<i>*Underlying hematological disease</i>	
Acute myeloid leukemia and related neoplasms	31 (52)
Myelodysplastic syndromes	8 (13)
Myeloproliferative neoplasms	1 (2)
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma	11 (18)
T-lymphoblastic leukemia/lymphoma	2 (3)
Mature neoplasms: T, NK, or B cells	3 (5)
Hodgkin lymphoma	1 (2)
Others	3 (5)
<i>CR before the engraftment, n (%)</i>	<i>53 (88)</i>
<i>Donor type</i>	
Geno-identical	18 (30)
Haplo-identical	12 (20)
Pheno-identical	29 (48)
Fully matched	23 (38)
HLA mismatched	7 (12)
<i>Stem cell source</i>	
Peripheral blood cells	48 (80)
Bone marrow	11 (18)
Cord blood	1 (2)
<i>Conditioning regimen</i>	
MAC	22 (37)
RIC	38 (63)
TBI	18 (30)
ATG	34 (57)
<i>Donor and Recipient CMV status prior to transplantation</i>	
D+/R-	9 (15)
D+/R+	21 (35)
D-/R-	14 (23)
D-/R+	16 (27)
<i>Donor and Recipient EBV status prior to transplantation</i>	
D+/R-	1 (2)
D+/R+	52 (87)
D-/R-	2 (3)
D-/R+	5 (8)

Post-transplant complications, n (%)	
Acute GvHD	42 (70)
Grade I/II/III	28/12/2
Chronic GvHD	8 (13)
Limited/Extensive	5/3
Time from transplantation, months, median [IQR]	
6 [5-8]	
Immunophenotyping, mean (range)	
Lymphocytes (NV, 1000-2800/ μ L)	1601 (410-4910)
CD3 ⁺ T-lymphocytes (NV, 521-1772/ μ L)	887 (145-3406)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-lymphocytes (NV, 336-1126/ μ L)	270 (38-876)
Naïve CD4 ⁺ (CD45 ⁺ CCR7 ⁺) (NV, 121-456/ μ L)	30 (0-390)
Central memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺) (NV, 92-341/ μ L)	61 (1-211)
Effector memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 59-321/ μ L)	157 (4-704)
Differentiated memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 11-102/ μ L)	22 (0-226)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-lymphocytes (NV, 125-780/ μ L)	580 (50-2779)
Naïve CD8 ⁺ (CD45 ⁺ CCR7 ⁺) (NV, 86-257/ μ L)	39 (0-241)
Central memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺) (NV, 19-93/ μ L)	18 (0-127)
Effector memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 15-162/ μ L)	252 (0-1517)
Differentiated memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 39-212/ μ L)	276 (0-1500)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio (NV, 0.9-6)	0.97 (0.12- 9.07)
CD20 ⁺ B-lymphocytes (NV, 64-593/ μ L)	282 (14-1439)
Immunoglobulin G titers (NV, 7-16 g/L)	8.6 (2.0-20.3)
Post-transplant immunomodulatory therapy at inclusion, n (%)	
IS therapy at inclusion#	19 (32)
IVIG infusion(s)	41 (68)
Time since last IVIG infusion (months), median [IQR]	4 [3-6]
DLI	8 (13)

713 *Based on the 2016 revisions of the World Health Organization classification of myeloid and
714 lymphoid neoplasms.

715 #Immunosuppressive therapies included: ciclosporine (n=9), tacrolimus (n=4), corticosteroids
716 (n=8), ruxolitinib (n=3).

717
718 *Abbreviations: ATG, antithymocyte globulin; CM, central memory; CMV, cytomegalovirus;*
719 *CR, complete remission; D, donor; DM, differentiated memory; DLI, donor lymphocyte*
720 *infusion; EBV, Epstein-Barr Virus ; EM, effector memory; GvHD, graft-versus-host disease;*
721 *HLA, human leukocyte antigen; IQR, interquartile range; IS, immunosuppressive; Ig,*
722 *immunoglobulin; IVIG, intravenous immunoglobulins; MAC, myeloablative conditioning;*
723 *NK, natural killer; NV, normal values; R, recipient; RIC, reduced intensity conditioning; TBI,*
724 *total body irradiation; VZV, varicella zoster virus*

725

726 **Table 2. Characteristics of allo-HSCT recipients according to *Herpesviridae* infection**
 727 **status.**

<i>Herpesviridae</i> infection	Presence n=19	Absence n=41
Etiology, n		
EBV	17	
CMV (including one combined with EBV)	2	NA
HHV6	1	
Demographics		
Age, years, median [IQR]	41 [28-57]	45 [35-63]
Male, n (%)	11 (58)	23 (56)
Time from transplantation to inclusion, months, median [IQR]	6.4 (5.8-7.6)	7.4 (5.7-8.6)
Hematological and transplant-related characteristics, n (%)		
<i>*Underlying hematological disease</i>		
Acute myeloid leukemia and related neoplasms	9 (47)	22 (54)
Myelodysplastic syndromes	3 (16)	5 (12)
Myeloproliferative neoplasms	0 (0)	1 (2)
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma	5 (26)	6 (15)
T-lymphoblastic leukemia/lymphoma	0 (0)	2 (5)
Mature neoplasms: T, NK, or B cells	1 (5)	2 (5)
Hodgkin lymphoma	1 (5)	0 (0)
Others	0 (0)	3 (7)
<i>CR before the engraftment, n (%)</i>	16 (84)	37 (90)
<i>Donor type</i>		
Geno-identical	4 (21)	14 (34)
Haplo-identical	5 (26)	7 (17)
Pheno-identical	10 (53)	19 (46)
Fully matched	9 (90)	14 (74)
HLA mismatched	1 (10)	5 (26)
<i>Stem cell source</i>		
Peripheral blood cells	15 (79)	33 (81)
Bone marrow	4 (21)	7 (17)
<i>Conditioning regimen</i>		
MAC	11 (58)	27 (66)
RIC	8 (42)	14 (34)
TBI	7 (37)	11 (27)
Post-transplant complications, n (%)		
Acute GvHD	14 (74)	28 (68)
Chronic GvHD	3 (16)	5 (12)

Immunophenotyping, mean (range)

Lymphocytes (NV, 1000-2800/ μ L)	1869 (490-4910)	1473 (410-4650)
CD3 ⁺ T-lymphocytes (NV, 521-1772/ μ L)	1081 (188-3406)	797 (145-2910)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-lymphocytes (NV, 336-1126/ μ L)	273 (38-785)	269 (60-876)
Naïve CD4 ⁺ (CD45 ⁺ CCR7 ⁺) (NV, 121-456/ μ L)	20.5 (0-121)	34.3 (1-390)
Central memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺) (NV, 92-341/ μ L)	49.7 (1-140)	65.4 (1-211)
Effector memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁻) (NV, 59-321/ μ L)	179.5 (13-704)	147.8 (4-368)
Differentiated memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 11-102/ μ L)	15.0 (0-95)	25.3 (0-226)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-lymphocytes (NV, 125-780/ μ L)	776 (60-2779)	489 (50-2422)
Naïve CD8 ⁺ (CD45 ⁺ CCR7 ⁺) (NV, 86-257/ μ L)	28.8 (0-156)	44.3 (2-241)
Central memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺) (NV, 19-93/ μ L)	19.8 (0-97)	17.7 (0-127)
Effector memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁻) (NV, 15-162/ μ L)	418 (0-1517)	177 (1-843)
Differentiated memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 39-212/ μ L)	317 (0-1102)	258 (0-1500)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio (NV, 0.9-6)	0.55 (0.17- 2.33)	1.17 (0.12- 9.07)
CD19 ⁺ B-lymphocytes (NV, 64-593/ μ L)	274 (14-1435)	289 (15-1299)

Post-transplant immunomodulatory therapy at inclusion, n (%)

IS therapy at inclusion#	8 (42)	11 (27)
IVIG infusion(s)	17 (89)	24 (59)
DLI	3 (16)	5 (12)

728 *Based on 2016 revisions of the World Health Organization classification of myeloid and
729 lymphoid neoplasms;
730 Immunosuppressive therapies included: ciclosporine (n=9), tacrolimus (n=4), corticosteroids
731 (n=8), ruxolitinib (n=3).
732 Wilcoxon-Mann-Whitney and Fisher two-sided tests were used for quantitative and qualitative
733 variables, respectively. Adjusted p-values were calculated using the *Bonferroni* correction
734 method and were considered statistically significant if < 0.05.

735
736 *Abbreviations: CM, central memory; CMV, Cytomegalovirus; DM, differentiated memory;*
737 *DLI, donor lymphocyte infusion; EBV, Epstein-Barr virus; EM, effector memory; GvHD,*
738 *graft-versus-host disease; HHV6, Human Herpesvirus 6; HLA, human leukocyte antigen;*
739 *IQR, interquartile range; IS, immunosuppressive; Ig, immunoglobulin; IVIG, intravenous*
740 *immunoglobulins; MAC, myeloablative conditioning; NK, natural killer; NV, normal values;*
741 *RIC, reduced intensity conditioning; TBI, total body irradiation;*

742

743 **Table 3. Comparison of immune cell counts of allo-HSCT recipients according to**
744 **immunosuppressive treatments.**

Immunophenotyping, (normal value)	No IS treatment n=41 Median [IQR]	IS treatment n=19 Median [IQR]	p.adj
Polynuclear neutrophils (PNN) (NV, 2-7.5 x10 ⁹ /L)	2.8 [2.2-3.8]	4 [3.1-4.4]	0.353
White blood cells (WBC) (NV, 4.5-11 x10 ⁹ /L)	5.4 [4.2-7]	6 [4.8-7.8]	0.353
Monocytes (NV, 0.2-0.9 x10 ⁹ /L)	0.5 [0.4-0.7]	0.6 [0.4-0.9]	0.390
Absolute lymphocytes (NV, 1-2.8 x10 ⁹ /L)	1.3 [0.8-2.5]	0.9 [0.7-1.3]	0.353
CD3 ⁺ T-lymphocytes (NV, 521-1772/μL)	717 [513-1186]	475 [362.5-686.5]	0.353
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-lymphocytes (NV, 336-1126/μL)	287 [151-334]	205 [95-382.5]	0.432
Naïve CD4 ⁺ (CD45 ⁺ CCR7 ⁺) (NV, 121-456/μL)	17 [8.5-32]	12 [4-33]	0.788
Central memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺) (NV, 92-341/μL)	56.5 [22.5-82]	50 [19.5-104]	0.864
Effector memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 59-321/μL)	143.5 [103.8-208]	98 [64.5-185]	0.396
Differentiated memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 11-102/μL)	5 [0-29]	3.5 [0.8-20]	0.864
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-lymphocytes (NV, 125-780/μL)	409 [230-790]	250 [141-366.5]	0.353
Naïve CD8 ⁺ (CD45 ⁺ CCR7 ⁺) (NV, 86-257/μL)	20.5 [10-54.5]	17.5 [8.2-49]	0.864
Central memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺) (NV, 19-93/μL)	9.5 [3.2-17]	10 [4-12]	0.884
Effector memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 15-162/μL)	159 [88-290.8]	107 [62.2-199.8]	0.435
Differentiated memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 39-212/μL)	223 [88.5-339.5]	72 [22.5-247.5]	0.353
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio (NV, 0,9-6)	0.5 [0.4-0.8]	0.8 [0.2-1.3]	0.813
CD2 ⁺ T-lymphocytes (NV, 800-3000/μL)	785 [614.8-1218.5]	538 [414-813.5]	0.353
CD19 ⁺ B-lymphocytes (NV, 67-516/μL)	214 [101.2-414.8]	171 [54.5-244.2]	0.353
CD20 ⁺ B-lymphocytes (NV, 64-593/μL)	213 [98.5-424.5]	168 [54.2-240.8]	0.353
CD21 ⁺ B-lymphocytes (NV, 67-516/μL)	203 [86.8-390.2]	161.5 [49-230.8]	0.353

745 *Based on 2016 revisions of the World Health Organization classification of myeloid and
746 lymphoid neoplasms;
747 Immunosuppressive therapies included ciclosporine (n=9), tacrolimus (n=4), corticosteroids
748 (n=8), ruxolitinib (n=3).
749 Adjusted p.values were calculated using the *Benjamini–Hochberg* correction method and were
750 considered statistically significant if < 0.05.

751
752 *Abbreviations: CM, central memory; DM, differentiated memory; EM, effector memory; IQR,*
753 *interquartile range; IS, immunosuppressive treatment; NK, natural killer; NV, normal values;*
754

755 **FIGURE LEGENDS**

756 **Figure 1. Spatial distribution and biological networks induced by stimulation in healthy**
757 **volunteers (HV) and allo-HSCT recipients.**

758 Principal component analysis (PCA) of gene expression data derived from (A) 10 HV (triangles),
759 (B) 60 allo-HSCT patients (circles), and (C) both populations. Representation of immune response
760 assessment for post-SEB (blue) and post-LPS (red) stimulation, as well as for the NUL basal
761 condition (grey). PCA is projected onto the first 2 principal components and each mark represents
762 an individual sample.

763 Biological networks obtained from IPA for HV (white bars) and allo-HSCT recipients (colored
764 bars), represented by the top five enriched modulated canonical pathways, upstream regulators, and
765 diseases and functions post SEB (D) and LPS (E) stimulation. For canonical pathways and diseases
766 and functions, a $-\log(p.\text{value}) > 2$ was set as threshold. For upstream regulators, an overlap $p.\text{value}$
767 < 0.05 was set as threshold. Underlined networks correspond to those common between the two
768 stimulants.

769 *Abbreviations: HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; HV, healthy volunteers; IPA,*
770 *ingenuity pathways analysis; LPS, lipopolysaccharide; PC, principal component; PCA, principal*
771 *component analysis; SEB, staphylococcal enterotoxin B*

772 **Figure 2. Modulation in the expression of immune response genes post-SEB and post-LPS**
773 **stimulation in healthy volunteers (HV) and allo-HSCT recipients.**

774 Venn diagrams of DEG (adjusted $p.\text{value} < 0.05$ in $> 75\%$ of tests) between 10 HV (white circle) and 60 allo-HSCT recipients
775 (grey circle) after 24 hours of SEB (A) and LPS (B) stimulation. Volcano plots of genes upon SEB
776 (C) and LPS (D) stimulation differing between HV and allo-HSCT population. Fold change (x axis)
777 is plotted against statistical significance (y axis) for each genes. Up- or down-regulated genes with
778 a fold change > 2 or < 2 and $FDR < 0.05$ are depicted in grey. Black represents genes not found to
779 differ significantly between the HV and allo-HSCT populations. The top most impacted genes are
780 detailed and represented as squares.

781 The biological network activation scores of the top five canonical pathways, upstream regulators,
782 and diseases and functions for HV (white bars) and allo-HSCT recipients (colored bars) upon SEB
783 (E) and LPS (F) stimulation. Activation scores for both populations were generated by summing
784 the median expression of component genes for each network. Underlined networks correspond to
785 those common between the two stimulants.

786 *Abbreviations: DEG, differentially-expressed genes; FDR, False discovery rate; HSCT,*
787 *hematopoietic stem cell transplantation; HV, Healthy volunteers ; LPS, lipopolysaccharide; PRR,*
788 *pattern recognition receptors; SEB, staphylococcal enterotoxin B; Th, T helper.*

789 **Figure 3. Individual transcriptomic profile of the allo-HSCT population compared to the HV**
790 **population and association with the main disease- and transplant-related factors.**

791 (A) Principal component analysis (PCA) of gene expression data derived from 10 HV (white circles)
792 and 60 allo-HSCT patients (black circles) upon cumulative dataset (LPS and SEB stimulation).
793 Individuals were represented onto the first 2 principal components and each mark represents an
794 individual sample. PCA shows the presence of a specific cluster formed by HV individuals (green
795 ellipse), the HV centroid (green square) serve as a reference of functional transcriptomic response.
796 (B) LDA representation from the five first principal component from (A) (explaining 80% of dataset
797 variability) from 10 HV (white circles) and 60 allo-HSCT recipients divided in two group, without
798 ($n = 41$, light grey) or with ($n = 19$, dark grey) ongoing immunosuppressive treatment, the
799 corresponding ellipses are also represented. (C) Comparison between HV (white bars) and allo-
800 HSCT recipients without ($n = 41$, light grey) or with ($n = 19$, dark grey) immunosuppressive treatment
801 for the expression (fold change) of the 10 genes which most contribute to the construction of the
802 first axis of LDA. (D) Comparison of cytokine secretion levels for four genes from LDA analysis

803 (pg/mL) obtained from Truculture® supernatants post stimulation and quantified using the ELLA
804 nanofluidic system. Whisker plots represent median [Q1-Q3] values, and the Kruskal-Wallis test
805 with Dunn correction was used for statistical analysis, a $p_{adj} < 0.05$ is considered as significant.

806 *Abbreviations: HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; HV, Healthy volunteers; IS,*
807 *immunosuppressive; LPS, lipopolysaccharide; PCA, principal component analysis; SEB,*
808 *staphylococcal enterotoxin B.*

809 **Figure 4. Transcriptomic immune profile according to the presence or absence of recent viral**
810 **infectious episodes and main genes impacted.** Heatmap of gene expression profiles (A) from
811 supervised analysis (Euclidean distances matrix with Ward's methods) generated by scaling and
812 centering log₁₀-transformed gene expression FC and based on the 17 genes with the highest
813 significant ($p_{adj} < 0.05$) differences in expression between recipients with (n=19 and without
814 infectious episodes (n=41). Genes clustering is indicated by a dendrogram tree for selected genes
815 (left). The colored bars at the top of the heatmap represent the membership of recipients in groups
816 with (black) or without (grey) infectious episodes. Overall, the expression of the 17 genes seems to
817 be lower when an infectious episode occurs. (B) Graphical plot representing the expression of the
818 5 most DEG (FC>2 and $p_{adj} < 0.01$) within allo-HSCT recipients with (n= 19) or without infectious
819 episodes (n= 41), median and [95%CI] values are represented by dots and lines, respectively. (C)
820 ROC curves obtained from the comparison between allo-HSCT recipients with (n= 19) and without
821 infectious episodes (n= 41) regarding the 5 most DEG and quantitative cell counts. AUC [95%CI]
822 is indicated for each parameter.

823 *Abbreviations: AUC, area under the curve; CI, confidence interval; HSCT, hematopoietic stem cell*
824 *transplantation; FC, fold change; LPS, lipopolysaccharide; ROC, receiver operating characteristic;*
825 *SEB, staphylococcal enterotoxin B*

826 **Figure S1. Individual transcriptomic profile of the allo-HSCT population compared to the HV**
827 **population**

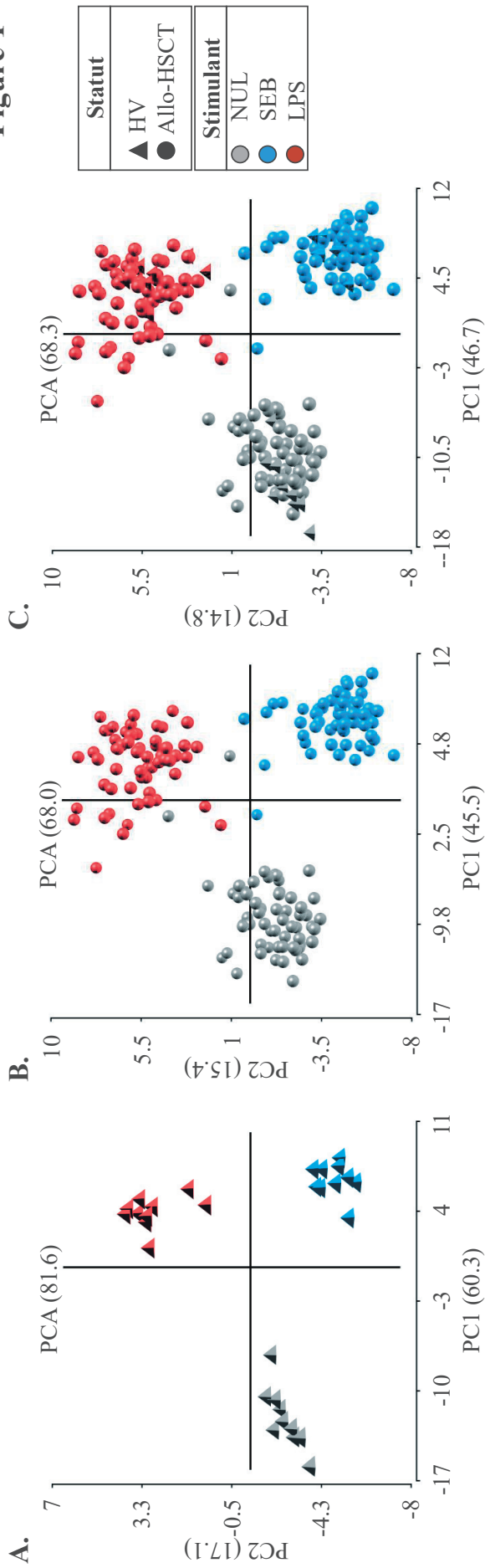
828 Principal component analysis (PCA) of gene expression data derived from 10 HV (white circles)
829 and 60 allo-HSCT patients (black circles) upon dataset obtained post (A) SEB and (B) LPS
830 stimulation. Individuals were represented onto the first 2 principal components and each mark
831 represents an individual sample. PCA shows the presence of a specific cluster formed by HV
832 individuals (green ellipse), the HV centroid (green square) serve as a reference of functional
833 transcriptomic response.

834 *Abbreviations: HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; HV, Healthy volunteers; LPS,*
835 *lipopolysaccharide; PCA, principal component analysis; SEB, staphylococcal enterotoxin B.*

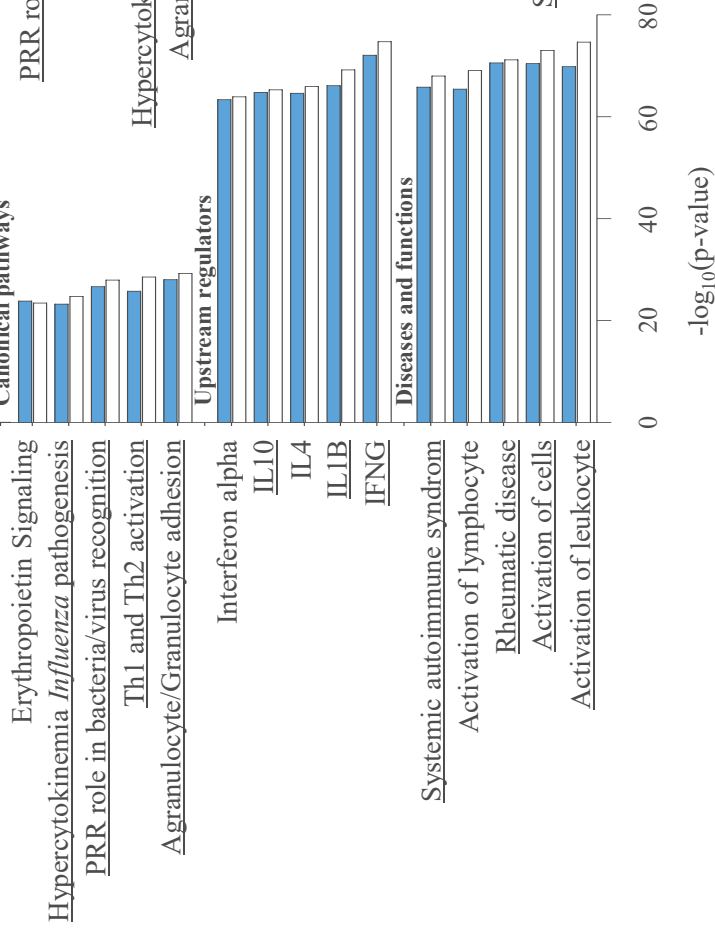
836 **Figure S2. Immune cell subtype counts are not significantly different between recipients with**
837 **or without infectious episodes.** Distribution of polynuclear neutrophils (A), white blood cells (B),
838 monocytes (C), absolute lymphocyte count (D), TCD4⁺ cell count (E), TCD8⁺ cell count (F),
839 TCD4⁺/CD8⁺ ratio (G) and TCD4⁺ naïve cell count (H) values within groups according to the
840 presence or absence of infectious episodes. Graphs show individual data points, and box and
841 whisker plots show the median value, upper and lower quartiles, and range. The differences between
842 the two groups are not statistically significant for all cell types considered (*Bonferroni* $p_{adj} > .99$).

843 *Abbreviations: ALC, absolute lymphocytes count; PNN, polynuclear neutrophils; TCD, T cell*
844 *cluster of differentiation; WBC, white blood cells.*

Figure 1



D. Post-SEB



E. Post-LPS

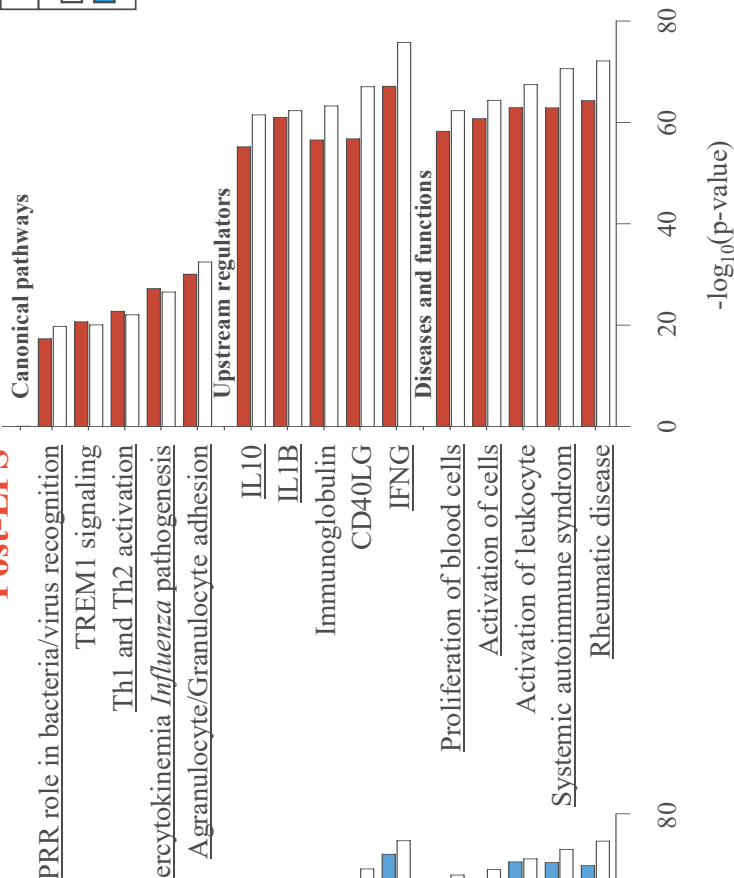


Figure 2

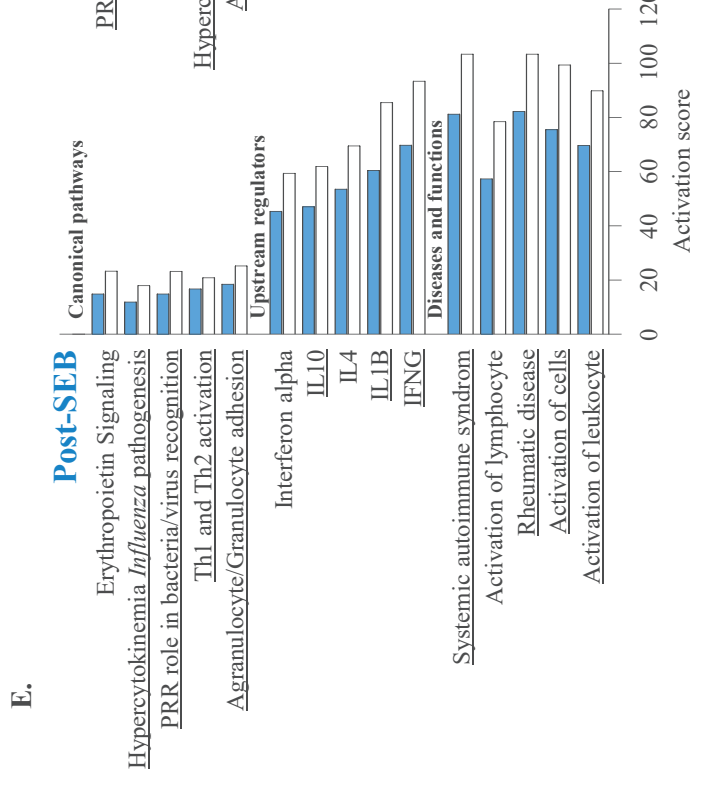
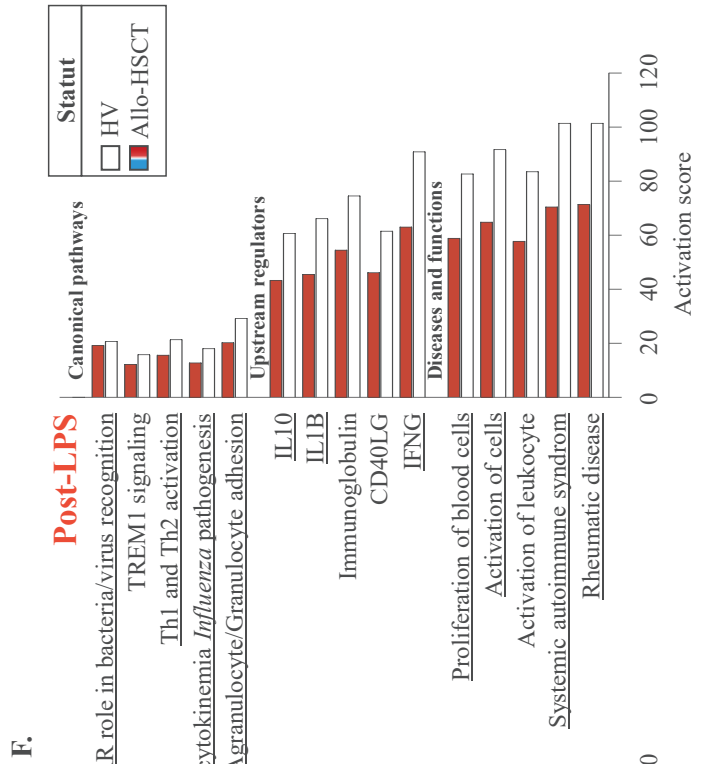
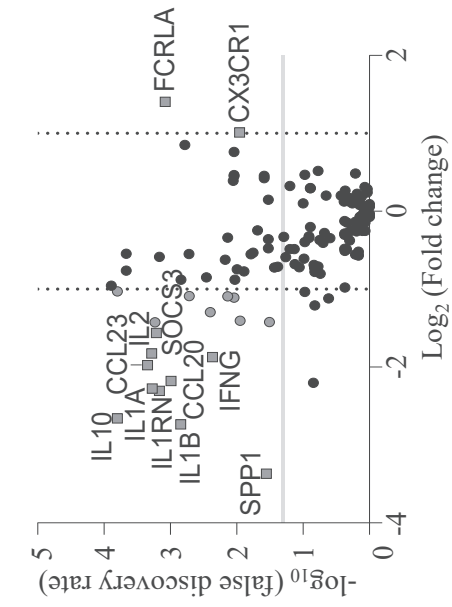
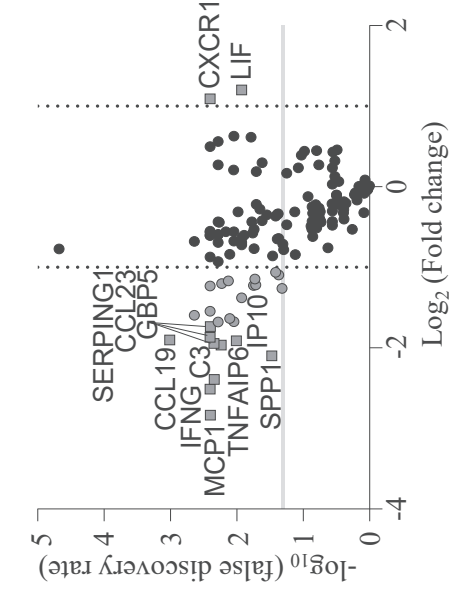
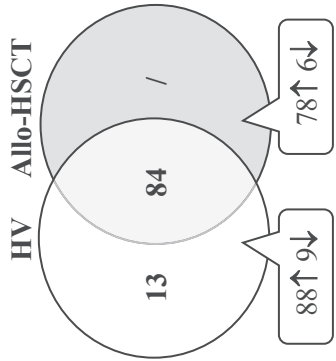
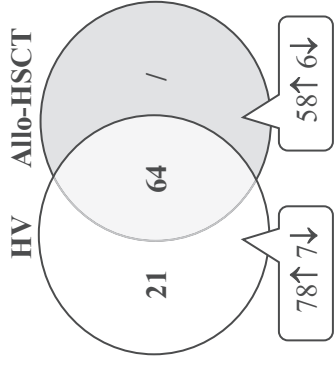


Figure 3

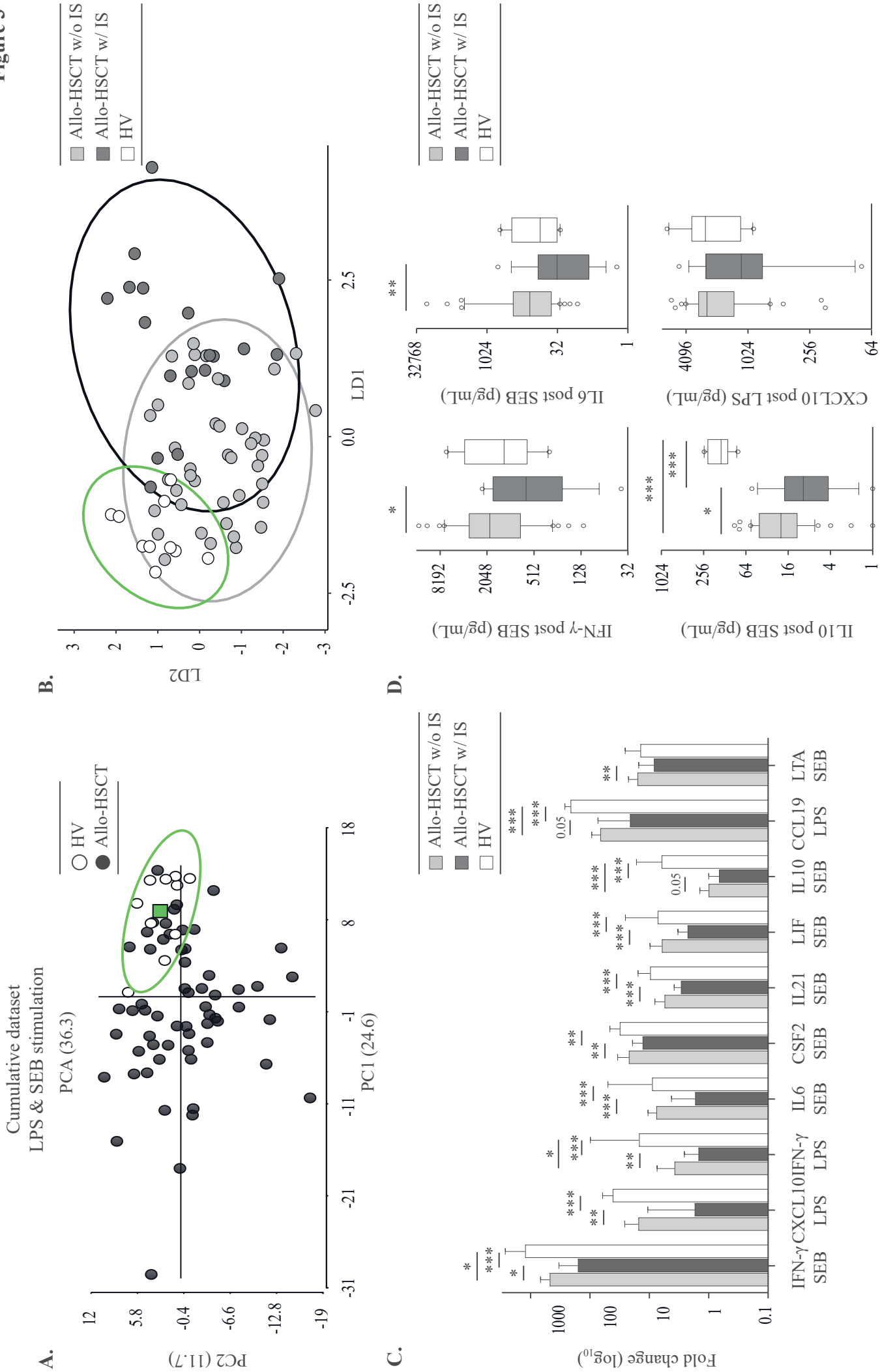
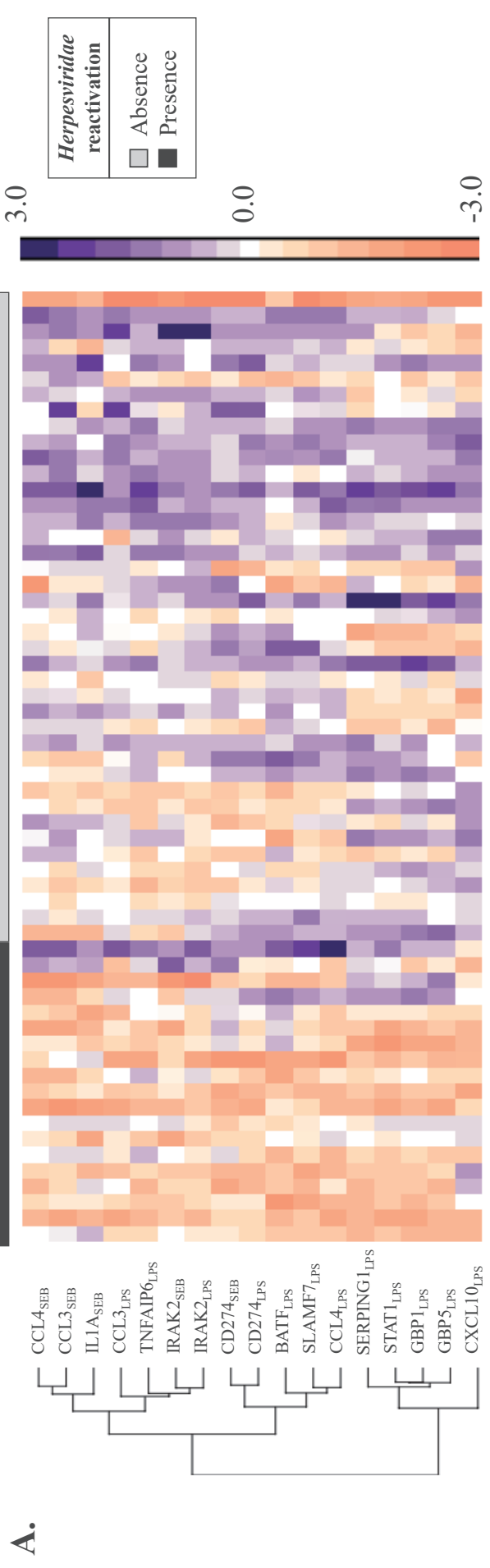
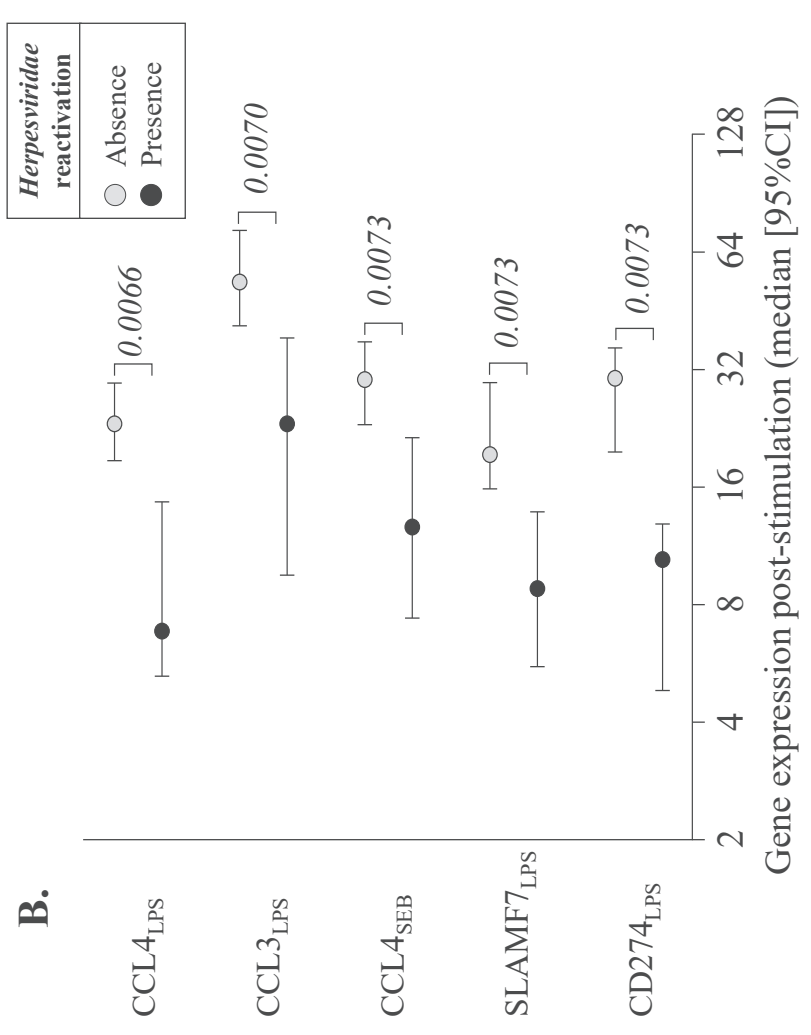


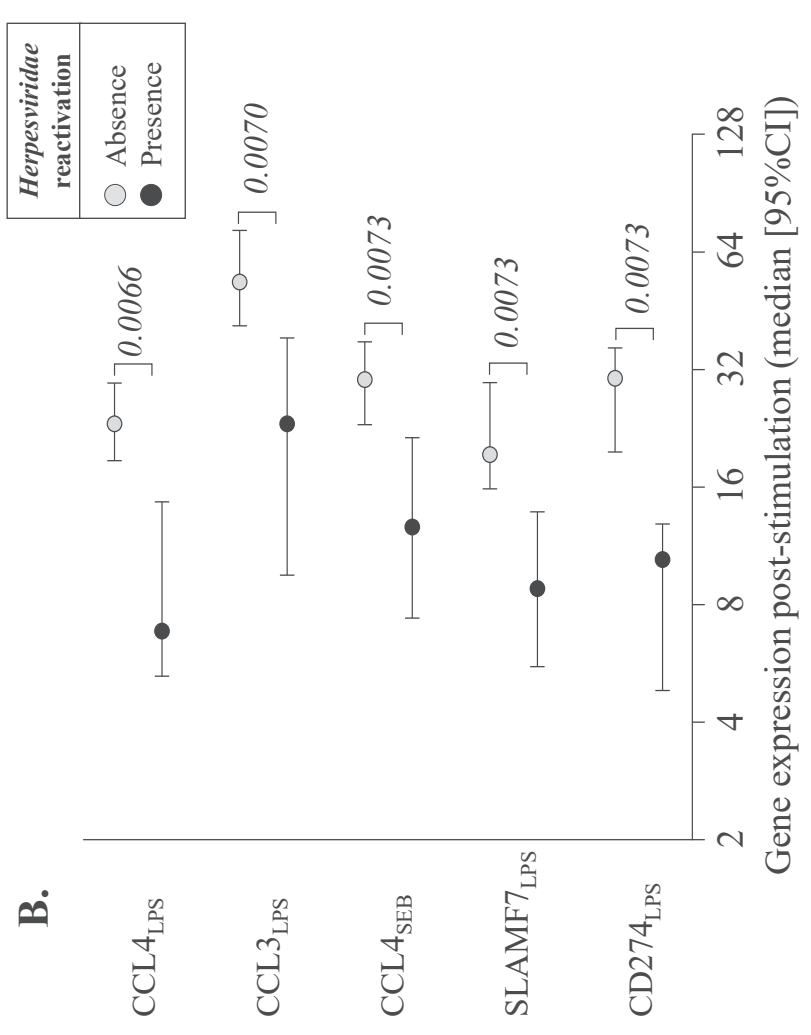
Figure 4



B.



C.



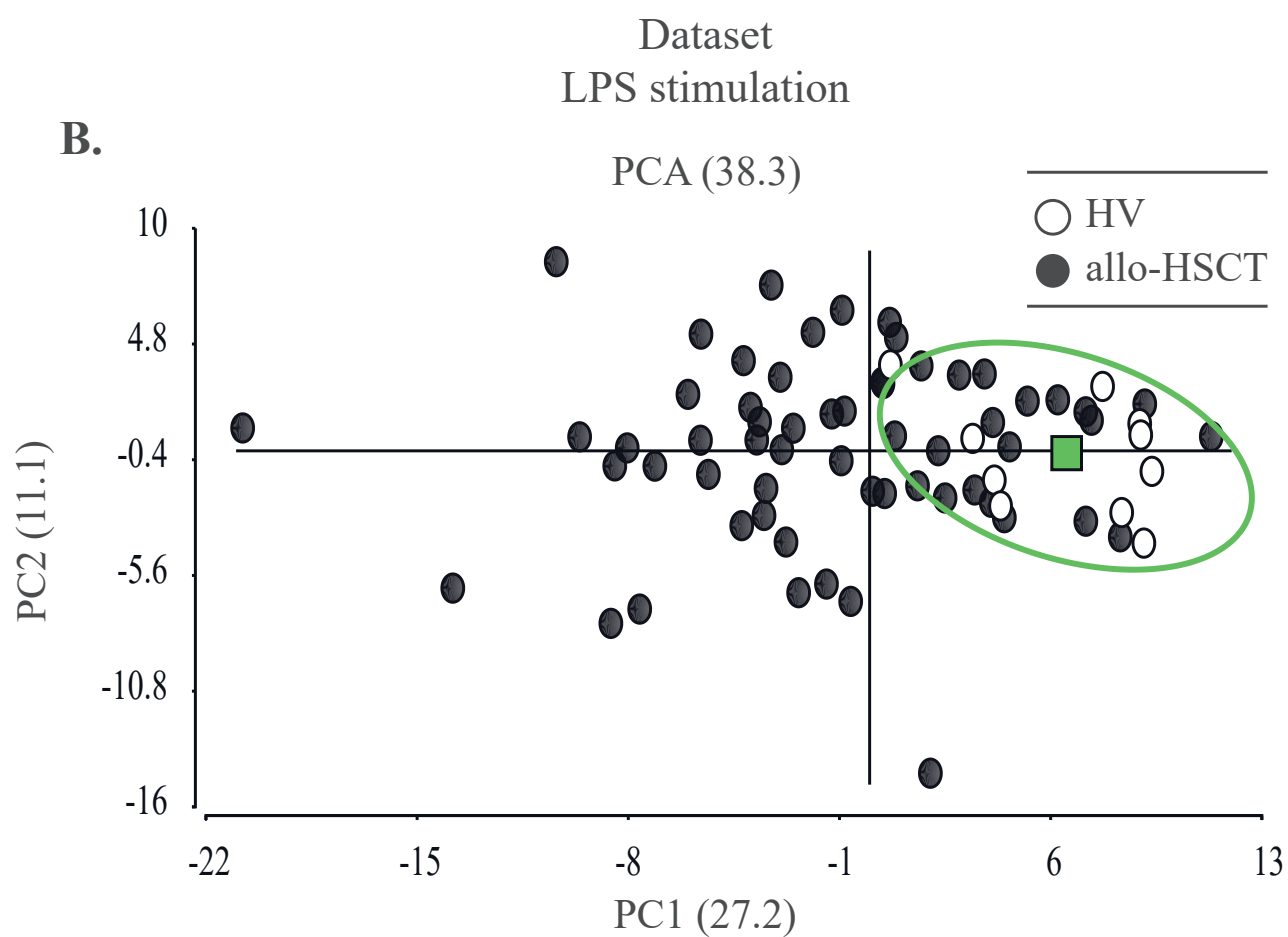
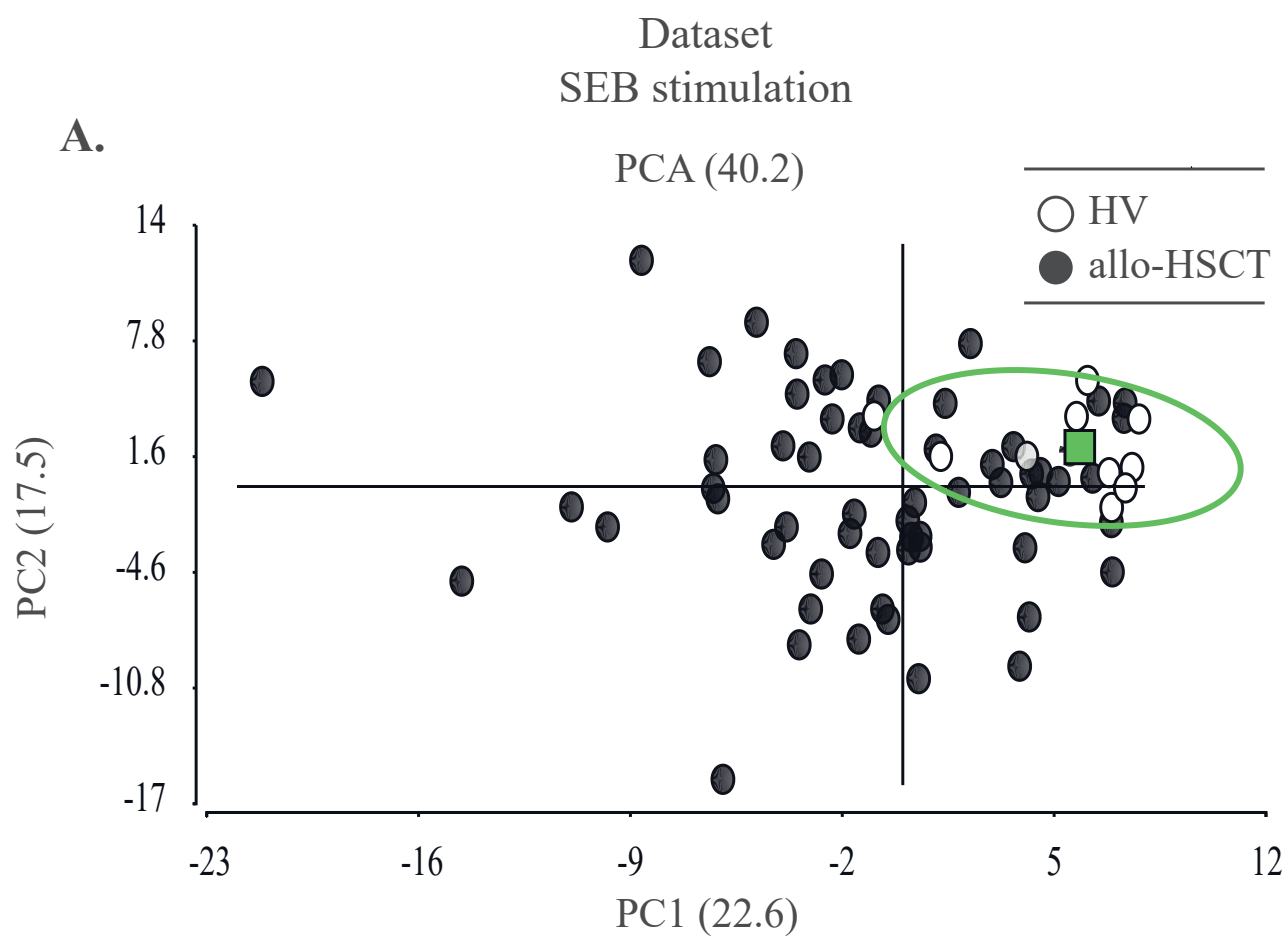
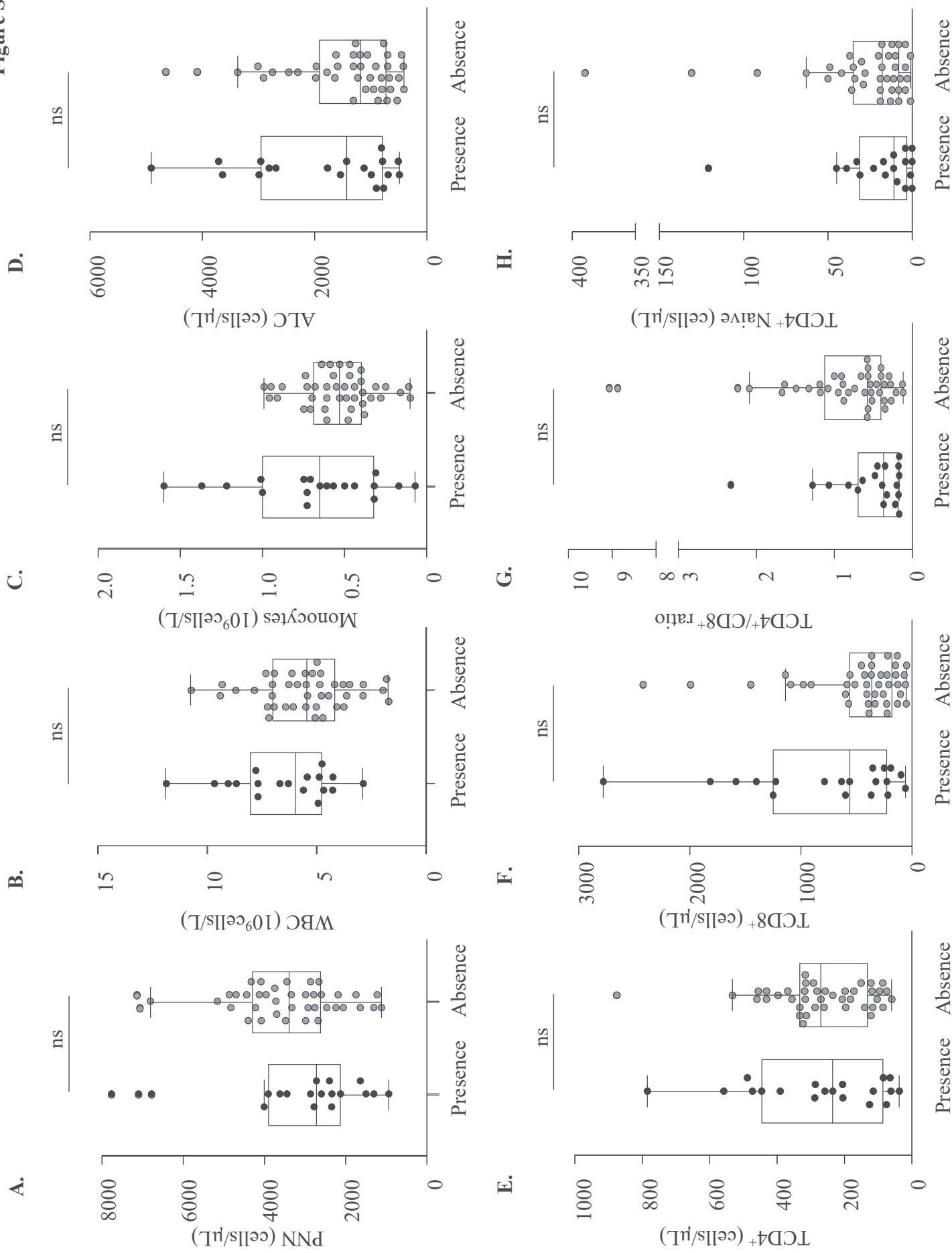


Figure S2



Supplementary methods

Experimental pipeline

The pipeline to complete the analysis from blood collection to clustering required 60 hours. In details, 24 hours of blood stimulation, 6 hours for RNA preparation and 27 hours for RNA detection using NanoString protocol and 3 hours of analysis and clustering.

Gene expression analysis

Activation score

An activation score for each biological network was adapted from previous publication⁴⁴. Briefly, activation score were generated by summing for each of biological networks the fold change expression (FC, stimulated/unstimulated) of each gene divided by the median of FC expression in the HV population.

- e.g. Biological network λ composition: Gene X_1 ; Gene X_2 ; Gene X_3 ...
- Fold change stimulated/unstimulated (FC)
 - Activation score of biological network λ per population:

$$\sum \text{medianFCX}_1 + \text{medianFCX}_2 + \text{medianFCX}_3 \dots$$

Supplementary Table S2. Association of biological- or transplant-related factors with Euclidean distance calculated from HV population centroid to each allo-HSCT individuals projected onto PCA

Stimulation condition	Clinical variable	No Euclidean distance median [Q1-Q3] Allo-HSCT n=	Yes Euclidean distance median [Q1-Q3] Allo-HSCT n=	<i>p.value</i> (Wilcoxon test)
LPS	Ongoing immunosuppressive treatment	7.51 [4.55-10.94] n= 41	11.1 [9.08-15.49] n= 19	0.25
	Recipients > 60 years old	10.26 [5.95-12.64] n= 45	7.75 [4.25-12.58] n= 15	0.85
	Sex - Male	10.5 [5.21-11.78] n= 26	8.83 [4.97-12.93] n= 34	0.94
	Acute myeloid leukemia	10.48 [4.75-14.08] n= 29	9.83 [5.58-11.01] n= 31	0.85
	Complete remission	13.36 [12.1-14.32] n= 4	8.83 [4.62-11.65] n= 54	0.47
	Myeloablative conditioning regimen	9.57 [5.01-12.48] n= 22	10.31 [4.97-12.37] n= 38	0.85
	Total body irradiation	9.99 [5.4-11.1] n= 42	8.63 [4.66-13.07] n= 18	0.85
	Anti-thymocyte globulin treatment	10.69 [3.78-12.77] n= 26	9.57 [6.79-12.25] n= 34	0.85
	Peripheral blood stem cells	7.33 [3.73-11.97] n= 11	10.14 [5.95-12.64] n= 49	0.85
	Haploidentical donor	9.57 [5.06-11.09] n= 48	13.06 [4.86-14.23] n= 12	0.85
	Acute GvHD	9.92 [5.98-12.77] n= 18	9.99 [4.62-12.48] n= 42	0.85
	Chronic GvHD	9.99 [4.71-12.85] n= 52	9.79 [8.08-11.37] n= 8	0.85
	Tcells CD4+ > 200 cells/ μ L	8.19 [4.88-12.64] n= 23	10.48 [4.89-12.64] n= 37	0.85
	Tcells CD4+/CD8+ ratio >1	10.26 [5.22-13.09] n= 45	7.04 [4.67-11.01] n= 15	0.85

Stimulation condition	Clinical variable	No Euclidean distance median [Q1-Q3] Allo-HSCT n=	Yes Euclidean distance median [Q1-Q3] Allo-HSCT n=	<i>p.value</i> (Wilcoxon test)
SEB	Ongoing immunosuppressive treatment	7.94 [3.36-10.64] n= 41	11.4 [7.76-13.57] n= 19	0.10
	Recipients > 60 years old	8.8 [5.99-12.22] n= 45	8.44 [2.78-11.55] n= 15	0.81
	Sex - Male	8.62 [5.06-11.91] n= 26	8.72 [5.17-12.16] n= 34	0.98
	Acute myeloid leukemia	9.02 [4.65-12.81] n= 29	8.03 [6.27-11.56] n= 31	0.98
	Complete remission	11.37 [6.19-16.42] n= 4	8.71 [4.67-11.91] n= 54	0.81
	Myeloablative conditioning regimen	8.81 [5.2-11.64] n= 22	8.24 [5.17-12.15] n= 38	0.98
	Total body irradiation	8.53 [5.7-11.91] n= 42	9.17 [4.67-12.25] n= 18	0.98
	Anti-thymocyte globulin treatment	8.37 [3.62-11.61] n= 26	8.72 [6.63-12.3] n= 34	0.81
	Peripheral blood stem cells	7.21 [4.7-11.43] n= 11	8.8 [5.61-11.95] n= 49	0.98
	Haploidentical donor	8.72 [4.95-11.84] n= 48	8 [5.27-13.65] n= 12	0.98
	Acute GvHD	9.4 [6.92-13.29] n= 18	7.99 [4.81-11.91] n= 42	0.81
	Chronic GvHD	8.71 [4.72-12.27] n= 52	8.45 [7.26-9.61] n= 8	0.98
	Tcells CD4+ > 200 cells/ μ L	9.75 [6.28-12.46] n= 23	8.03 [4.75-11.4] n= 37	0.81
	Tcells CD4+/CD8+ ratio >1	8.96 [5.99-12.22] n= 45	7.94 [4.52-11.51] n= 15	0.81

Stimulation condition	Clinical variable	No Euclidean distance median [Q1-Q3] Allo-HSCT n=	Yes Euclidean distance median [Q1-Q3] Allo-HSCT n=	<i>p.value</i> (Wilcoxon test)
LPS+SEB	Ongoing immunosuppressive treatment	11.34 [5.14-14.39] n= 41	15.37 [13.2-20.29] n= 19	0.029
	Recipients > 60 years old	13.48 [9.45-15.89] n= 45	9.91 [5.04-16.4] n= 15	0.87
	Sex - Male	13.25 [7.09-16.24] n= 26	13.1 [7.74-15.08] n= 34	0.91
	Acute myeloid leukemia	14.39 [6.32-18.65] n= 29	12.85 [9.14-14.86] n= 31	0.87
	Complete remission	17.45 [12.87-21.58] n= 4	12.82 [5.9-15.76] n= 54	0.23
	Myeloablative conditioning regimen	13.2 [8.41-16.11] n= 22	12.92 [6.54-15.76] n= 38	0.81
	Total body irradiation	12.82 [9.42-15.76] n= 42	14.45 [6.58-16.11] n= 18	0.87
	Anti-thymocyte globulin treatment	13.91 [4.99-15.37] n= 26	12.64 [10.01-16.42] n= 34	0.87
	Peripheral blood stem cells	11.25 [6.04-14.45] n= 11	13.35 [9.41-16.36] n= 49	0.87
	Haploidentical donor	12.82 [8.9-15.5] n= 48	14.86 [5.61-19.88] n= 12	0.87
	Acute GvHD	13.79 [9.53-15.35] n= 18	12.64 [5.9-16.24] n= 42	0.87
	Chronic GvHD	13.07 [6.18-16.42] n= 52	13.16 [11.75-13.57] n= 8	0.87
	Tcells CD4 ⁺ > 200 cells/ μ L	13.35 [7.2-15.96] n= 23	12.8 [7.37-15.89] n= 37	0.87
	Tcells CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio >1	13.57 [9.45-16.6] n= 45	11.53 [6.25-14.42] n= 15	0.87

3. TROISIEME PUBLICATION : A cross-sectional study of varicella zoster virus (VZV) specific cell-mediated immunity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation to enhance prevention of VZV reactivation

Les réactivations virales sont courantes dans le contexte de l'immunodéficience observée post transplantation de CSH et peuvent engendrer de sévères complications. La réponse des lymphocytes T étant essentielle pour le contrôle à médiation cellulaire des virus, l'importante carence initiale en lymphocytes T (CD4⁺ et CD8⁺) et la déficience à long terme des lymphocytes T CD4⁺ induite par le conditionnement pré-greffe ainsi que le délai prolongé de reconstitution cellulaire quantitative, expose les patients à de nombreuses réactivations virales, et ce malgré des mesures d'isolement et d'hygiène renforcées. Un risque particulier provient des virus latents qui peuvent persister silencieusement chez le patient ou être introduit dans l'organisme du receveur au travers des cellules transplantées comme le virus d'Epstein-Barr (EBV), le cytomégalo virus (CMV), l'herpès virus-6 (HHV-6) ou encore le virus de la varicelle et du zona (VZV) (175,178,286).

La réactivation virale VZV (zona) se manifeste sous la forme d'infection localisée causant des éruptions cutanées et provoquant une douleur neurologique intense et persistante. Néanmoins, des manifestations sévères et atypiques (encéphalite, hépatite, paralysie faciale, rétinite) sont fréquemment rapportées pour les patients immunodéprimés post allogreffe de CSH en comparaison à la population générale et peuvent être la cause d'importante morbidité/mortalité, notamment en cas de dissémination dans la cavité abdominale ou cérébrale. La réactivation virale peut apparaître au cours des 24 premiers mois post greffe. Ce délai peut être rallongé dans les cas de maintien de traitement immunosuppresseur ou de la survenue d'une GvHD.

Bien que le traitement préventif standard appliqué lors de la première année post greffe, par prophylaxie à l'acyclovir ou le valacyclovir, réduit efficacement la réactivation du VZV, il n'offre cependant pas une protection complète, la maladie pouvant apparaître plusieurs années après la transplantation. De plus, de nombreuses questions subsistent à propos de cette prophylaxie concernant sa durée d'application et le moment optimal pour un arrêt sans risque pour le patient. La prophylaxie vaccinale est également une option afin de réduire le risque de réactivation.

Néanmoins, de nombreuses conditions restrictives sont à respecter. La vaccination peut être pratiquée uniquement chez les patients séronégatifs au VZV, de plus s'agissant d'un vaccin vivant atténué, il ne peut être administré qu'après un intervalle d'au moins deux ans après la greffe et uniquement chez les patients ne présentant ni de cGvHD, ni d'immunosuppression en cours avec un arrêt des traitements immunosuppresseurs depuis au moins 3 mois. Ces recommandations ne permettent donc pas de réduire le risque de réactivation par la vaccination au cours des premières années post greffe, là où l'immunosuppression est la plus importante pour le patient.

Il est donc essentiel de pouvoir rapidement et efficacement mesurer la mémoire immunitaire des patients vis-à-vis du VZV afin d'adapter les prophylaxies vaccinales et thérapeutiques (dosage, durée) et d'effectuer une surveillance individuelle.

Dans cette étude, nous avons utilisé trois types de tests immunitaires fonctionnels afin de répondre à cet objectif. Nous avons pour cela effectué, sur 17 prélèvements de volontaires sains et 60 prélèvements de patients post allogreffe de CSH, une stimulation *ex vivo* de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) pendant 7 jours. Nous avons ensuite mesuré les capacités de sécrétion de l'Interféron-gamma (IFN- γ) et de prolifération des lymphocytes T spécifiques au VZV. La mesure de la prolifération post stimulation est la méthode de référence employée aux Hospices Civils de Lyon afin d'évaluer la réponse cellulaire vis-à-vis de différentes cibles antigéniques telles que la toxine tétanique. Cependant, cette méthode est relativement lourde et chronophage limitant son utilisation à certains contextes cliniques particuliers tels que les DIP. Pour permettre une plus large utilisation en routine clinique, nous avons mis au point un nouveau test de fonction immunitaire rapide et reproductible permettant de mesurer en 24 heures la réponse cellulaire spécifique du VZV à partir d'un petit volume de sang total. L'objectif était d'identifier les sujets possédant une mémoire immunitaire spécifique contre le VZV via une méthode de PCR quantitative (qPCR) en mesurant à partir de l'ARNm l'expression du gène de l'interféron gamma (*IFNG*). Nous avons ensuite corrélé les données générées par les différentes méthodes de mesures de la fonction immunitaire avec les numérations de différents sous-types cellulaires, les données sérologiques et les données cliniques de chaque patient.

En se basant sur la sécrétion d'IFN- γ nous avons ainsi pu identifier 15 patients (26 %) capables de répondre à la stimulation. Ces patients présentaient également des taux d'IgG spécifiques au VZV et des capacités de prolifération des lymphocytes CD3+ significativement plus importantes. De manière intéressante, une augmentation significative de l'expression du gène *IFNG* était également observée après 24 h de stimulation en sang total pour ces individus. Dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence une cohérence entre l'expression du gène de l'*IFNG* à 24 heures et les capacités de prolifération et de sécrétion de l'IFN- γ des lymphocytes à 7 jours post stimulation avec l'antigène du VZV. Ceci témoigne d'une immunité cellulaire contre le VZV chez les sujets répondeurs.

La rapidité et la simplicité de mise en place de cette méthode pour mesurer la fonction immunitaire sur sang total offre de nombreuses perspectives dans la gestion, de plus en plus personnalisée, des patients immunodéprimés dans le contexte de l'allogreffe, mais également dans d'autres contextes cliniques où la réactivation virale est sévèrement néfaste pour le patient (greffes d'organes solides, VIH, myélomes). Cette méthode pourrait notamment aider à l'optimisation des prophylaxies vaccinales et thérapeutiques par une adaptation des stratégies au cas par cas.

L'ensemble de ces investigations a fait l'objet de l'article « **A cross-sectional study of varicella zoster virus (VZV) specific cell-mediated immunity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation to enhance prevention of VZV reactivation** », en cours de révision dans la revue scientifique « *Frontiers in immunology* ».

Publication

A cross-sectional study of varicella zoster virus (VZV) specific cell-mediated immunity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation to enhance prevention of VZV reactivation

Mathilde Boccard* ; Anne Conrad* ; **William Mouton*** ; Florent Valour ; Chantal Roure-Sobas ; Emilie Frobert ; Vincent Alcazer ; Hélène Labussière-Wallet ; Hervé Ghesquières ; Fabienne Venet ; Karen Brengel-Pesce ; Sophie Trouillet-Assant ; Florence Ader

*Equally contributed to this work

2021

Under review in Frontiers in immunology 2022

1 **A Simple-to-Perform *ifn-γ* mRNA Gene Expression Assay on Whole**
2 **Blood Accurately Appraises Varicella Zoster Virus (VZV) Specific**
3 **Cell-Mediated Immunity after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell**
4 **Transplantation**

5 **Mathilde Boccard^{1,2†}, Anne Conrad^{1,2†}, William Mouton^{1,3†}, Florent Valour^{1,2}, Chantal Roure-**
6 **Sobas⁴, Emilie Frobert^{1,4}, Vincent Alcazer^{1,5}, Hélène Labussière-Wallet⁵, Hervé Ghesqui  res^{1,5},**
7 **Fabienne Venet^{1,3,6,7}, Karen Brengel-Pesce³, Sophie Trouillet-Assant^{1,3}, Florence Ader^{1,2*} on**
8 **behalf of the Lyon HEMINF study group**

9 ¹Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Inserm U1111, Université Claude
10 Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, Lyon, France

11 ²D  partement des Maladies infectieuses et tropicales, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de
12 Lyon, Lyon, France

13 ³Laboratoire de Recherche Commun (LCR), Hospices Civils de Lyon/BioMérieux, Pierre-Bénite,
14 France

15 ⁴Institut des Agents Infectieux, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

16 ⁵D  partement d'Hématologie clinique, Centre Hospitalier Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon,
17 Pierre-Bénite, France

18 ⁶Laboratoire d'Immunologie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

19 ⁷EA7426 UCBL1-HCL-bioMérieux Pathophysiology of Injury-induced Immunosuppression, Lyon,
20 France

21 **†These authors have contributed equally to this work and share first authorship**

22 ***Correspondence:**

23 Florence Ader, M.D., Ph.D.

24 florence.ader@chu-lyon.fr

25 **Keywords: Varicella zoster virus, hematopoietic stem cell transplantation, cell-mediated**
26 **immunity, immune functional assays, interferon gamma, antiviral prophylaxis**

27

28 **Abstract**

29 Herpes zoster, which is due to the reactivation of Varicella zoster virus (VZV), is a leading cause of
30 morbidity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). While cell-mediated
31 immunity (CMI) is critical to inhibit VZV reactivation, CMI is not routinely assessed due to a lack of
32 reliable tests. In this study, we aimed to evaluate VZV-specific CMI among allo-HSCT recipients
33 (n=60) and healthy individuals (HI, n=17) through a panel of three immune functional assays (IFA)
34 after *ex vivo* stimulation by VZV antigen: quantification of (i) IFN- γ release in the supernatants and
35 (ii) T-cell proliferation after a 7-day stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and
36 (iii) measurement of the *ifn- γ* mRNA gene expression level after 24 hours of stimulation of a whole
37 blood sample. VZV-responsiveness was defined according to IFN- γ release from VZV-stimulated
38 PBMC. Upon VZV-stimulation, we found that allo-HSCT recipients at a median time of 6 [5-8] months
39 post-transplant had lower IFN- γ release (median [IQR], 0.34 [0.12-8.56] vs 409.5 [143.9-910.2] pg/mL,
40 $P < .0001$) and fewer proliferating T-cells (0.05 [0.01-0.57] % vs 8.74 [3.12-15.05] %, $P < .0001$) than
41 HI. A subset of allo-HSCT recipients (VZV-responders, n=15/57, 26%) distinguished themselves from
42 VZV-non-responders (n=42/57, 74%; missing data, n=3) by higher IFN- γ release (80.45 [54.3-312.8]
43 vs 0.22 [0.12-0.42] pg/mL, $P < .0001$) and T-cell proliferation (2.22 [1.18-7.56] % vs 0.002 [0.001-
44 0.11] %, $P < .0001$), suggesting recovery of VZV-specific CMI. Interestingly, VZV-responders had a
45 significant fold-increase in *ifn- γ* gene expression, whereas *ifn- γ* mRNA was not detected in whole blood
46 of VZV-non-responders ($P < .0001$). This study is the first to suggest that measurement of *ifn- γ* gene
47 expression in 24h-stimulated whole blood could be an accurate test of VZV-specific CMI. The routine
48 use of this immune functional assay to guide antiviral prophylaxis at an individual level remains to be
49 evaluated.

50 **Original Research Article**51 **1 Introduction**

52 Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) recipients are at increased risk of
53 reactivation of latent varicella zoster virus (VZV) infection, with up to half of patients experiencing
54 herpes zoster (HZ) during the first 5 years post-transplant (1–4). In addition, HZ may be more severe
55 after allo-HSCT, and exposes recipients to complications ranging from post-herpetic neuralgia to
56 threatening disseminated disease (4–7). Although there is no immunological correlate of protection, T-
57 cell response is thought to be the main driver of immune-mediated control of latent VZV infection (8–
58 12). Indeed, the risk of HZ is highest during the first 24 months post-transplant, period which
59 corresponds to the phase of reconstitution of adaptive immunity after allo-HSCT (1–4,13–15).
60 Vaccination might be an interesting option to enhance VZV immunity. However, the recombinant
61 subunit zoster vaccine (RZV) is not available in many countries while the live-attenuated VZV
62 vaccines are contra-indicated during the first 24 months post-transplant. Data regarding
63 immunogenicity and safety of these vaccines are scarce in this setting. Pending recovery of VZV-
64 specific immunity, complementary prophylactic strategies are thus essential to prevent VZV disease.

65 Currently, prevention of VZV disease in seropositive allo-HSCT recipients relies on antiviral
66 prophylaxis with (val)acyclovir or famciclovir recommended for at least 12 months post-transplant or
67 longer in case of protracted immune recovery (6,16). Duration of antiviral prophylaxis may be different
68 from a recipient to another raising the issue of the optimal timing of discontinuation (16,17). An
69 informative test of VZV-specific cell-mediated immunity status could therefore help to manage VZV
70 prophylaxis at a personalized level.

71 VZV-specific cell-mediated immunity can be assessed by immune functional assays (IFA) which
72 evaluate cellular immune responses to *in vitro* stimulation by VZV antigens. These assays can be
73 performed on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or whole blood samples, and different
74 readouts of VZV-specific cell-mediated immunity can be used, such as evaluation of lymphocyte
75 proliferative response or quantification of interferon (IFN)- γ secretion (IFN- γ release assay, IGRA)
76 (18–23). Nevertheless, assays on PBMC are cumbersome, time- and resource-consuming, so that they
77 are not routinely performed. A fast, reproducible IFA monitoring VZV-specific immunity out of a
78 small volume of whole blood sample is of major interest to discriminate recipients having VZV-
79 specific efficient immune response. We hypothesized that upstream measurement of *ifn- γ* gene
80 expression in 24h-stimulated whole blood might correlate with VZV-specific cell-mediated immune
81 status, as determined by standard IFA performed on PBMC. In this proof-of-concept, cross-sectional
82 study, we determined the VZV-specific cell-mediated immune status of a cohort of adult allo-HSCT
83 recipients at approximately 6 months post-transplant using three methods: an innovative *ifn- γ* mRNA
84 gene expression assay from a small whole blood sample, an automatized enzyme-linked
85 immunosorbent IGRA and an *ex vivo* lymphocyte proliferation assay, both performed on participant
86 PBMC.

87

88 **2 Materials and methods**89 **2.1 Study Population**

90 Consecutive, adult allo-HSCT recipients transplanted at the hematology department of the
91 Lyon university hospital (France) and participating in the prospective, single-center “VaccHemInf”

92 cohort study between May 2018 and August 2020 were enrolled. The VaccHemInf cohort study aims
93 at studying vaccine response and immune reconstitution in HSCT recipients, as described elsewhere
94 (24). Briefly, at inclusion, demographic, hematological and transplant-related characteristics of allo-
95 HSCT recipients were collected. Immune reconstitution was assessed at a quantitative level
96 (immunophenotyping of lymphocyte subsets, dosing of immunoglobulins) and at a functional level by
97 IFA for an arbitrarily chosen subset of patients (approximately one patient in two). At our center, stem
98 cell grafts are T-cell replete but recipients might receive antithymocyte globulin (ATG), depending on
99 HSCT protocols. VZV-related clinical manifestations were retrospectively retrieved through medical
100 charts. According to local procedures, antiviral prophylaxis by oral valacyclovir 500 mg bid was
101 initiated at allo-HSCT and continued for at least 12 months. The study has been approved by a regional
102 review board (*Comité de Protection des Personnes Sud-Est V*, Grenoble, France, number
103 69HCL17_0769) and is registered in ClinicalTrials.gov (NCT03659773).

104 Concomitantly, blood samples from healthy individuals (HI), recruited among donors to the Lyon
105 (France) blood bank (*Etablissement Français du Sang*, EFS), were obtained to serve as controls.
106 According to the EFS standardized procedures for blood donation and to provisions of the articles
107 R.1243–49 and following ones of the French public health code, a written non-opposition to the use of
108 donated blood for research purposes was obtained from HI. The blood donors' personal data were
109 anonymized before transfer to the research laboratory. Regulatory authorizations for the handling and
110 conservation of these samples were obtained from the regional review board (*Comité de Protection des*
111 *Personnes Sud-Est II*) and the French ministry of research (Ministère de l'Enseignement supérieur, de
112 la Recherche et de l'Innovation, DC-2008–64).

113 2.2 Quantification of VZV antibodies

114 VZV-specific immunoglobulin (Ig)G were measured in sera by a chemiluminescence immunoassay
115 (VZV IGG, LIAISON[®] XL; DiaSorin, Saluggia, Italy) according to the manufacturers' instructions.
116 An IgG antibody titer ≥ 150 mIU/mL was considered positive (25).

117 2.3 IFN- γ release assay and T-cell proliferation measured on VZV-stimulated peripheral blood 118 mononuclear cells

119 As previously described, fresh PBMC were purified from a heparin-coated blood tube (24). Fresh
120 PBMC were plated onto a 96-well plate at 1×10^5 cells per well and incubated at 37°C and 5% of CO₂
121 overnight. PBMC were then stimulated with either VZV grade 2 antigen, a gamma-irradiated antigen
122 preparation corresponding to the supernatants of a VZV-infected cell line (MRC-5 cells; Microbix
123 Biosystems, Mississauga, Ontario, Canada), or MRC-5 control antigen (supernatants from uninfected
124 MRC-5 cells, CTRL) at 20 μ g/L, or medium alone (non-stimulated control, NUL) for 7 days. A three
125 days stimulation with phytohemagglutinin (PHA; Remel, Oxoid, Thermo Fisher Scientific, Watham,
126 MA, USA) at 4 μ g/L served as mitogen control and medium alone (NUL) as its related negative control
127 condition. Concentrations of stimulants, as well as length of incubation, had been determined by
128 preliminary assays (data not shown).

129 At each time-point, IFN- γ was measured in PBMC supernatants using the ELLA nanofluidic system
130 (Biotechne, Minneapolis, MI, USA) according to the manufacturers' instructions. All values below the
131 lowest limit of quantification (LLOQ = 0.17 pg/mL) provided by the manufacturer were reduced to a
132 value equal to LLOQ/ $\sqrt{2}$ (= 0.12 pg/mL). Patients were classified in "VZV-responders" and "VZV-
133 non-responders" according to the concentration of IFN- γ in supernatants from VZV-stimulated PBMC,
134 with a positivity threshold arbitrarily fixed at twice (4.83 pg/mL) the highest secretion obtained in the
135 control condition (2.415 pg/mL).

136 Pellets collected from paired wells were analyzed for T-cell proliferation using the Click-It® EdU
 137 AF488 flow kit (C10420; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) to measure incorporation of 5-
 138 ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) according to the previously published protocol (26). Briefly, the
 139 percentage of EdU⁺ proliferating cells (among CD3⁺ cells) was obtained by flow cytometry analyses
 140 performed on a Navios flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). For each experiment, a
 141 minimum of 2.5 x 10³ CD3⁺ cells were recorded. Data were analyzed using Kaluza software (version
 142 1.2, Beckman Coulter). Values equal to “zero” proliferation were set to 0.01% to be plottable on a
 143 logarithmic scale.

144 2.4 *ifn-γ* mRNA gene expression assay on VZV-stimulated whole blood

145 Heparinized whole blood (100 μL) was distributed into a 96-well plate. VZV antigen at 20 μg/L (VZV),
 146 medium alone (non-stimulated control, NUL) or supernatants from uninfected MRC-5 cells (negative
 147 control, CTRL) were added to a single well and incubated 24 hours at 37°C and 5% of CO₂. Total RNA
 148 was extracted using the RNeasy Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the
 149 manufacturer’s instructions. Briefly, the cells were harvested and lysed in RLT buffer (lysis buffer)
 150 supplemented with β-mercaptoethanol and stored at -80°C until further processing. RNA quantity and
 151 quality were determined using Nanodrop (Thermofisher Scientific, MA, USA). For mRNA detection,
 152 RNA was retro-transcribed using SuperScript VILO cDNA Synthesis kit (Thermofisher) followed by
 153 qPCR performed using commercial Taqman probes for *ifn-γ* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and
 154 normalized using the mean of *PPIB* and *DECR1* housekeeping genes on CFX Connect Real-Time
 155 (RT)-PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Relative differential expression of *ifn-γ*
 156 gene was expressed as a fold change using the 2-ΔΔCt method (27). The first ΔCt is the difference in
 157 threshold cycle between *ifn-γ* gene and the geometric mean of housekeeping in all conditions (VZV,
 158 CTRL or NUL). The ΔΔCt is the difference of *ifn-γ* gene ΔCt obtained in stimulated conditions (VZV
 159 or CTRL) compared to the unstimulated control condition (NUL).

160 2.5 Post-transplant T-cell immunophenotyping

161 A large panel of T-cell membrane markers was measured by flow cytometry (Beckman Coulter,
 162 Villepinte, France) on whole blood. Naïve (CD45RA⁺CCR7⁺) CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, central memory
 163 (CD45RA⁻CCR7⁺) CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, effector memory (CD45RA⁻CCR7⁻) CD4⁺ and CD8⁺ T-
 164 cells and differentiated memory (CD45RA⁺CCR7⁻) CD4⁺ and CD8⁺ T-cells were counted (cells/μL),
 165 in addition to routine absolute CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte counts.

166 2.6 Statistical analysis

167 Qualitative variables were expressed as counts (percentages) and quantitative continuous data were
 168 expressed as mean and range or as median and interquartile range [IQR]. Quantitative non-gaussian
 169 data were compared using the Kruskal-Wallis test or the Mann-Whitney test, where appropriate.
 170 Qualitative data were compared between groups using Fisher’s exact test. Association between
 171 quantitative data was quantified by a non-parametric Spearman rank-correlation coefficient (95%
 172 confidence interval [CI]). Two-sided tests were performed with statistical significance defined by *P* <
 173 .05. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism® software (version 8.3; GraphPad
 174 software, La Jolla, CA, USA) and R (version 3.4.4; R Foundation for Statistical Computing, Vienna,
 175 Austria).

176

177 3 Results

178 3.1 Participant characteristics

179 HI (n=17) and allo-HSCT recipients (n=60) were included. HI and allo-HSCT recipients did not
 180 significantly differ in terms of age (median [IQR], 42 [33-51] vs 44.5 [34-60] years, $P = .39$) and sex
 181 (sex ratio, 1.1 vs 1.3, $P = .79$). Allo-HSCT recipients were enrolled at a median [IQR] time of 6 [5-8]
 182 months post-transplant. All HI were VZV-seropositive, 98% (n=58/59; missing data, n=1) and 75%
 183 (n=45/60) of allo-HSCT recipients had positive VZV IgG titers prior to transplantation and at
 184 enrollment, respectively. Nineteen (32%) allo-HSCT recipients were on immunosuppressive therapy,
 185 and 41 (68%) had received intravenous Ig infusions at a median time [IQR] of 4 [3-6] months before
 186 inclusion (Table 1). VZV IgG titers at inclusion were not higher among patients having received
 187 intravenous Ig infusions ($P = .16$).

188 3.2 Cell-mediated immunity upon phytohemagglutinin stimulation

189 First, to verify that HI and allo-HSCT recipients were able to mount a detectable immune response
 190 upon mitogen stimulation, IFN- γ in supernatants and proliferation of PHA-stimulated PBMC were
 191 determined. HI and allo-HSCT recipients developed a significantly higher IFN- γ release and
 192 percentage of EdU⁺ proliferating cells (among CD3⁺ cells) ($P < .0001$ for both) compared to control
 193 conditions indicating that these tests were appropriate to assess lymphocyte functionality in the study
 194 population. However, IFN- γ release (median [IQR], 5863 [1335-16602] vs 74884 [44574-89385], $P =$
 195 $.004$) and proliferation capacity of T-cells (median [IQR], 23.8 [14.6-33.7] % vs 39.9 [34-48.1] %, P
 196 $= .02$) were significantly lower in allo-HSCT recipients than in HI (Supplementary Figure 1).

197 3.3 VZV-specific cell-mediated immunity

198 A 7 day-stimulation of PBMC with VZV antigen resulted in a significantly lower IFN- γ release in the
 199 supernatant (median [IQR], 0.34 [0.12-8.56] vs 409.5 [143.9-910.2] pg/mL, $P < .0001$) and a
 200 significantly lower percentage of EdU⁺ proliferating cells (among CD3⁺ cells) (0.05 [0.01-0.57] % vs
 201 8.74 [3.12-15.05] %, $P < .0001$) among allo-HSCT recipients as compared to HI (Figure 1A and B).
 202 Both were highly correlated (Spearman's correlation coefficient 0.87; 95% CI [0.79-0.92]; Figure 1C).
 203 Conversely, VZV-specific T-cell proliferation was not correlated with unspecific PHA-induced T-cell
 204 proliferation (Spearman's correlation coefficient, 0.07 [95% CI, -0.2-0.34]). These results indicated
 205 that allo-HSCT recipients had an impaired VZV-specific T-cell function based on lower proliferation
 206 and IFN- γ release post-stimulation. When focusing on allo-HSCT recipients' results, two subsets were
 207 observed and classified as VZV-responders (n=15/57, 26%) or non-responders (n=42/57, 74%; missing
 208 data, n=3) based on IFN- γ secretion level above positivity threshold (Table 2). Among the VZV-
 209 responder group, a significantly higher IFN- γ release was observed, as compared to the VZV-non-
 210 responder group (median [IQR], 80.45 [54.3-312.8] vs 0.22 [0.12-0.42] pg/mL, $P < .0001$). The IFN-
 211 γ release among the VZV-responder group was lower than among HI (median [IQR], 409.5 [143.9-
 212 910.2] pg/mL), but the difference did not reach statistical significance ($P = .64$). Of note, similar
 213 observations were made for the VZV-specific proliferative response, with a significant higher
 214 proliferation capacity in the VZV-responder group, as compared to the VZV-non-responder group
 215 (median [IQR], 2.22 [1.18-7.56] % vs 0.002 [0.001-0.11] %, $P < .0001$). Proliferative response among
 216 the VZV-responder group was lower than in HI without reaching statistical significance (median [IQR],
 217 8.74 [3.12-15.05] %, $P = .76$).

218 Interestingly, 13/15 (87%) of VZV-responders had a positive VZV-specific humoral response, as
 219 depicted by higher IgG titers (median [IQR], 1382 [494.4-1577] mIU/mL), as compared to the VZV-
 220 non-responder group, where 29/42 (69%) had a positive titer (median [IQR], 383.1 [141.1-664.2]

221 mIU/mL, $P = .005$). All together, these results suggest an ongoing recovery of VZV-specific immunity
 222 in the VZV-responder group. Only 2/15 (13%) had reported HZ-compatible clinical manifestations at
 223 4- and 5-months post-transplant, respectively, while none in the VZV-non-responder group.

224 3.4 *ifn-γ* mRNA gene expression in response to whole blood VZV antigen stimulation

225 To investigate the VZV-specific immune response at the transcriptional level, the relative differential
 226 expression (fold change) of *ifn-γ* mRNA at 24 hours in VZV-stimulated whole blood was compared to
 227 that found in non-stimulated conditions. The VZV-responders according to IFN- γ secretion from
 228 PBMC (n=15) had a significant fold-increase in *ifn-γ* gene expression in whole blood (median [IQR],
 229 12.99 [5.3-79.79]), whereas relative expression of *ifn-γ* mRNA was not detected for other allo-HSCT
 230 recipients (median [IQR], 0.85 [0.55-1.44], $P < .0001$) (Figure 2A). Moreover, *ifn-γ* gene expression
 231 in allo-HSCT recipients and HI was significantly correlated with IFN- γ release and percentage of EdU⁺
 232 proliferating cells (among CD3⁺ cells) (Spearman's correlation coefficients, 0.84, 95% CI [0.75-0.9]
 233 and 0.82, 95% CI [0.73-0.89], respectively; Figure 2B and C). Overall, these results indicate a
 234 consistency between up-stream *ifn-γ* gene expression at 24 hours in VZV-stimulated whole blood and
 235 down-stream lymphocyte proliferative and IFN- γ -releasing capacities of PBMC at day 7 in response
 236 to VZV antigen.

237 3.5 Post-transplant T-cell immunophenotyping and correlation with IFN- γ release

238 The correlation between VZV-induced IFN- γ release and various T-cell subsets in allo-HSCT
 239 recipients was investigated. Although the median absolute CD4⁺ T-cell count was lower than normal
 240 values (Table 1), the IFN- γ release in response to VZV antigen was positively correlated with absolute
 241 counts of naïve (CD45RA+CCR7⁺) and central memory (CD45RA-CCR7⁺) CD4⁺ T-cells, as well as
 242 of naïve (CD45RA+CCR7⁺) CD8⁺ T-cells (Spearman rank-correlation coefficients, $r = 0.35$ (95% CI
 243 [0.08-0.57]), 0.28 (95% CI [0.02-0.52]) and 0.36 (95% CI [0.10-0.58]), respectively). When comparing
 244 VZV responders and non-responders, median naïve and central memory CD4⁺ and naïve CD8⁺ T-cell
 245 counts were significantly higher in the VZV-responder group ($P = .043$, $P = .01$, $P = .048$, respectively).
 246 Of note, no associations were observed between VZV-responsiveness and clinical determinants (Table
 247 2).

248

249 4 Discussion

250 This study provides insights into VZV-specific immune reconstitution after allo-HSCT. We found that
 251 15/57 (26%) of allo-HSCT recipients had recovered a VZV-specific IFN- γ response by 6 months post-
 252 transplant, in the absence of any HZ-related clinical event for the majority of them. Interestingly, the
 253 measurement of *ifn-γ* gene expression by qPCR at 24 hours on a small-volume whole blood sample
 254 could be as effective and less time-consuming than standard IFAs based on the quantification of
 255 lymphocyte proliferation and IFN- γ release upon VZV antigen stimulation to identify allo-HSCT
 256 recipients that have recovered VZV-specific cell-mediated immunity. In addition, we found that naïve
 257 (CD45RA+CCR7⁺) T-cell counts and central memory (CD45RA-CCR7⁺) CD4⁺ T-cell counts
 258 correlated with the reconstitution of the VZV-specific immune repertoire.

259 Reconstitution of VZV-specific immunity following allo-HSCT is mostly driven by endogenous VZV
 260 re-exposure, rather than by exogenous re-infection, and can occur with or without clinical
 261 manifestations and despite antiviral prophylaxis (20,21,28–30). Subclinical VZV reactivations are well

VZV-specific cell-mediated immunity after HSCT

262 described in immunocompromised patients (18–20,30). In the present study, the majority (13/15, 87%)
263 of VZV-responders had not presented any HZ-compatible manifestation, although *in vitro* assays
264 showed detectable VZV-specific immune cell responses. Relative to the entire cohort of allo-HSCT
265 recipients, this proportion of subclinical VZV reactivations (13/60, 22%) is overall consistent with
266 previous studies that reported 26 to 41% of subclinical VZV reactivations among adult bone marrow
267 transplant recipients (20,31).

268 Importantly, unresponsiveness to VZV was not associated with the receipt of immunosuppressive
269 treatment, suggesting that the process of immune reconstitution *per se* is individual. IFN- γ release in
270 response to VZV stimulation was correlated with naïve CD4⁺ and CD8⁺ and central memory CD4⁺ T-
271 cell subsets despite low total CD4⁺ T-cell absolute counts. This suggests that thymopoiesis contributes
272 to the reconstitution of cognate cell-mediated immune responses and an antiviral specific T-cell
273 repertoire (32), rather than survival of host- or expansion of donor derived T-cells. Therefore, detection
274 of VZV-specific cell-mediated immunity might be a surrogate marker of the reconstitution of a thymus-
275 dependent, functional T-cell pool after allo-HSCT, although quantitative naïve T-cell assessment did
276 not strongly correlate with functional response. Importantly, the total CD4⁺ T-cell count did not
277 discriminate VZV-responders from VZV-non-responders: more than half of VZV-non-responders had
278 a total CD4⁺ T-cell count above 200/ μ L, a threshold of the immunosuppressive state validated in the
279 context of human immunodeficiency virus infection, but that many clinicians use to guide antimicrobial
280 prophylaxis strategies in other settings of immunodepression. Furthermore, no hematological or
281 transplant-related characteristic was associated with VZV-responsiveness.

282 Humoral immunity to VZV, measured by IgG antibody titers, is known not to correlate with immune
283 protection and infusions of blood-derived products, in particular intravenous Ig, can lead to non-
284 interpretable results (8,20,22,33). Consistently, 29/42 (69%) of VZV non-responders had positive VZV
285 IgG values in this study. Different IFAs have been proposed to quantify VZV-specific cell-mediated
286 immunity, but there is no validated “gold standard”. VZV-specific T-cell proliferation assays,
287 performed on PBMC or whole blood (5,20,22,34,35), have several limitations. The first relates to the
288 various origins of IFN- γ production. The correlation between VZV-specific IFN- γ release and T-cell
289 subsets suggests that IFN- γ is mainly secreted by T-cells. To gain in detection sensitivity of VZV-
290 responsive T-cells at the single-cell level, the IFN- γ enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT)
291 assay has been proposed (9,29,30,36). However, in addition to be labor intensive because of the
292 multiple experimental steps from PBMC preparation to spot detection, enumeration of IFN- γ spot-
293 forming cells proves to be difficult. The second limit relates to the threshold of detection of IFN- γ .
294 Others have reported that IFN- γ release in the supernatant of whole blood incubated with live VZV
295 was not detected before 48 hours and peaked at 72 hours (22). Consequently, to test VZV status more
296 rapidly, we formulated the hypothesis that measuring upstream *ifn- γ* gene expression in 24h-stimulated
297 whole blood would predict VZV status as effectively as down-stream synthesized IFN- γ protein at day
298 7. qPCR on whole blood is relatively simple to perform, in comparison to various cell-based immune
299 functional assays. To the best of our knowledge, this is the first study assessing *ifn- γ* gene expression
300 level as a marker of VZV-specific cell-mediated immunity. As PCR techniques are widely used during
301 routine post-transplant care, the implementation of the VZV-specific *ifn- γ* gene expression assay on
302 whole blood at a lab experienced in the follow-up of allo-HSCT recipients should be relatively easy.
303 The main advantages of PCR assays are their time- and resource-sparing nature, their relative technical
304 ease as well as their reproducibility.

305 Taken together and considering that one quarter of allo-HSCT recipients had detectable VZV-specific
306 cell-mediated immunity by the time of study initiation (6 months post-transplant), measuring VZV-

VZV-specific cell-mediated immunity after HSCT

307 specific *ifn- γ* gene expression level in whole blood once every trimester after allo-HSCT could help to
308 monitor kinetics of specific immune reconstitution. If assumed as a surrogate marker of VZV-specific
309 immunity, this assay, combined to T-cell immunophenotyping, could ultimately guide antiviral
310 prophylaxis in a personalized manner. This would provide the basis for an interventional, randomized,
311 controlled trial *vs* standard of care to test the hypothesis that it is safe to stop antiviral prophylaxis
312 based on a personalized approach using the *ifn- γ* gene expression assay. The primary endpoint would
313 be the absence of HZ reactivation following prophylaxis interruption. Earlier interruption of antiviral
314 prophylaxis could avoid overtreatment, emergence of HSV cross-resistance to acyclovir and limit
315 compliance issues. Other useful applications of the *ifn- γ* gene expression assay could be proposed such
316 as determining VZV-specific immunity status in other patient groups at risk of VZV reactivation (i.e.
317 solid organ transplant recipients, multiple myeloma patients, elderly people) or evaluating cellular
318 response to VZV vaccination.

319 Beyond antiviral prophylaxis, VZV-related disease can be prevented by vaccination. The inactivated
320 RZV has demonstrated a clinical efficacy of 68.2% to prevent HZ after autologous HSCT and has been
321 recently shown in a prospective cohort study to be safe after allo-HSCT, although immunogenicity data
322 in this setting is lacking (37,38). The RZV has been recently recommended to immunocompromised
323 adults, including allo-HSCT recipients, in the USA, but is not currently available in France (39).

324 This study has limitations. The results of this proof-of-concept study require a validation cohort. We
325 report VZV-specific immunity at a single time-point (approximately 6 months post-transplant, due to
326 the design of the VaccHemInf study which aims to study response to the inactivated vaccines which
327 are recommended in this timeframe). Six months post-transplant corresponds to a pivotal period, when
328 allo-HSCT recipients are usually off immunosuppressive therapy and when immune reconstitution is
329 well underway from a quantitative point of view. We did not assess in this study kinetics of antiviral
330 immune reconstitution. We were not able to perform VZV-specific IFA on VZV-seronegative, healthy
331 controls. The choice of VZV antigen (supernatants from VZV-infected MRC-5 cells, inactivated by
332 gamma irradiation), although widely used, can be criticized due to cross-reactivity with other
333 herpesvirus, especially herpes simplex virus-1, as previously reported *in vivo* (40,41). Peptides based
334 on VZV Glycoprotein gE and immediate-early 63 might be more suitable antigens. It would also have
335 been of interest to compare the assay with the intracellular cytokine staining method or the
336 histocompatibility complex-tetramer technology such as previously described for CMV reactivation
337 (42,43); similarly, for thymopoiesis after allo-HSCT, quantitative assessment of T-cell receptor
338 rearrangement excision circles (TRECs) could have been used as an informative surrogate marker for
339 recipients, as previously described in the setting of viral reactivation (44).

340 In conclusion, as the management of immunocompromised individuals evolves to increasingly
341 personalized agendas, measurement of VZV-specific cell-mediated immunity by a fast (24h) *ifn- γ* gene
342 expression assay from a whole blood sample and immunophenotyping of T-cell subsets could help to
343 monitor antiviral immune repertoire reconstitution after allo-HSCT and ultimately enable a more
344 rationale use of antiviral prophylaxis.

345 5 Tables

346 **Table 1. Baseline characteristics of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients.**

347 *NOTE.* *Based on 2016 revisions of the World Health Organization classification of myeloid and
 348 lymphoid neoplasms; †missing value, n=1; ‡Immunosuppressive therapies included: ciclosporine
 349 (n=9), tacrolimus (n=4), corticosteroids (n=8), ruxolitinib (n=3). *Abbreviations:* ATG, antithymocyte
 350 globulin; CM, central memory; DM, differentiated memory; DLI, donor lymphocyte infusion; EM,
 351 effector memory; GvHD, graft-versus-host disease; HLA, human leukocyte antigen; IQR, interquartile
 352 range; IS, immunosuppressive; Ig, immunoglobulin; IVIG, intravenous immunoglobulins; MAC,
 353 myeloablative conditioning; NK, natural killer; NV, normal values; RIC, reduced intensity
 354 conditioning; TBI, total body irradiation; VZV, varicella zoster virus

355

Demographics	n=60
Age (years), median [IQR]	44.5 [34-60]
Male, n (%)	34 (57)
Hematological and transplant-related characteristics, n (%)	
<i>Underlying hematological disease*</i>	
Acute myeloid leukemia and related neoplasms	31 (52)
Myelodysplastic syndromes	8 (13)
Myeloproliferative neoplasms	1 (2)
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma	11 (18)
T-lymphoblastic leukemia/lymphoma	2 (3)
Mature neoplasms: T, NK, or B cells	3 (5)
Hodgkin lymphoma	1 (2)
Others	3 (5)
<i>Donor type</i>	
Matched sibling donor	18 (30)
Haploidentical related donor	12 (20)
Unrelated donor	30 (50)
Fully matched	23 (38)
HLA mismatched	7 (12)
<i>Stem cell source</i>	
Peripheral blood stem cells	48 (80)
Bone marrow	11 (18)
Cord blood	1 (2)
<i>Conditioning regimen</i>	
MAC	22 (37)
RIC	38 (63)
TBI	18 (30)
<i>GVHD prophylaxis</i>	
ATG	34 (57)
Calcineurin inhibitors	59 (98)
Mycophenolate mofetil	33 (55)
Methotrexate	14 (23)
Post-transplant Cyclophosphamide	23 (38)

VZV-specific cell-mediated immunity after HSCT

<i>Recipient VZV status prior to transplantation</i> [†]	
Positive	58 (98)
Negative	1 (2)
Post-transplant VZV IgG titers at inclusion (mIU/mL), median [IQR]	418.5 (151.2-1092)
Post-transplant complications, n (%)	
Acute GvHD	42 (70)
Grade I/II/III	28/12/2
Chronic GvHD	8 (13)
Limited/Extensive	5/3
Time from transplantation (months), median [IQR]	6 [5-8]
Immunophenotyping of lymphocyte subsets (cells/μL), mean (range)	
Lymphocytes (NV, 1000-2800/ μ L)	1601 (410-4910)
CD3 ⁺ T-lymphocytes (NV, 521-1772/ μ L)	887 (145-3406)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-lymphocytes (NV, 336-1126/ μ L)	270 (38-876)
Naïve CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁺) (NV, 121-456/ μ L)	30 (0-390)
CM CD4 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺) (NV, 92-341/ μ L)	61 (1-211)
EM CD4 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁻) (NV, 59-321/ μ L)	157 (4-704)
DM CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 11-102/ μ L)	22 (0-226)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-lymphocytes (NV, 125-780/ μ L)	580 (50-2779)
Naïve CD8 ⁺ (CD45 ⁺ CCR7 ⁺) (NV, 86-257/ μ L)	39 (0-241)
CM CD8 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺) (NV, 19-93/ μ L)	18 (0-127)
EM CD8 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁻) (NV, 15-162/ μ L)	252 (0-1517)
DM CD8 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 39-212/ μ L)	276 (0-1500)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio (NV, 0.9-6)	0.97 (0.12- 9.07)
CD20 ⁺ B-lymphocytes (NV, 64-593/ μ L)	282 (14-1439)
NK cells (NV, 70-523/ μ L)	235 (30-2023)
Immunoglobulin G titers (NV, 7-16 g/L)	8.6 (2.0-20.3)
Post-transplant immunomodulatory therapy, n (%)	
IS therapy at inclusion [‡]	19 (32)
IVIG infusion(s)	41 (68)
Time since last IVIG infusion (months), median [IQR]	4 [3-6]
DLI	8 (13)

VZV-specific cell-mediated immunity after HSCT

357 **Table 2. VZV-specific immune responses of allogeneic hematopoietic stem cell transplant**
 358 **recipients.** *NOTE.* Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (1×10^5 cells) and whole blood from
 359 allo-HSCT recipients (n=57) were stimulated by VZV antigen (inactivated supernatants from VZV-
 360 infected MRC-5 cells, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or supernatants from VZV-uninfected MRC-5 cells (control
 361 condition). IFN- γ release (pg/mL) and the percentage of EdU⁺ proliferating cells (among CD3⁺ cells)
 362 were measured after a 7-day VZV-stimulation of PBMC by immunoassay (ELLA nanofluidic system)
 363 or flow cytometry, respectively. VZV-responders were identified based on IFN- γ release strictly above
 364 4.83 pg/mL, corresponding to twice the maximum value observed in the control condition. *ifn- γ* gene
 365 expression level was measured by qPCR in a whole blood sample after 24h of VZV-stimulation. The
 366 relative differential expression between VZV-stimulation and non-stimulated conditions is given as the
 367 fold change. Immunophenotyping of lymphocyte subsets was performed by flow cytometry on whole
 368 blood. Groups were compared using the Mann-Whitney U test or the Fisher's exact test, where
 369 appropriate; *P*-values < .05 were considered statistically significant. *Data were missing for three allo-
 370 HSCT recipients. †Data were missing for three allo-HSCT recipients. ‡Immunosuppressive therapy:
 371 ciclosporine, tacrolimus, corticosteroids, ruxolitinib. *Abbreviations:* ALC, absolute lymphocyte count;
 372 AML, acute myeloid leukemia; ATG, antithymocyte globulin; CM, central memory; DM, differentiated
 373 memory; DLI, donor lymphocyte infusion; EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; EM, effector memory;
 374 GvHD, graft-versus-host disease; IFN- γ , interferon- γ ; IgG, immunoglobulin G; IQR, interquartile
 375 range; IS, immunosuppressive; N, naïve; VZV, varicella zoster virus.
 376

	VZV non-responders (n=42)*	VZV responders (n=15)	<i>P</i>
7-day VZV-stimulated PBMC, median [IQR]			
IFN- γ release (pg/mL)	0.22 [0.12-0.42]	80.45 [54.3-312.8]	<.0001
EdU ⁺ proliferating cells among CD3 ⁺ cells (%)	0.002 [0.001-0.11]	2.22 [1.18-7.56]	<.0001
24h VZV-stimulated whole blood[†], median [IQR]			
<i>ifn-γ</i> gene expression (fold change)	0.85 [0.55-1.44]	12.99 [5.30-79.79]	<.0001
Immunophenotyping of lymphocytes and subsets (cells/μL), median [IQR]			
ALC	1090 [710-2460]	1590 [1000-2130]	.421
T CD4+	232.5 [115.5-385.5]	287 [220.5-329]	.319
T CD4+ N	12.5 [4.75-22.25]	33 [14.5-38]	.043
T CD4+ CM	40 [17-80]	81 [65.5-114]	.010
T CD4+ EM	115 [80-208]	157 [116.5-192.5]	.459
T CD4+ DM	5.5 [1.75-38.75]	3.5 [0 -5.75]	.106
T CD8+	367.5 [218.75-879.25]	364 [237.5-486]	.921
T CD8+ N	16.5 [9-50.5]	44 [24-70.5]	.048
T CD8+ CM	10 [2-14.5]	16 [7-30]	.125
T CD8+ EM	160 [69.5-282.75]	157 [108.5-303]	.490
T CD8+ DM	225 [60-332]	102 [64.5-140]	.287
NK cells	157 [114-137]	146 [99.5-194]	0.39
Post-transplant VZV IgG titers at inclusion (mIU/mL), median [IQR]	383.1 [141.1-664.2]	1382 [494.4-1577]	.005

VZV-specific cell-mediated immunity after HSCT

Selected clinical variables, n (%)			
AML	20 (48)	9 (60)	.715
ATG	24 (57)	9 (60)	>.999
DLI	5 (12)	3 (20)	.422
Chronic GvHD	5 (12)	3 (20)	.422
IS therapy [‡]	15 (36)	4 (27)	.751

377

378 6 Figure Legends

379 **Figure 1. VZV-specific cell-mediated immunity according to immunoassays on peripheral blood**
380 **mononuclear cells.**

381 Peripheral blood mononuclear cells isolated (1×10^5 cells) from healthy individuals (HI, n=17) and
 382 allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients (allo-HSCT, n=57) were stimulated by VZV
 383 antigen (inactivated supernatants from VZV-infected MRC-5 cells, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or supernatants from
 384 VZV-uninfected MRC-5 cells (control condition) and incubated for 7 days in duplicate. (A) IFN- γ
 385 release (pg/mL) in the supernatants was quantified using the ELLA nanofluidic system. Bars represent
 386 median values, black dotted line represent the lower limit of quantification (LLOQ = 0.17 pg/mL), red
 387 dotted line represent the arbitrarily defined threshold of positivity of the assay, i.e. 4.83 pg/mL,
 388 corresponding to twice the maximum value observed in the control condition. All values below LLOQ
 389 have been set at 0.12 pg/mL corresponding to $\text{LLOQ}/\sqrt{2}$. (B) In respective wells, T-cells proliferation
 390 is expressed as the percentage of EdU⁺ proliferating cells (among CD3⁺ cells) measured by flow
 391 cytometry after EdU⁺ incorporation and completion of the Click-it®. Groups were compared using
 392 Kruskal-Wallis test; **** $P < .0001$. Red triangles represent recipients defined as VZV-responders, i.e.
 393 having recovered a VZV-specific cellular-mediated immunity according to the IFN- γ release assay.
 394 Clear triangles represent recipients who developed herpes zoster related manifestations. (C)
 395 Correlation analysis between T-cell proliferation and IFN- γ release results obtained from the same well
 396 was performed using Spearman rank-correlation test, the p-values and the correlation coefficient are
 397 indicated. Data were missing for three VZV-stimulated allo-HSCT recipients.

398

399 **Figure 2. Ex vivo whole blood VZV-stimulation and correlations between VZV-specific immune**
400 **functional assays.**

401 Whole blood (100 μL) from healthy individuals (HI, n=17) and allogeneic hematopoietic stem cell
 402 transplant recipients (allo-HSCT, n=57) was stimulated 24 hours by VZV antigen (inactivated
 403 supernatants from VZV-infected MRC-5 cells, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or supernatants from VZV-uninfected
 404 MRC-5 cells (control condition). (A) The relative quantification of *ifn- γ* gene expression level is
 405 presented as fold change. Red triangles represent recipients defined as VZV-responders, according to
 406 IFN- γ release in supernatants from VZV-stimulated peripheral blood mononuclear cells (see figure 1).
 407 Clear triangles represent recipients who developed herpes zoster-related manifestations. Bars represent
 408 median and p -values were obtained using the Kruskal-Wallis test; ** $P < .01$, **** $P < .0001$. (B)
 409 Correlation between *ifn- γ* mRNA gene expression (fold change) and IFN- γ release in supernatants from
 410 VZV-stimulated PBMC quantified using the ELLA nanofluidic system, using Spearman rank-
 411 correlation test. (C) Correlation between *ifn- γ* mRNA gene expression (fold change) and percentage of
 412 EdU⁺ cells (among CD3⁺) measured by flow cytometry, using Spearman rank-correlation test. Data
 413 were missing for three VZV-stimulated recipients.

414 **7 Conflict of Interest**

415 WM has a Ph.D grant CIFRE 2019 (conventions industrielles de formation par la recherche, Ministère
416 de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, Paris, France) half-funded by Lyon
417 University and half-funded by BioMerieux SA. KBP is an employee of bioMérieux SA, an in vitro
418 diagnostic company.
419 The other authors have no relevant commercial or financial relationships that could be construed as a
420 potential conflict of interest.

421 **8 Author Contributions**

422 MB contributed to conception and design of the study, to acquisition and interpretation of the data,
423 drafted the manuscript; AC and WM contributed to acquisition and interpretation of the data, drafted
424 the manuscript; CRS and EF performed the VZV serology assays and contributed to revision of the
425 paper for important intellectual content; FVa, VA, HLW, HG, KBP contributed to interpretation of the
426 data and to revision of the paper for important intellectual content; FVe contributed to acquisition of
427 the data of immune functional assays, to interpretation of the data and to revision of the paper for
428 important intellectual content; STA contributed to conception and design of the study, to acquisition
429 and interpretation of the data, and to revision of the paper for important intellectual content; FA
430 conceived and designed the study, participated in analyses and interpretation of the data, drafted the
431 manuscript. All authors have read and have approved the final version of the manuscript.

432 **9 Funding**

433 This research was funded by an internal grant from the Hospices Civils de Lyon (Appel d'Offre Jeune
434 Chercheur 2018, to A.C.) and by the the Région Auvergne-Rhône-Alpes (Pack Ambition Recherche
435 2019, to F.A.).

436 **10 Acknowledgments**

437 This work is published on behalf of the **Lyon HEMINF study group**: F. Ader, V. Alcazer, E. Bachy,
438 M. Balsat, F. Barraco, M. Boccard, A. Conrad, S. Ducastelle-Leprêtre, O. Dumitrescu, D. Dupont, V.
439 Escuret, E. Ferrant, T. Ferry, G. Fossard, E. Frobert, H. Ghesquières, M. Heiblig, E. Hodille, L. Karlin,
440 H. Labussière-Wallet, M-V. Larcher, F. Laurent, B. Lina, G. Lina, C. Malcus, G. Monneret, F. Morfin-
441 Sherpa, T. Perpoint, F. Poitevin-Later, M. Rabodonirina, C. Roure-Sobas, V. Safar, P. Sesques, S.
442 Trouillet-Assant, F. Valour, F. Venet, F. Wallet, M. Wallon.

443 The authors are grateful to the Direction de la Recherche en Santé (DRS) des Hospices Civils de Lyon,
444 as well as to the Région Auvergne-Rhône-Alpes for supporting the VaccHemInf-FIGHT cohort. The
445 authors would like to thank Philip Robinson for helpful reviewing of the manuscript and Fabien Subtil
446 and Maxime Bodinier for help in statistical analysis. The authors gratefully acknowledge the staff of
447 the Centre de Ressources Biologiques Sud and Dr Pierre Sujobert for biobanking of samples from the
448 VaccHemInf-FIGHT cohort, and the Centre de Recherche Clinique Hématologie Sud and the nurses
449 from the hematology department of the Hospices Civils de Lyon for their assistance all over the study.

450 **11 References**

- 451 1. Han CS, Miller W, Haake R, Weisdorf D. Varicella zoster infection after bone marrow
452 transplantation: incidence, risk factors and complications. Bone Marrow Transplant. 1994
453 Mar;13(3):277–83.

VZV-specific cell-mediated immunity after HSCT

- 454 2. Leung TF, Chik KW, Li CK, Lai H, Shing MMK, Chan PKS, et al. Incidence, risk factors and
455 outcome of varicella-zoster virus infection in children after haematopoietic stem cell
456 transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Jan;25(2):167–72.
- 457 3. Berman JN, Wang M, Berry W, Neuberg DS, Guinan EC. Herpes zoster infection in the post-
458 hematopoietic stem cell transplant pediatric population may be preceded by transaminitis: an
459 institutional experience. *Bone Marrow Transplant.* 2006 Jan;37(1):73–80.
- 460 4. Koc Y, Miller KB, Schenkein DP, Griffith J, Akhtar M, DesJardin J, et al. Varicella zoster virus
461 infections following allogeneic bone marrow transplantation: frequency, risk factors, and
462 clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2000;6(1):44–9.
- 463 5. Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Cell-mediated immunity to varicella-zoster virus after
464 allogeneic marrow transplant. *J Infect Dis.* 1980 Apr;141(4):479–87.
- 465 6. Styczynski J, Reusser P, Einsele H, de la Camara R, Cordonnier C, Ward KN, et al.
466 Management of HSV, VZV and EBV infections in patients with hematological malignancies
467 and after SCT: guidelines from the Second European Conference on Infections in Leukemia.
468 *Bone Marrow Transplant.* 2009 May;43(10):757–70.
- 469 7. Su SH, Martel-Laferriere V, Labbe A-C, Snyderman DR, Kent D, Laverdiere M, et al. High
470 incidence of herpes zoster in nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Biol*
471 *Blood Marrow Transplant.* 2011 Jul;17(7):1012–7.
- 472 8. Arvin AM, Moffat JF, Redman R. Varicella-zoster virus: aspects of pathogenesis and host
473 response to natural infection and varicella vaccine. *Adv Virus Res.* 1996;46:263–309.
- 474 9. Levin MJ, Oxman MN, Zhang JH, Johnson GR, Stanley H, Hayward AR, et al. Varicella-zoster
475 virus-specific immune responses in elderly recipients of a herpes zoster vaccine. *J Infect Dis.*
476 2008 Mar 15;197(6):825–35.
- 477 10. Levin MJ, Smith JG, Kaufhold RM, Barber D, Hayward AR, Chan CY, et al. Decline in
478 varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity with increasing age and boosting
479 with a high-dose VZV vaccine. *J Infect Dis.* 2003 Nov 1;188(9):1336–44.
- 480 11. Laing KJ, Ouwendijk WJD, Koelle DM, Verjans GMGM. Immunobiology of Varicella-Zoster
481 Virus Infection. *J Infect Dis.* 2018 Sep 22;218(suppl_2):S68–74.
- 482 12. Arvin AM. Humoral and cellular immunity to varicella-zoster virus: an overview. *J Infect Dis.*
483 2008 Mar 1;197 Suppl 2:S58-60.
- 484 13. Blennow O, Fjaertoft G, Winiarski J, Ljungman P, Mattsson J, Remberger M. Varicella-zoster
485 reactivation after allogeneic stem cell transplantation without routine prophylaxis--the incidence
486 remains high. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Oct;20(10):1646–9.
- 487 14. Singh M, D'Silva SZ, Saxena A. Assessment of Immune Reconstitution Following
488 Hematopoietic Stem Cell Transplantation [Internet]. *Cells of the Immune System.* IntechOpen;
489 2019 [cited 2022 Feb 2]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/69097>

VZV-specific cell-mediated immunity after HSCT

- 490 15. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, et al. Immune
491 Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol.*
492 2016;7:507.
- 493 16. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for
494 Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplant Recipients: A
495 Global Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Oct;15(10):1143–238.
- 496 17. Jamani K, MacDonald J, Lavoie M, Williamson TS, Brown CB, Chaudhry A, et al. Zoster
497 prophylaxis after allogeneic hematopoietic cell transplantation using acyclovir/valacyclovir
498 followed by vaccination. *Blood Adv.* 2016 Dec 13;1(2):152–9.
- 499 18. Luby JP, Ramirez-Ronda C, Rinner S, Hull A, Vergne-Marini P. A longitudinal study of
500 varicella-zoster virus infections in renal transplant recipients. *J Infect Dis.* 1977
501 Apr;135(4):659–63.
- 502 19. Malavige GN, Rohanachandra LT, Jones L, Crack L, Perera M, Fernando N, et al. IE63-specific
503 T-cell responses associate with control of subclinical varicella zoster virus reactivation in
504 individuals with malignancies. *Br J Cancer.* 2010 Feb 16;102(4):727–30.
- 505 20. Ljungman P, Lonnqvist B, Gahrton G, Ringden O, Sundqvist VA, Wahren B. Clinical and
506 subclinical reactivations of varicella-zoster virus in immunocompromised patients. *J Infect Dis.*
507 1986 May;153(5):840–7.
- 508 21. Boeckh M, Kim HW, Flowers MED, Meyers JD, Bowden RA. Long-term acyclovir for
509 prevention of varicella zoster virus disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation--a
510 randomized double-blind placebo-controlled study. *Blood.* 2006 Mar 1;107(5):1800–5.
- 511 22. Otani N, Baba K, Okuno T. Interferon-gamma release assay: a simple method for detection of
512 varicella-zoster virus-specific cell-mediated immunity. *J Immunol Methods.* 2009 Dec
513 31;351(1–2):71–4.
- 514 23. Terada K, Itoh Y, Fujii A, Kitagawa S, Ogita S, Ouchi K. Varicella-zoster virus-specific, cell-
515 mediated immunity with interferon-gamma release assay after vaccination of college students
516 with no or intermediate IgG antibody response. *J Med Virol.* 2015 Feb;87(2):350–6.
- 517 24. Conrad A, Boccard M, Valour F, Alcazer V, Tovar Sanchez A-T, Chidiac C, et al. VaccHemInf
518 project: protocol for a prospective cohort study of efficacy, safety and characterisation of
519 immune functional response to vaccinations in haematopoietic stem cell transplant recipients.
520 *BMJ Open.* 2019 Feb 15;9(2):e026093.
- 521 25. Maple P a. C, Rathod P, Smit E, Gray J, Brown D, Boxall EH. Comparison of the performance
522 of the LIAISON VZV-IgG and VIDAS automated enzyme linked fluorescent immunoassays
523 with reference to a VZV-IgG time-resolved fluorescence immunoassay and implications of
524 choice of cut-off for LIAISON assay. *J Clin Virol.* 2009 Jan;44(1):9–14.
- 525 26. Poujol F, Monneret G, Friggeri A, Rimmelé T, Malcus C, Poitevin-Later F, et al. Flow
526 cytometric evaluation of lymphocyte transformation test based on 5-ethynyl-2’deoxyuridine
527 incorporation as a clinical alternative to tritiated thymidine uptake measurement. *J Immunol*
528 *Methods.* 2014 Dec 15;415:71–9.

VZV-specific cell-mediated immunity after HSCT

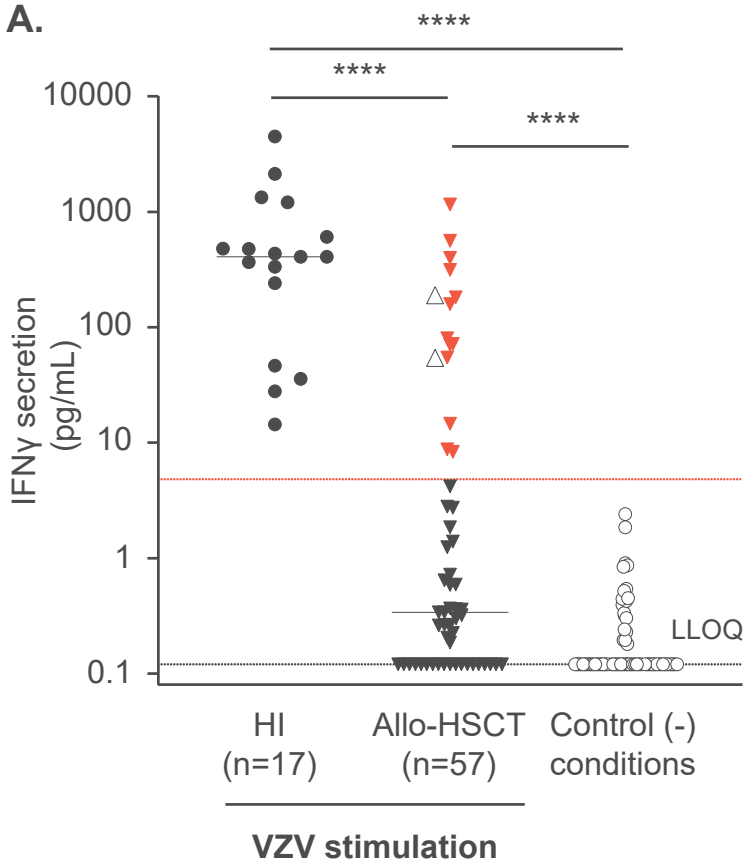
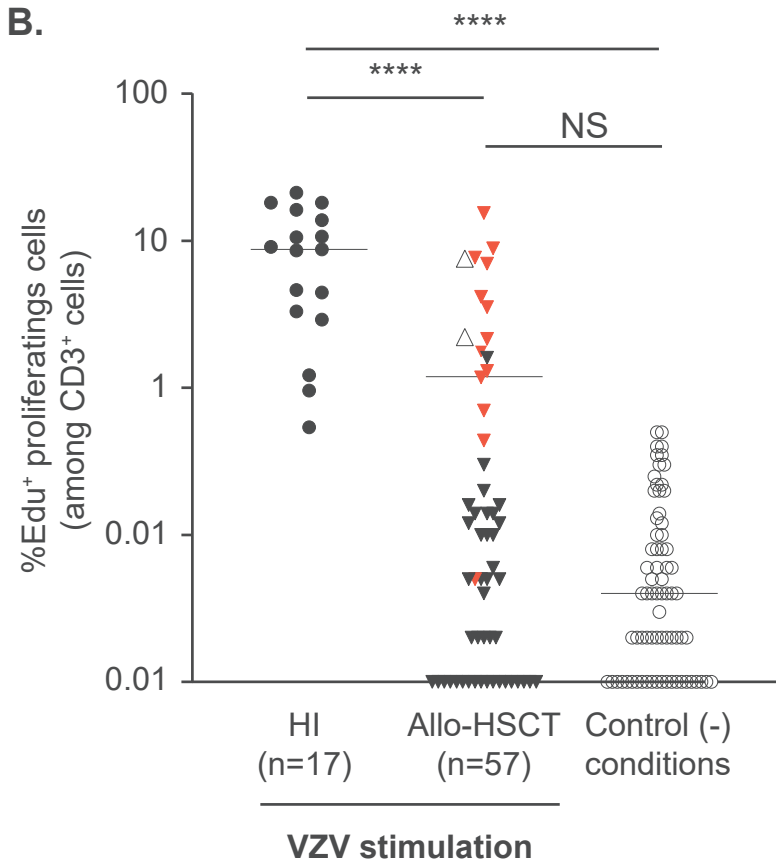
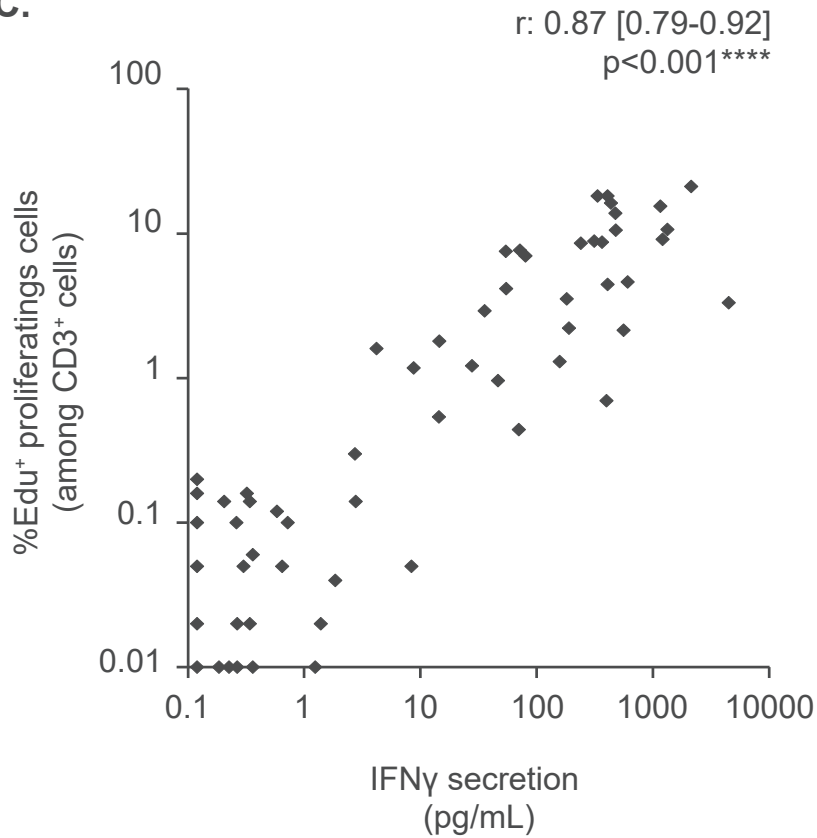
- 529 27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative
530 PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
- 531 28. Redman RL, Nader S, Zerboni L, Liu C, Wong RM, Brown BW, et al. Early reconstitution of
532 immunity and decreased severity of herpes zoster in bone marrow transplant recipients
533 immunized with inactivated varicella vaccine. *J Infect Dis*. 1997 Sep;176(3):578–85.
- 534 29. Distler E, Schnurer E, Wagner E, von Auer C, Plachter B, Wehler D, et al. Recovery of
535 varicella-zoster virus-specific T cell immunity after T cell-depleted allogeneic transplantation
536 requires symptomatic virus reactivation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008
537 Dec;14(12):1417–24.
- 538 30. Merindol N, Salem Fourati I, Brito R-M, Grenier A-J, Charrier E, Cordeiro P, et al.
539 Reconstitution of protective immune responses against cytomegalovirus and varicella zoster
540 virus does not require disease development in pediatric recipients of umbilical cord blood
541 transplantation. *J Immunol*. 2012 Nov 15;189(10):5016–28.
- 542 31. Wilson A, Sharp M, Koropchak CM, Ting SF, Arvin AM. Subclinical varicella-zoster virus
543 viremia, herpes zoster, and T lymphocyte immunity to varicella-zoster viral antigens after bone
544 marrow transplantation. *J Infect Dis*. 1992 Jan;165(1):119–26.
- 545 32. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, Brenchley JM, Hill BJ, Zhang L, et al. Assessment of thymic
546 output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell
547 reconstitution. *Lancet*. 2000 May 27;355(9218):1875–81.
- 548 33. Webster A, Grint P, Brenner MK, Prentice HG, Griffiths PD. Titration of IgG antibodies against
549 varicella zoster virus before bone marrow transplantation is not predictive of future zoster. *J
550 Med Virol*. 1989 Feb;27(2):117–9.
- 551 34. Hayashida K, Ozaki T, Nishimura N, Gotoh K, Funahashi K, Nakane K, et al. Evaluation of
552 varicella zoster virus-specific cell-mediated immunity by using an interferon- γ enzyme-linked
553 immunosorbent assay. *J Immunol Methods*. 2015 Nov;426:50–5.
- 554 35. Yang P, Chen Z, Zhang J, Li W, Zhu C, Qiu P, et al. Evaluation of Varicella-zoster virus-
555 specific cell-mediated immunity by interferon- γ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in
556 adults ≥ 50 years of age administered a herpes zoster vaccine. *J Med Virol*. 2019
557 May;91(5):829–35.
- 558 36. Salem Fourati I, Grenier A-J, Jolette É, Merindol N, Ovetchkine P, Soudeyans H. Development
559 of an IFN- γ ELISpot assay to assess varicella-zoster virus-specific cell-mediated immunity
560 following umbilical cord blood transplantation. *J Vis Exp*. 2014 Jul 9;(89).
- 561 37. Bastidas A, de la Serna J, El Idrissi M, Oostvogels L, Quittet P, López-Jiménez J, et al. Effect of
562 Recombinant Zoster Vaccine on Incidence of Herpes Zoster After Autologous Stem Cell
563 Transplantation: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2019 Jul 9;322(2):123–33.
- 564 38. Baumrin E, Izaguirre NE, Bausk B, Feeley MM, Bay CP, Yang Q, et al. Safety and
565 reactogenicity of the recombinant zoster vaccine after allogeneic hematopoietic cell
566 transplantation. *Blood Adv*. 2021 Mar 23;5(6):1585–93.

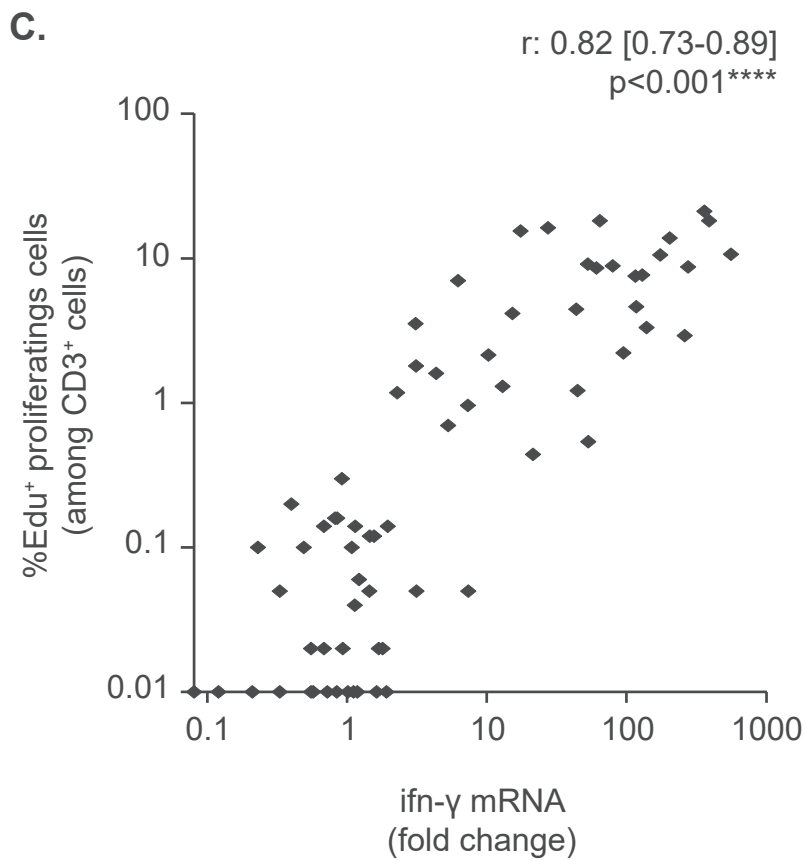
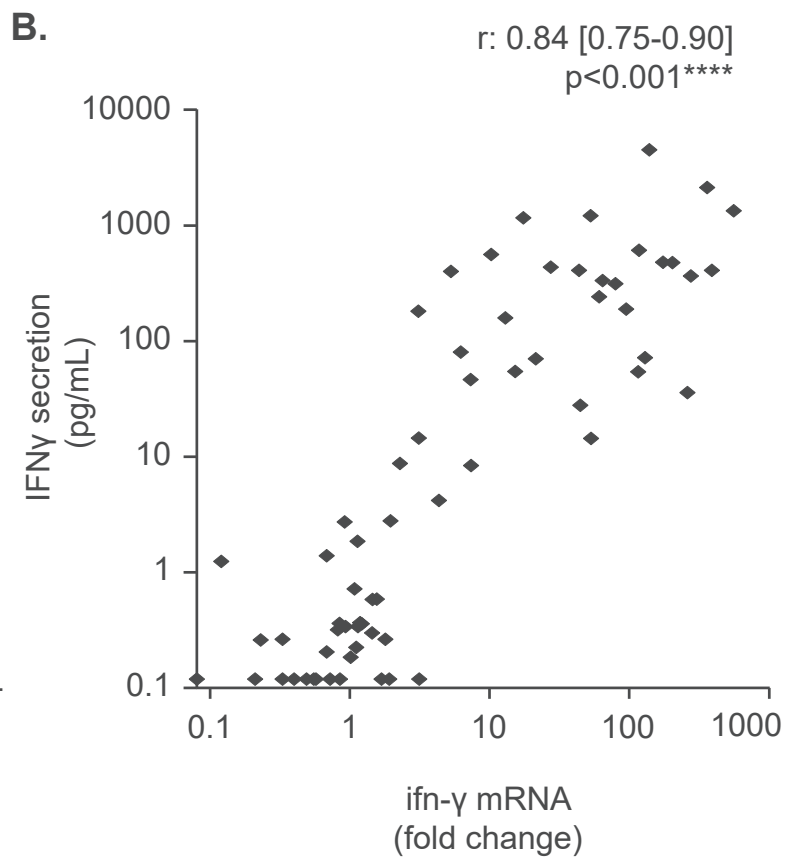
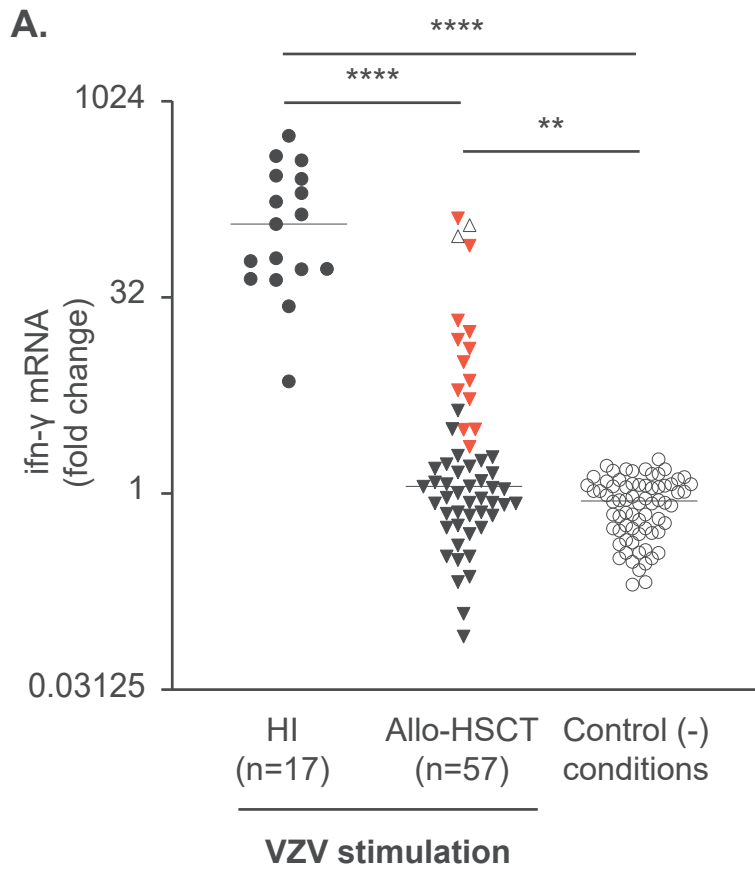
- 567 39. Anderson TC, Masters NB, Guo A, Shepersky L, Leidner AJ, Lee GM, et al. Use of
568 Recombinant Zoster Vaccine in Immunocompromised Adults Aged ≥ 19 Years:
569 Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices - United States, 2022.
570 MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2022 Jan 21;71(3):80–4.
- 571 40. Jing L, Laing KJ, Dong L, Russell RM, Barlow RS, Haas JG, et al. Extensive CD4 and CD8 T
572 Cell Cross-Reactivity between Alphaherpesviruses. *J Immunol*. 2016 Mar 1;196(5):2205–18.
- 573 41. Chiu C, McCausland M, Sidney J, Duh F-M, Roupheal N, Mehta A, et al. Broadly reactive
574 human CD8 T cells that recognize an epitope conserved between VZV, HSV and EBV. *PLoS*
575 *Pathog*. 2014 Mar;10(3):e1004008.
- 576 42. Gratama JW, van Esser JW, Lamers CH, Tournay C, Löwenberg B, Bolhuis RL, et al.
577 Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T lymphocytes in T-
578 cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for
579 progressive CMV infection. *Blood*. 2001 Sep 1;98(5):1358–64.
- 580 43. Raeiszadeh M, Pachnio A, Begum J, Craddock C, Moss P, Chen FE. Characterization of CMV-
581 specific CD4⁺ T-cell reconstitution following stem cell transplantation through the use of HLA
582 Class II-peptide tetramers identifies patients at high risk of recurrent CMV reactivation.
583 *Haematologica*. 2015 Aug;100(8):e318–22.
- 584 44. Brown JA, Stevenson K, Kim HT, Cutler C, Ballen K, McDonough S, et al. Clearance of CMV
585 viremia and survival after double umbilical cord blood transplantation in adults depends on
586 reconstitution of thymopoiesis. *Blood*. 2010 May 20;115(20):4111–9.

587

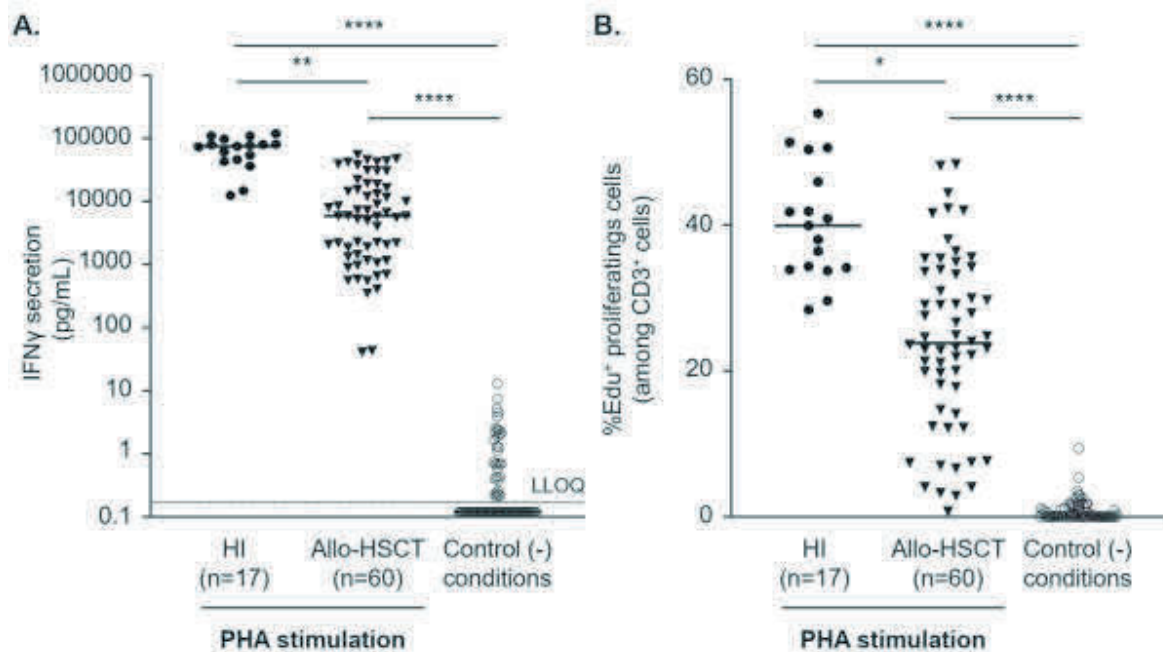
588 **12 Data Availability Statement**

589 In accordance with data protection laws, no patient-level data can be made available. Upon reasonable
590 request, aggregate data with different levels of resolution may be possible to provide.

A.**B.****C.**



Supplementary Material



Supplementary Figure 1. PHA-induced T-cell proliferation and IFN- γ release

Peripheral blood mononuclear cells isolated (1×10^5 cells) from healthy individuals (HI, $n=17$) and allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients (allo-HSCT, $n=60$) were stimulated by phytohemagglutinin (PHA) or negative control conditions (medium) and incubated for 7 days. (A) T-cells proliferation is expressed as the percentage of Edu⁺ proliferating cells (among CD3⁺ cells) measured by flow cytometry after Edu⁺ incorporation and completion of the Click-it[®]. (B) In respective wells, IFN- γ release (pg/mL) was quantified using the ELLA nanofluidic system. Bars represent median values, black dotted line represent the lower limit of quantification (LLOQ = 0.17 pg/mL). All values below LLOQ have been set at 0.12 pg/mL corresponding to LLOQ/ $\sqrt{2}$. Groups were compared using Kruskal-Wallis test; * $P < .05$, ** $P < .01$, **** $P < .0001$. Data were missing for one PHA-stimulated allo-HSCT recipient.

4. QUATRIEME PUBLICATION : Specific detection of memory T-cells in COVID-19 patients using standardized whole-blood Interferon gamma release assay

Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle central de chef d'orchestre de la réponse immunitaire antivirale, leur fonction étant critique pour le contrôle du risque infectieux et donc pour le maintien de l'intégrité du patient. Comme pour le VZV, la fonction des lymphocytes T spécifiques du SARS-CoV-2 est un facteur clé du contrôle de l'infection. Une réponse sous-optimale induite par exemple dans un contexte d'immunodépression peut contribuer à une augmentation de la sévérité de la COVID-19.

Plusieurs études ont démontré la complémentarité de l'évaluation de la réponse immunitaire humorale et cellulaire spécifique pour le SARS-CoV-2, afin d'apprécier l'immunité post infection et/ou post vaccinale. L'étude de la mémoire cellulaire est néanmoins principalement mesurée par des méthodes lourdes en terme de ressource et de temps de manipulation telles que la méthode ELISPOT ou la coloration des cytokines intracellulaire (ICS) et donc difficilement applicable en routine clinique.

Il apparaît donc nécessaire de développer et d'évaluer les performances, notamment en terme de spécificité, de nouveaux tests capables de mesurer la réponse cellulaire de manière robuste, standardisée et adaptée à la routine clinique.

Dans cette étude, nous avons mis au point et évalué un test semi-automatisé détectant et quantifiant la réponse immunitaire mémoire des lymphocytes T spécifiques du SARS-CoV-2 via la mesure de la libération d'interféron gamma post stimulation dans un échantillon de sang total (WB IGRA de l'anglais *Whole-blood IGRA*). Pour cela, nous avons utilisé une cohorte de 129 patients convalescents de la COVID-19, travailleurs de la santé (HCWs, de l'anglais *healthcare workers*) et infectés 6 mois auparavant par le SARS-CoV-2. Nous avons inclus également 25 prélèvements de volontaires sains non-infectés par la COVID-19 et 3 prélèvements de HCWs infectés par un autre coronavirus (HCoV, de l'anglais *Human coronaviruses*). Un prélèvement de sang total pour chaque individu a été stimulé par différentes protéines du SARS-CoV-2 (nucléocapside (N), glycoprotéine membranaire (M) et domaine de liaison au récepteur de pointe (RBD)), nous permettant ainsi d'évaluer la réponse des lymphocytes T et l'efficacité des différentes cibles protéiques dans l'induction de cette réponse.

Il est à noter qu'une mesure spécifique de la réponse vaccinale peut être réalisée post stimulation avec la RBD, étant le seul antigène inclus dans le vaccin. La mesure de la sécrétion de l'IFN- γ dans le surnageant cellulaire a été effectuée sur la plateforme semi-automatisée VIDAS (BioMérieux) après une stimulation de 22 heures à 37°C sous 5 % de CO₂.

Les résultats obtenus démontrent d'une part qu'une réponse cellulaire T mémoire est observable à 6 mois post infection, avec néanmoins des variabilités selon la cible protéique utilisée pour la stimulation (de 62.4 % à 97.9 % de répondeurs). D'autre part, ils mettent en évidence des différences de spécificité en fonction des stimulants (réaction croisée observée chez les HV et HCoV post stimulation avec la nucléocapside). Ils ont surtout permis de démontrer que la réponse cellulaire T pouvait persister davantage que les anticorps neutralisants, révélant l'importance de la mesure de la réponse lymphocytaire T en complément des tests sérologiques pour l'évaluation de l'efficacité de la réponse immunitaire mémoire à long terme. À la suite de ces travaux, ce test immunitaire fonctionnel a été transféré sur l'automate VIDAS® (COVIGRA, bioMérieux) depuis la stimulation sur sang total au dosage de l'IFN- γ sécrété. Il a été co-développé avec les équipes de bioMérieux pour le mettre à disposition des équipes scientifiques sous format RUO (de l'anglais, *Research use only*) puis CE-IVD, afin de mieux caractériser la réponse T chez les patients infectés et/ou vaccinés par le SARS-CoV-2. Pour cela, l'optimisation du kit de stimulation a été réalisée en sélectionnant 17 peptides ciblant les protéines spike (RBD), membrane et nucléocapside. La vérification (sensibilité, spécificité, reproductibilité et précision) et la validation du test chez des patients ou personnel soignant ont permis de remplir tous les critères nécessaires au marquage CE-IVD.

Une nouvelle fois, la rapidité et la simplicité de mise en place de cette méthode de mesure de la fonction immunitaire sur sang total offre de nombreuses perspectives dans la gestion du risque infectieux, et ce, de manière personnalisée. Dans le contexte de la COVID-19, ces tests permettraient d'apprécier la mémoire cellulaire spécifique contre le SARS-CoV-2 en complément des tests sérologiques.

L'ensemble de ces investigations a fait l'objet de l'article « **Specific detection of memory T-cells in COVID-19 patients using standardized whole-blood Interferon gamma release assay** », publié en 2021 dans la revue scientifique « *European Journal of Immunology* ».

Publication

Specific detection of memory T-cells in COVID-19 patients using standardized whole-blood Interferon gamma release assay

William Mouton ; Christelle Compagnon ; Kahina Saker ; Soizic Daniel ; Sophia Djebali ;
Xavier Lacoux ; Bruno Pozzetto ; Guy Oriol ; Daphné Laubretton ; Margaux Prioux ; Jean-
Baptiste Fassier ; Nicolas Guibert ; Amélie Massardier-Pilonchéry ; Dulce Alfaiate ; Franck
Berthier ; Thierry Walzer ; Jacqueline Marvel ; Karen Brengel-Pesce* ; Sophie Trouiller-
Assant*

*Equally contributed to this work

2021

Published in European Journal of Immunology: DOI: 10.1002/eji.202149296

Letter to the Editor

[DOI: 10.1002/eji.202149296]

Specific detection of memory T-cells in COVID-19 patients using standardized whole-blood Interferon gammarelease assay

As our understanding of the immune response against SARS-CoV-2 improves, it becomes clear that virus-specific T-cells are key players in the control of infection and that suboptimal T-cells response contribute to Covid-19 severity in many individuals [1]. SARS-CoV-2 specific T-cell responses often target epitopes conserved in different virus clades, including variants of concern [2], and even in other seasonal human coronaviruses (HCoV) [3,4]. Thus, memory T-cells may be more cross-protective than antibodies against different coronavirus infections. In addition, specific SARS-CoV-2 T-cell responses have been detected in convalescent donors without antibody responses suggesting that, at least in some individuals, the measurement of T-cell responses, mainly investigated using ELISpot assay and/or intracellular cytokine staining (ICS) [3,4], may complement serological measurements to uncover and characterize past infections. Thus, novel immunodiagnos- tics, more suitable for clinical routine than

the two methods mentioned above and measuring cellular immune response to SARS-CoV-2, are needed to assess individual immune status and evaluate emerging vaccines in a robust and standardized manner. For this purpose, we designed a semi-automated whole-blood Interferon gamma release assay (WB IGRA) to detect and quantify SARS-CoV-2-specific T-cells immunity. WB assays are rapid and simple assays that preserve all interactions between circulating immune cells reflecting the, *in vivo*, situation. IFN- γ secretion measurement following stimulation with SARS-CoV-2 peptides was used to reveal SARS-CoV-2 specific T-cell response, notably in whole blood and Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) assays as previously reported [5–8]. We monitored T-cell immunity directed against different SARS-CoV-2 proteins including nucleocapsid (N), membrane glycoprotein (M) and the spike receptor-binding domain (RBD) in a cohort of 129 Covid-19 convalescent healthcare workers (HCWs) infected 6 months before with SARS-CoV-2. We correlated these measurements with serological levels of antibodies (Abs) against SARS-CoV-2. We also assessed the specificity of the WB IGRA for SARS-CoV-2 by performing measurements in 25 SARS-CoV-2 seronegative healthy volunteers (HVs) and in three HCWs with previously documented infection by HCoV.

We constituted a cohort of HCWs previously infected by SARS-CoV-2 ($n = 129$) or HCoV ($n = 3$) at 6-month post-symptom period. Among patients, 20 of 129 (16%) SARS-CoV-2 positive HCWs were male (sex ratio, 0.18), the median age was 41 years (21–62 years); one of three (33%) HKU-1 ($n = 1$)/NL-63 ($n = 2$) positive HCWs were male (sex ratio, 0.5) with a median age of 22 years (21–23 years).

We also included HVs ($n = 25$) of which 13 of 25 (52%) were male (sex ratio, 1.08) with a median age of 42 years (19–68 years). We first monitored SARS-CoV-2 specific Abs using the Wantai total Ab kit in the three different groups of participants. These Abs were undetectable in the sera from the three HCoV positive HCWs and from the 25 HVs, confirming the absence of previous SARS-CoV-2 infection. In contrast, they were detected in all 129 HCWs with documented SARS-CoV-2 infection 6 months before. These sera were further characterized, 82.9% ($n = 107$) had IgG against the SARS-CoV-2 RBD domain (bioMérieux VIDAS®) [8–10] and only 48.8% ($n = 63$) scored positive in a virus neutralization test (VNT) (Table 1), confirming previous findings regarding the relative short half-life of neutralizing antibodies (nAbs) in subjects with mild disease [11,12].

We then monitored the T-cell response against M, RBD, and N peptides using the WB IGRA for the different groups. A detectable IFN- γ release was observed for 89.1%, 62.4%, and 97.9% of SARS-CoV-2 positive HCWs (detailed in Table 1) after stimulation with M (Figure 1A), RBD (Figure 1B), and N (Figure 1C) SARS-CoV-2 peptides, respectively. These data suggest that a detectable T-cell response after SARS-CoV-2 peptide stimulation can be observed at 6 months post symptoms, in accordance with recent results [8], and extending previous findings by *Murugesan et al.* [7] who used a similar approach, with different peptides pools, in recently-SARS-CoV-2-infected patients. No or very low IFN- γ release (<0.12 IU/mL) was detected for HVs and HCoV upon stimulation with M (Figure 1A) or RBD (Figure 1B). Interestingly, two of the three HCoV positive HCWs (Mean 0.45

Correspondence: Sophie Trouiller-Assant
e-mail: Sophie.assant@chu-lyon.fr

Table 1. Association of SARS-CoV-2 humoral and cellular response

	Anti-SARS-CoV-2-RBD	
	IgG titer	Virus neutralization test
Assay type	ELFA	/
Positive, n (%)	107 (82.9)	63 (48.8)
Negative, n (%)	22 (17.1)	66 (51.2)
Overall, Negative and Positive Percent Agreement with WB IGRA M; T-cell responders 115/129 (89.1%) (IFN-γ titer: median 0.51 [0.24-1.49] IU/mL)		
OPA [95%CI]	78.3 [70.4-84.5]	56.6 [48.0-64.8]
PPA [95%CI]	90.7 [83.7-94.8]	96.8 [89.1-99.1]
NPA [95%CI]	18.2 [7.3-38.5]	18.2 [10.7-29.1]
Overall, Negative and Positive Percent Agreement with WB IGRA RBD; T-cell responders 58/93 (62.4%) (IFN-γ titer: median 0.12 [0.17-0.34] IU/mL)		
OPA [95%CI]	71.0 [61.1-79.2]	62.4 [52.2-71.5]
PPA [95%CI]	69.6 [58.8-78.7]	72.6 [59.1-82.9]
NPA [95%CI]	78.6 [52.4-92.4]	50.0 [35.5-64.5]
Overall, Negative and Positive Percent Agreement with WB IGRA N; T-cell responders 92/94 (97.9%) (IFN-γ titer: median 1.20 [0.60-2.48] IU/mL)		
OPA [95%CI]	81.9 [72.9-88.4]	51.1 [41.1-60.9]
PPA [95%CI]	97.5 [91.2-99.3]	100 [92.3-100]
NPA [95%CI]	0 [0-20.4]	4.2 [1.2-14.0]

[0.10-0.79] IU/mL), as well as 44% ($n = 11/25$, Mean 0.20 [0.13-0.32] IU/mL) of the HVs showed a low detectable IFN- γ response upon stimulation with N (Figure 1C). These data suggest that N peptides are able to elicit not only SARS-CoV-2 specific T-cells but also cross-reactive HCoV-specific T-cells, which reinforces the existence of potential pre-existing immunity in HVs, as previously noted [4,13,14,15].

The overall percent agreement between the T-cell responses against

N, M, or RBD WB IGRA and positive anti-SARS-CoV-2-RBD IgG (bioMérieux IgG assay) was of 81.9%, 78.3%, and 71.0%, respectively. Among the 22 COVID-19 convalescent HCWs with undetectable anti-SARS-CoV-2-RBD IgG, only 4 did not have M-specific T-cells, which resulted in a low negative percent agreement (NPA) between cellular and humoral responses (18.2%), interestingly this NPA was null concerning N-specific T-cells i.e. all patients with undetectable anti-SARS-CoV-2-RBD IgG have detectable N-specific

T-cells (detailed in Table 1). Moreover, among the convalescent HCWs who lacked neutralizing Abs at 6 months post-infection, 81.8% ($n = 54/66$) and 95.8% ($n = 46/48$) had M- and N-specific T-cells, respectively. These results highlight that the T-cell response persists longer than neutralizing antibodies, suggesting that the measurement of T-cell responses is important to define the history of past infections.

Finally, we assessed the production of IFN- γ by CD4⁺ T-cells measured by

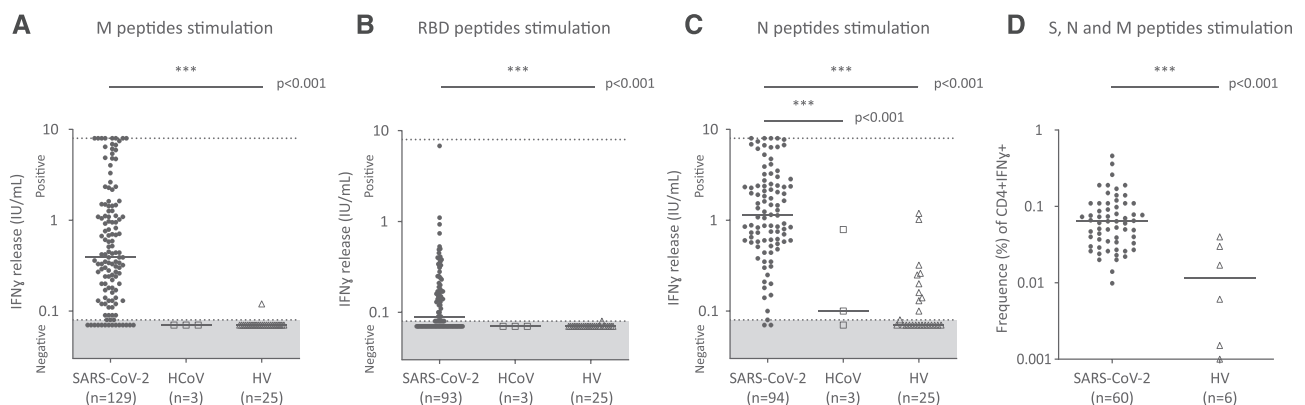


Figure 1. IFN- γ release after in vitro WB stimulation using SARS-CoV-2 peptide pools. IFN- γ levels measurement in WB of samples from SARS-CoV-2 convalescent HCWs (dot), three HCoV convalescent HCWs (square) and 25 controls (HV) (triangle). IFN- γ secretion was measured on VIDAS automated platform (VIDAS® IFN γ RUO, bioMérieux) after a 22-h stimulation using (A) M peptides, (B) RBD peptides, and (C) N peptides. The median and individual secretion levels are shown. (D) Percentage of IFN- γ positive CD4⁺ T-cells measured by intracellular cytokine staining (ICS) following stimulation of PBMCs from a subset of patients (dot, $n = 60$) and new controls (HV) (triangle, $n = 6$) with a pool of peptides (PepTivator, Miltenyi Biotec) derived from Spike, N, and M proteins as detailed in the methods. Statistical differences were inferred using non-parametric Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons test (A-C) or Mann-Whitney test (D) (***) $p < 0.001$.



intracellular cytokine staining (ICS) following stimulation of PBMCs from a subset of patients ($n = 60$), with a pool of peptides (PepTivator, Miltenyi Biotec) derived from Spike, N, and M proteins (Figure 1D). We observed a 5.3-fold increase of CD4⁺IFN γ ⁺ in SARS-CoV-2 convalescent HCWs compared to HV ($p < 0.001$), suggesting that IFN- γ is mainly produced by SARS-CoV-2 specific CD4⁺ T-cells and confirming the use of IFN- γ release as a relevant marker of T-cell immune response as previously described [5–7].

However, we acknowledge that our study has some limitations: (i) the WB IGRA was not able to differentiate between CD8⁺ and CD4⁺ T-cells responses, (ii) it does not determine whether memory T-cells are protective against SARS-CoV-2 re-infection, (iii) it was not evaluated in vaccinated subjects, and (iv) it is necessary to assess whole Spike protein epitopes including other non-RBD spike epitopes in order to improve detection of vaccine-induced memory T-cells. Nevertheless, a validated [semi-]automatized SARS-CoV-2 WB IGRA would be of interest to assess T-cell memory induced by natural infection or vaccination in the clinical routine.

Here, we present a WB IGRA that is highly efficient in detecting SARS-CoV-2 specific T-cell responses, confirming the reliability of such tests [5–7]. Our results highlight that peptides derived from distinct viral proteins show a different capacity to trigger a T-cell response in patients having recovered from SARS-CoV-2 infection. Stimulation with RBD-peptides was less efficient in inducing IFN- γ secretion than stimulation with M and N peptides in convalescent patients, however this assay could be helpful to assess T-cell memory after SARS-CoV-2 vaccination targeting the Spike RBD domain. Indeed, the induction of protective immune responses composed of Spike- or RBD-directed nAbs associated with Th1-type cellular responses, is recommended by WHO. N- and M-peptides both induced the production of high levels of IFN- γ , the stimulation by N could even induce low levels of IFN- γ secretion by HCoV-convalescent HCWs and HVs T-cells indicating that the pool of N-peptides contains

some cross reactive epitopes able to stimulate HCoV induced T-cells. Hence, stimulation with M appears to be more specific and could be used to measure T-cell memory after SARS-CoV-2 natural infection. Alternatively, N peptides located in regions that are conserved between HCoV and SARS-CoV-2 could be removed from the N pool of peptides [3,4] or a higher positivity threshold, more suitable than detection threshold defined by method protocol, could be set using the pool described in this study.

In summary, WB IGRA could thus be proposed as a suitable and rapid option for assessing the presence of a long-term specific T-cell response against SARS-CoV-2.

William Mouton^{1,2,3} ,
Christelle Compagnon^{1,3}, Kahina Saker¹,
Soizic Daniel⁴, Sophia Djebali²,
Xavier Lacoux⁴, Bruno Pozzetto^{5,6},
Guy Oriol^{1,3}, Daphné Laubret²,
Margaux Prieux², Jean-Baptiste Fassier^{7,8},
Nicolas Guibert^{7,8},
Amélie Massardier-Pilonchéry^{7,8},
Dulce Alfaiate^{7,8}, Franck Berthier⁴,
Thierry Walzer² , Jacqueline Marvel²,
Karen Brengel-Pesce^{#1,3}
and Sophie Trouiller-Assant^{#1,2}

¹ Joint Research Unit Hospices Civils de Lyon-bioMérieux, Civils Hospices de Lyon, Pierre-Bénite, Lyon Sud Hospital, Lyon, France

² CIRI- International Centre for Research in Infectiology (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, France

³ Open Innovation & Partnerships (OIP), bioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, France

⁴ R&D – Immunoassay, bioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, France

⁵ GIMAP EA 3064 (Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes), Lyon University, Jean Monnet University, Saint-Etienne, France

⁶ Laboratoire des Agents Infectieux et Hygiène, Saint-Etienne University hospital, Saint-Etienne, France

⁷ Lyon University, Ifsttar, UMRESTTE, UMR T_9405, Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, France

⁸ Occupational Health and Medicine Department, Civils Hospices de Lyon, Lyon, France

#These authors share senior authorship.

Acknowledgments: This work was supported by bioMérieux SA that provided kits for this study. This research is being supported by Hospices Civils de Lyon

and by Fondation des Hospices Civils de Lyon (HCL). We thank all the personnel of the occupational health and medicine department of HCL who contributed to the samples collection. We thank Karima Brahami and all members of the clinical research and innovation department for their reactivity (DRCI, HCL). A special thanks to Virginie Pitiot and PMO team for their help in patient enrolment and clinical data collection. Additional funding from the “project IDEXLYON” of Lyon University as part of the “programme d’investissement d’Avenir” (ANR-18-IDEX-0005). We acknowledge the contribution of SFR Biosciences (UAR3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL) AniRA-cytometry facility.

Conflict of Interest: W.M., C.C., S.Da., X.L., G.O., F.B., and K.B.P are employed in bioMérieux SA, an in vitro diagnostic company. The other authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

Data availability statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Peer review: The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/eji.202149296>

1 Sette, A. and Crotty, S., *Cell*. 2021. 184: 861.

2 Skelly, D. T. et al., *In Review*. 2021: <https://www.researchsquare.com/article/rs-226857/v1>

3 Nelde, A. et al., *Nat Immunol*. 2021. 22: 74.

4 Le Bert, N., et al., *Nature*. 2020. 584: 457.

5 Le Bert, N. et al., *J. Exp. Med*. 2021. 218: e20202617.

6 Petrone, L. et al., *Clin. Microbiol. Infect*. 2021. 27: 286.e7–286.e13.

- 7 Murugesan, K. et al., *Clin. Infect. Dis.* 2020. ciaa1537.
- 8 Vallejo, A. et al., *Eur J Clin Invest.* 2021: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eci.13636>
- 9 Dan, J. M. et al., *Science.* 2021. 371: eabf4063.
- 10 Jiang, X. - L. et al., *Nat Commun.* 2021. 12: 897.
- 11 Gaebler, C. et al., *Nature.* 2021. 591: 639.
- 12 Bal, A. et al., *Clin Microbiol Infect.* 2021. 27: 933–935.
- 13 Lau, E. H. Y. et al., *Nat Commun.* 2021. 12: 63.
- 14 Braun, J. et al., *Nature.* 2020. 587: 270.
- 15 Mateus, J. et al., *Science.* 2020. 370: 89.

Abbreviations: **Abs:** antibodies · **HVs:** healthy volunteers · **HCoV** : seasonal human coronaviruses · **HCWs:** healthcare workers · **ICS:** intracytoplasmic staining · **IGRA:** IFN gamma release assay · **IU:** international unit · **M:** membrane glycoprotein · **nAbs:** neutralizing antibodies · **N:** nucleocapsid · **RBD:** receptor-binding domain · **WB:** Whole-blood

Keywords: immune memory · interferon gamma release assay · SARS-CoV-2 · T-cells response

Full correspondence: Sophie Trouillet-Assant, Laboratoire Commun de Recherche Hospices

Civils de Lyon-bioMérieux. Centre Hospitalier Lyon Sud, Bâtiment 3F, Pierre-Bénite, 69495, France. Email: Sophie.assant@chu-lyon.fr

Received: 9/4/2021

Revised: 30/6/2021

Accepted: 4/8/2021

Accepted article online: 13/8/2021



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

Supporting informations

Material and Methods

Study design

A prospective cohort study was conducted at the Hospices Civils de Lyon, France in HCWs with symptoms suggestive of SARS-CoV-2 infection. The clinical study was registered on ClinicalTrial.gov (NCT04341142) (1). Written informed consent was obtained from participants and the study was approved by the national review board for biomedical research (Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée, ID-RCB-2020-A00932-37). Nasopharyngeal swabs collected at inclusion were tested with the BIOFIRE® Respiratory Panel (bioMérieux): 129 HCWs were SARS-CoV-2 positive and 3 HCWs were HKU-1 or NL-63 positive (detailed in (2,3)). At 6 months post-infection, blood sampling was performed for each patient. According to French procedures, a written non-opposition to the use of donated blood for research purposes was obtained from HVs. The donors' personal data were anonymized before transfer to our research laboratory. We obtained approval from the local ethical committee and the French ministry of research (DC-2008-64) for handling and conservation of these samples.

Serological investigations

The presence of anti-SARS-CoV-2 Ab was evaluated on serum samples using the Wantai Ab assay that measures total Abs against the RBD of the S protein and the bioMérieux Vidas® assay that measures IgG to the RBD. Positivity was established according to the threshold value recommended by each manufacturer. The NAb titres were determined by a virus neutralization test (VNT) using live SARS-CoV-2 virus as previously described (2).

WB IGRA after stimulation against SARS-CoV-2 peptides

Fresh blood collected in heparinized tubes was stimulated for 22 hours at 37°C under 5% of CO₂ with SARS-CoV-2 peptide pools (derived from prototype Wuhan strain, NC_045512.2) targeting RBD (46 peptides, [C]= 8 µg/mL), M (53 peptides, [C]= 15 µg/mL) or N (102 peptides, [C]= 20 µg/mL) (bioMérieux, France) diluted in IGRA solution (bioMérieux, France). The peptides (15-mer) encompassed the whole protein sequence and overlapped by 5-residues. The IGRA solution was used as a negative control and a mitogen as a positive control. The concentration of IFN γ in the supernatant was measured using the VIDAS automated platform (VIDAS® IFN γ RUO, bioMérieux). The measuring range was 0.08 to 8 IU/mL and WB IGRA positivity thresholds were defined at 0.08 IU/mL. The IFN γ response was defined as detectable when the IFN γ concentration of the test was above threshold, and the negative control was below threshold or when the IFN γ concentration of the test minus IFN γ concentration of the negative control was above threshold. All positive controls were \geq 8 IU/mL.

Stimulation with SARS-CoV-2 overlapping peptide pools and intracytoplasmic staining

Briefly, overnight-rested PBMCs were stimulated with SARS-CoV-2 overlapping peptides pools against SARS-CoV-2 M, N and Spike proteins (PepTivator, Miltenyi Biotec) at a final concentration of 1 µg/ml for 1 h in the presence of 1 µg/ml monoclonal antibodies CD28 and CD49d, and then for an additional 5 h with GolgiPlug and GolgiStop (BD Biosciences). Dead cells were labelled using Fixable Viability eFluor 780 dye (ThermoFischer Scientific). Surface markers, including BV786-conjugated anti-CD3 (BD Biosciences), BUV486- conjugated anti-CD4 (BD Biosciences), PE-Cy7-conjugated anti-CD8, APC-Cy7-conjugated anti-CD14, APC-Cy7-conjugated anti-CD16 and APC-Cy7- conjugated anti-CD19 (all BioLegend) were stained. Cells were then washed, fixed with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) and stained with PE-conjugated anti-IFN γ (BioLegend). Negative controls without peptide stimulation were run for each sample. All samples were acquired on a BD LSRFortessa (BD Biosciences) flow cytometer and analyzed using FlowJo version 10 software.

Statistical analysis

For WB IGRA responses, comparisons were performed using non-parametric Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test or Mann-Whitney test ; the overall, positive and negative percent agreements were determined between WB IGRA response and serological assays or VNT as previously described (4). Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism® software (GraphPad software, La Jolla, USA) and R software. A p-value ≤ 0.05 was considered as statistically significant.

1. Trouillet-Assant S. et al., *BMJ Open*. 2020: 10(11):e041268.
2. Bal A. et al., *Clin Microbiol Infect*. 2021: 27(6):933-935.
3. Bal A. et al., *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*. 2020:
<http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.11.04.20225862>
4. Obermeier P. et al., *EBioMedicine*. 2016: 4:191-6.

Discussion, perspectives et conclusion

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

Nos travaux de recherche ont visé à évaluer l'intérêt de l'étude des altérations de la fonction immunitaire dans le contexte de l'immunodépression. Au terme de notre revue bibliographique, nous décrivons les principales causes d'immunodépression avec un focus spécifique sur un contexte d'immunodépression programmé. Nous mettons ensuite en lumière les différentes méthodes et outils traditionnellement employés afin d'évaluer les capacités immunitaires d'un individu. Enfin, nous décrivons également les principales limites qui leurs sont associées et l'intérêt d'aborder l'évaluation des compétences immunitaires par l'utilisation des tests immunitaires fonctionnels.

Les tests immunitaires fonctionnels ont déjà prouvé leur intérêt dans certains contextes cliniques tels que le diagnostic des maladies infectieuses et semblent être utiles pour adapter et améliorer les soins aux patients. Néanmoins, au terme de notre revue bibliographique nous pointons certaines limites d'utilisation de ces méthodes et soulignons le besoin d'outils rapides, simples et reproductibles pour faciliter leur implantation en clinique.

Ainsi, les premiers travaux de ma thèse ont consisté à évaluer la reproductibilité et la robustesse d'un test immunitaire standardisé, avant d'étudier les altérations immunitaires de patients immunodéprimées dans le domaine de l'allogreffe de CSH. Les objectifs de mes recherches dans ce contexte étaient i) d'évaluer si l'analyse de la fonction immunitaire permettait de mieux cartographier la reconstitution immunitaire fonctionnelle post greffe en comparaison aux marqueurs quantitatifs et phénotypiques traditionnels et ii) d'évaluer la réponse mémoire à médiation cellulaire afin d'aider à l'adaptation des prophylaxies. J'ai également adapté le principe des tests immunitaires fonctionnels au contexte spécifique de la COVID-19 pour analyser la mémoire cellulaire post infection.

A. Tests immunitaires fonctionnels : Optimisation et standardisation

a. L'échantillon biologique

Dans un premier temps, nous avons évalué la reproductibilité et la robustesse de la méthode Truculture® sur l'ensemble du processus, de la stimulation à l'expression des 44 transcripts composant la signature décrite par le consortium *Milieu intérieur*. Les résultats obtenus mettent en évidence une très grande reproductibilité de la méthode, pourtant évaluée sur deux cohortes complètement indépendantes. Ce test fonctionnel sur sang total permet ainsi de restreindre la variabilité technique en facilitant le protocole de réalisation et d'étudier la réponse immunitaire dans un environnement plus contrôlé.

Cette conclusion est également soutenue par l'étude de *Deenadayalan et al.* rapportant la reproductibilité des tests sur sang total par comparaison aux méthodes sur PBMC, pour l'évaluation de la fonction des lymphocytes T objectivée par la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ post stimulation avec deux antigènes de *M. tuberculosis* (287). *Morris et al.* décrivent aussi la fiabilité du sang total pour la réalisation de dosages de cytokines intracellulaires post stimulation par rapport à l'utilisation de PBMC. Les pourcentages de concordance globale entre technique sur PBMC et sur sang total étaient d'au moins 79.5% dans deux études cliniques évaluant la réponse vaccinale (234).

Le **choix de l'échantillon biologique** semble donc **essentiel** pour la robustesse des tests de fonctions immunitaires. Notre second axe de recherche a donc été de **faciliter les techniques** mesurant la réponse mémoire cellulaire antivirale en trouvant des **alternatives aux analyses classiques sur PBMC**. Nous nous sommes intéressés à la réponse spécifique anti-VZV et anti-SARS-CoV-2.

La mesure de la mémoire cellulaire spécifique d'un pathogène, bien que capitale pour la gestion des prophylaxies, est peu étudiée, ceci étant principalement liée à la difficulté de mise en place de ces tests. Nous avons alors développé et évalué un test immunitaire fonctionnel sur sang total basé sur l'expression du gène de l'IFN- γ post stimulation avec des protéines du VZV. Puis, nous avons comparé les résultats générés aux méthodes classiques de prolifération et de sécrétion d'IFN- γ post stimulation sur PBMC.

Nos résultats démontrent que la mesure de l'expression du gène *IFNG* par qPCR est efficace pour identifier les patients receveurs d'une allogreffe de CSH ayant développé une réponse cellulaire spécifique au VZV depuis leur transplantation. De plus, ce test ne nécessite que 24h de stimulation sur un faible volume de sang total par rapport aux 7 jours requis pour la réalisation des tests fonctionnels standard sur PBMC.

Dans le contexte du SARS-CoV-2, de nombreuses études rapportent que l'évaluation de la mémoire cellulaire est nécessaire et complémentaire à celle de la mémoire humorale. Néanmoins, elle est une nouvelle fois principalement évaluée sur PBMC à l'aide de tests peu adaptés à la routine clinique tels que l'ELISpot (288) et/ou le dosage de cytokines intracellulaires (ICS) (289). Le développement d'un test immunodiagnostic robuste et standardisé semblait donc nécessaire. Nous avons donc mis au point et évalué un test IGRA sur sang total permettant de mesurer la réponse des lymphocytes T dirigée contre différentes protéines du SARS-CoV-2. Les résultats obtenus au sein d'une cohorte de 129 professionnels de santé ayant été infectés par le SARS-CoV-2 démontrent que, selon le peptide utilisé, 62.4% à 97.9% des individus présentent une réponse cellulaire post stimulation.

Concomitamment, d'autres études ont décrit de bonnes sensibilités et spécificités des tests cellulaires réalisés à partir de sang total mesurant l'IFN- γ post stimulation chez des individus convalescents (21,290,291). Néanmoins, ces différentes études et la nôtre mettent en évidence des proportions de réponses différentes en fonction des peptides utilisés.

Ainsi, *Aiello et al.* décrivent une plus forte sécrétion d'IFN- γ pour les peptides de la protéine Spike (0,51 UI/mL) et du mélange de peptides (protéine Spike, nucléocapside et membrane combinés) (1,18 UI/mL) par rapport aux peptides de la nucléocapside et de la membrane (0,22 UI/mL) (21).

Ainsi, en plus d'utiliser un échantillon biologique robuste, **le choix du stimulant** apparaît comme primordial dans la réalisation des tests immunitaires fonctionnels.

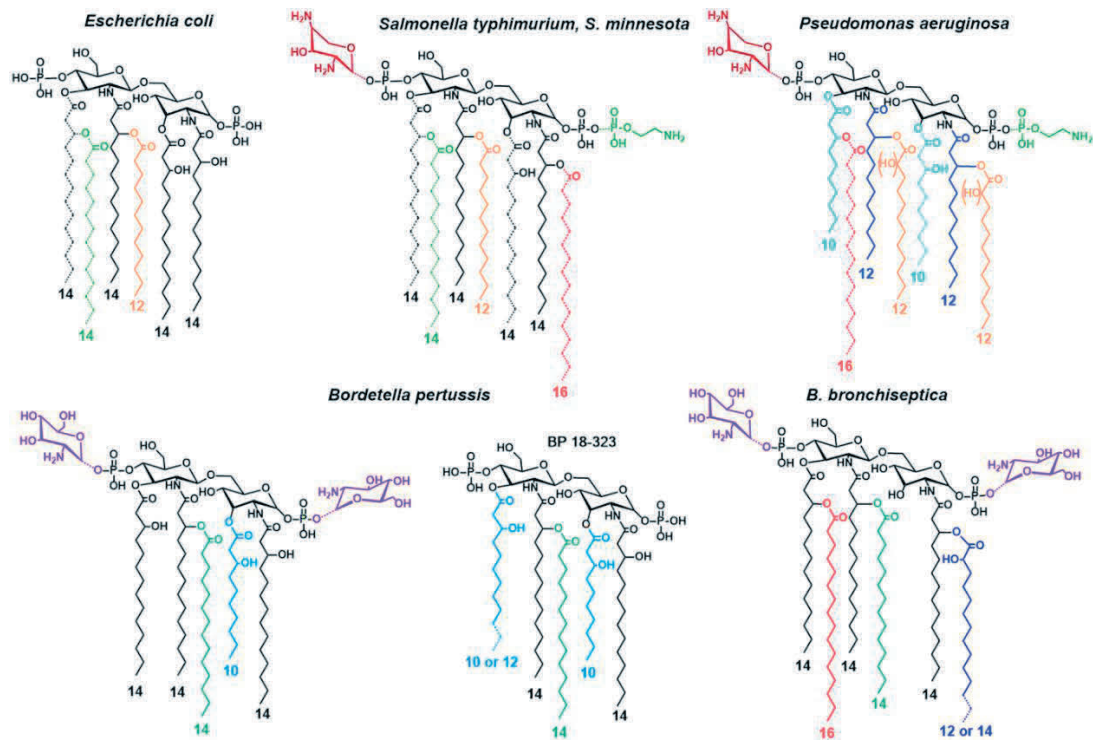
b. Le stimulant

En effet, tel que décrit pour le SARS-CoV-2, la proportion de répondeur et l'amplitude de la réponse cellulaire peuvent être différentes selon la région protéique ciblée par les stimulants peptidiques. Parallèlement, la taille de ces peptides peut également influencer la reconnaissance par le CMH de classe I ou II des cellules et en conséquence déterminer la réponse induite des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺. *O'Brien et.al.* décrivent que l'allongement d'un peptide est susceptible d'entraîner une plus grande affinité pour les molécules du CMH de classe II avec une longueur optimale d'environ 18 à 20 acides aminés (292). *Ekeruche-Makinde et al.* décrivent une longueur idéale de peptides de 8 à 14 acides aminés pour les molécules du CMH de classe I (293). Au final, la diversité et la longueur des peptides utilisés vont déterminer leur liaison aux CMH et la stimulation plus ou moins forte des populations CD4⁺ et/ou CD8⁺ du sujet. La sensibilité de la réponse à la stimulation sera donc variable entre deux individus donnés malgré l'utilisation de stimulants synthétiques hautement reproductibles.

Malgré ces particularités à prendre en considération, les **composants synthétiques** demeureront l'une des **meilleures options afin de limiter la variabilité technique**.

A titre d'exemple, bien qu'il soit l'un des stimulants de référence pour l'évaluation de l'immunocompétence de cellules immunitaires, le LPS a de nombreux inconvénients. En effet, la source de LPS (294,295), la préparation (296) et la purification de ce composant jouent un rôle important dans l'affinité pour le récepteur et dans la réponse immunitaire qui en découle. On note une importante variabilité en terme de structure des molécules LPS en fonction des souches de bactéries Gram négatifs, notamment au niveau du lipide A qui est un composant essentiel à la reconnaissance du récepteur de l'hôte (**Figure 36**).

Figure 36. Les différentes structures du lipide A du LPS en fonction de la souche bactérienne – D'après (297)



Une option fiable résiderait à utiliser des molécules synthétiques telles que le Monophosphoryl lipid A (MPLA), un agoniste synthétique de TLR-4 et activateur moins puissant de la réponse pro-inflammatoire. Une récente étude a démontré que ce composé synthétique est capable d'activer des voies semblables à celle du LPS, de révéler l'anergie monocytaire, et de stratifier les patients en choc septique en fonction de leurs altérations immunitaires (298). La production de stimulants synthétiques est donc à privilégier pour **augmenter la robustesse** des tests immunitaires fonctionnels. C'est notamment l'une des principales limites de notre étude sur l'évaluation de la mémoire cellulaire spécifique du VZV.

En effet, nous avons utilisé une préparation d'antigènes irradiés aux rayons gamma issus de surnageant de culture d'une lignée cellulaire infectée par le VZV. La pureté de ce stimulant, contenant une concentration élevée de virus, de composants viraux et de matériel cellulaire en suspension peut être remis en question au même titre que la répétabilité entre les lots produits.

De plus, *Jing et.al.* décrivent la présence d'une réactivité croisée des lymphocytes T entre les antigènes de VZV et HSV, autre *Herpesvirus* à large prévalence (67% de la population mondiale en 2015) (299).

Cette réactivité croisée, expliquée par un important nombre de gènes homologues, peut ainsi compromettre la spécificité et l'interprétation de la réponse cellulaire anti-VZV mesurée post stimulation.

Bien que le test fonctionnel développé sur sang total pendant mes travaux de thèse présente des axes d'amélioration à travailler, il représente **une bonne méthode de substitution pour évaluer la réponse cellulaire spécifique** plus adaptée à la pratique clinique, par rapport aux tests réalisés sur PBMC.

Compte tenu de la faible utilisation des tests immunitaires fonctionnels dans les laboratoires d'analyse biologique, nous avons en parallèle évalué l'intérêt d'un **marqueur indirect original** pouvant **refléter l'état de la fonctionnalité immunitaire**. Nous nous sommes ainsi intéressés à la famille des *Anelloviridae* et aux récents travaux qui suggèrent que sa détection et, *in fine* sa charge virale, pourrait être informative dans différentes conditions (pathologiques ou non) de l'état immunitaire d'un patient.

Afin de ne pas interférer avec la fluidité de la lecture, l'article a été placé en **annexe 1**.

B. L'étude de l'immunité fonctionnelle représente-t-elle une plus-value par rapport aux tests d'immunomonitoring classiques ?

Nous avons souhaité évaluer dans différentes populations, l'intérêt de mesurer la fonctionnalité immunitaire en complément des marqueurs traditionnellement utilisés.

Pour poser cette question, nous avons constitué une cohorte de 60 patients receveurs d'une allogreffe de CSH inclus prospectivement à la période charnière de 6 mois post greffe dans l'étude clinique "VacHemInf" (NCT03659773), ainsi que de 10 volontaires sains (EFS). Le sang total de chaque sujet a été simulé par du LPS et du SEB à l'aide de tubes Truculture®. Le panel de gènes étudiés pour décrire les altérations immunitaires était composé de la signature de 44 gènes définissant une "réponse immunitaire saine", telle que définie par le consortium *Milieu intérieur*, et de 100 gènes liés essentiellement à la réponse immunitaire cellulaire B/T. Les associations entre des profils immunitaires spécifiques et des caractéristiques cliniques, biologiques ou infectieuses ont été recherchées.

Les tests fonctionnels ont permis de démontrer la capacité des receveurs d'une allogreffe de CSH à activer les mêmes réseaux immunitaires que ceux activés par les volontaires sains post stimulation. Néanmoins, indépendamment du stimulant utilisé, les receveurs d'allogreffe de CSH présentaient un nombre de gènes différentiellement exprimés inférieur à celui des contrôles. Les gènes plus faiblement exprimés étaient principalement impliqués dans les processus immunorégulateurs et inflammatoires tels que l'*IL2*, l'*IFNG*, *MCP1* ou encore les gènes liés à l'*IL1* et l'*IL10*.

L'évaluation des profils transcriptomiques individuels a révélé que la réponse immunitaire des receveurs d'allogreffe de CSH est très hétérogène. Certains patients présentent un profil transcriptomique similaire à celui des contrôles, ce qui suggère un processus de reconstitution immunitaire plus avancé par rapport aux autres. Les différentes tentatives de clustering non supervisé n'ont pas permis de mettre en évidence une association entre un profil transcriptomique spécifique et des caractéristiques cliniques particulières. Ces absences de corrélation entre la fonction immunitaire et certaines caractéristiques cliniques et hématologiques, témoignent de la très grande diversité afférente au contexte de l'allogreffe de CSH.

Toutefois nos différentes analyses en composantes principales nous ont permis d'identifier que les patients présentant les réponses transcriptomiques post stimulation les plus distinctes de celle des volontaires sains, étaient majoritairement traités par immunosuppresseurs. La sous-expression de gènes clés de la réponse immunitaire tels que l'IFN- γ , l'IL6 ou l'IL10, se traduisant par une moindre sécrétion des protéines codées par ces gènes caractérisait ces sujets. D'une manière intéressante aucune différence n'était observée entre les patients traités ou non par immunosuppresseurs à l'aide de l'immunophénotypage large réalisé tel que le nombre de LTCD4⁺ et le rapport CD4⁺/CD8⁺, qui sont classiquement effectuées pendant la période post-transplantation.

Ceci suggère que la **numération cellulaire des sous populations immunitaires n'est pas suffisante pour évaluer l'immunocompétence** des receveurs d'allogreffe. Ces premières analyses représentent un état des lieux de la fonction immunitaire à 6 mois d'une allogreffe de CSH. Malgré la diversité caractéristique de cette population, nos résultats confirment **la valeur ajoutée de l'étude de l'immunité fonctionnelle** pour fournir des **informations supplémentaires sur l'immunocompétence**.

A notre connaissance, il s'agit de la première étude à rapporter un profil transcriptomique de la fonction immunitaire non associé à une quantité de cellules chez les receveurs d'allogreffe de CSH. Dans deux autres populations, *Tang et al.* décrivent à partir d'une cohorte de 261 individus sains que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ était négativement corrélé à leur fonction, mesurée par la sécrétion d'IFN- γ post stimulation par méthode de coloration intracellulaire (ICS) ($r = -0.473$ et -0.431 respectivement) (300). *Kowalski et al.* révèlent dans une étude multicentrique comprenant 155 adultes sains et 127 receveurs d'une greffe d'organes, qu'aucune corrélation n'a été trouvée ($r^2 < 0.1$) entre le nombre de lymphocytes T CD4⁺ et leur fonction analysée par le test Immuknow (301). Ceci suggère une nouvelle fois que **la numération cellulaire des sous-populations immunitaires n'est pas suffisante pour évaluer l'immunocompétence**.

En s'intéressant à la mémoire cellulaire spécifique du VZV au sein de notre cohorte, nous observons également que 69 % des patients qui ne présentaient pas de réponse cellulaire possédaient des IgG anti-VZV positive. De plus, nous avons décrit une absence de corrélation entre sécrétion d'IFN- γ post stimulation avec le VZV et titre d'IgG anti-VZV ($r : 0.23$, p -value : 0.08). Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus par *Cassaniti et al.* et *Rondaan*

et al. où aucune corrélation n'a été observée entre le titre d'IgG anti-VZV spécifique et les réponses fonctionnelles des lymphocytes T post stimulation avec des peptides de VZV dans un contexte clinique de transplantation d'organe solide (302,303).

Ces observations révèlent que la **mesure des réponses cellulaires post stimulation semble plus pertinente que la mesure des titres d'anticorps spécifiques** anti-VZV pour la gestion des prophylaxies antivirales, notamment au sein des populations immunodéprimées recevant régulièrement des injections d'immunoglobulines intraveineuses.

De plus, dans notre étude sur le SARS-CoV-2 chez des sujets convalescents, l'association entre la réponse cellulaire fonctionnelle et la réponse humorale anti-SARS-CoV-2 a révélé que, selon le peptide utilisé pour la stimulation, entre 21% et 100% des patients ne présentant pas d'IgG anti-RBD étaient capable d'avoir une réponse cellulaire après stimulation. Ces résultats révèlent qu'en **absence d'une mémoire humorale, une mémoire cellulaire spécifique d'un pathogène peut être présente**, suggérant que la mémoire provenant de ces **deux compartiments n'est pas obligatoirement corrélée**.

Cassaniti et al. décrivent dans une cohorte d'individus convalescents, une faible corrélation entre réponse cellulaire et titre d'anticorps neutralisant (r^2 de 0.11 à 0.29, p.value de 0.03 à 0.495). Ils rapportent qu'une réponse des lymphocytes T spécifiques du SARS-CoV-2 était observée chez 88,9 % des patients ayant été infectés par le SARS-CoV-2 ne présentant pas d'anticorps anti-N (304).

Néanmoins, dans la majorité des études, la réponse T spécifique est évaluée par des tests type IGRA, permettant de mesurer post-stimulation l'IFN- γ sécrété par les cellules immunitaires présentes dans un échantillon composé de PBMC ou de sang total. Nonobstant, les NK, qui représente 5 à 15 % des cellules mononucléées du sang périphérique peuvent sécréter cette protéine (305). De plus, considérer uniquement les lymphocytes T sécréteurs d'IFN- γ comme l'étendard de la fonction cellulaire induit indirectement à négliger les lymphocytes T polyfonctionnels. *Nakiboneka et al.* ont évalué l'étendue des fonctions des lymphocytes T non révélées par la mesure unique de la sécrétion d'IFN- γ . Ils rapportent la présence de lymphocytes TCD4⁺ et CD8⁺ fonctionnels sécrétant de l'IL2, de la perforine et du TNF- α sans détecter de l'IFN- γ .

Dans l'ensemble, nos résultats obtenus à travers nos deux contextes de travail confirment que **l'étude de la réponse cellulaire** permet de fournir des informations complémentaires à la mesure de la réponse humorale. De plus, elle représente une **valeur ajoutée pour l'évaluation de l'immunocompétence globale** communément caractérisée par des numérations cellulaires.

C. Peut-on améliorer la gestion du risque infectieux en évaluant l'immunité fonctionnelle ?

Comment l'étude de l'immunité fonctionnelle pourrait-elle améliorer la prise en charge des patients, notamment dans **la gestion du risque infectieux** ?

Dans le cadre de l'allogreffe de CSH, en attendant le rétablissement de l'immunité cellulaire spécifique, l'utilisation d'une prophylaxie par valaciclovir permet de contrôler le risque de réactivation virale à VZV. Néanmoins, les recommandations actuelles ne donnent pas d'indication sur le moment optimal d'arrêt de la prophylaxie (306), souvent influencé par l'absence de lymphopénie T CD4⁺. **L'évaluation rapide de la mémoire cellulaire VZV-spécifique** obtenue dans nos travaux pourrait orienter les décisions sur **le maintien ou non de cette prophylaxie antivirale** afin i) de limiter le risque de réactivation virale tardive pour les patients non répondeurs et ii) d'éviter une surutilisation du valaciclovir qui pourrait favoriser la sélection d'*Herpesvirus*, notamment HSV résistant à l'aciclovir (307,308).

Afin de valider cette hypothèse, une **étude interventionnelle permettrait d'évaluer l'apport de la mesure de la réponse cellulaire fonctionnelle** anti-VZV dans la prise de décision de l'arrêt de la prophylaxie.

Toujours dans le contexte des réactivations virales aux *Herpesvirus*, nos travaux ainsi que ceux rapportés par *Paouri et al.* mettent en évidence un lien entre un défaut de la fonction immunitaire et la présence de réactivations virales à CMV chez des receveurs d'allogreffe de CSH (309), soulignant l'importance d'évaluer la fonction immunitaire cellulaire dans cette population spécifique.

Dans les perspectives de ce travail, les patients inclus dans cette étude à 6 mois post allogreffe de CSH seront également revus à 12 mois après transplantation. Ainsi, nous pourrions évaluer l'association entre l'état de la fonction immunitaire mesurée à 6 mois et la survenue d'évènements intercurrents tels que la rechute de la maladie ou la présence d'épisodes

infectieux. Il est à noter que l'évaluation de la fonction immunitaire à 6 mois post allogreffe de CSH était concomitante à l'initiation du calendrier vaccinal chez ces sujets, ainsi l'étude de l'immunité à 12 mois post transplantation nous permettra de savoir si la qualité de la réponse vaccinale est associée à la fonction immunitaire évaluée au moment de la vaccination.

Enfin, dans divers contextes, la **recherche de corrélat de protection** est essentielle pour optimiser les stratégies prophylactiques visant à réduire le risque infectieux. **L'immunité cellulaire est rarement prise en compte** pour établir ces corrélats de protection, ceci étant probablement lié à la faible utilisation de tests immunitaires fonctionnels standardisés capables de révéler cette immunité cellulaire spécifique. Dans le contexte du SARS-CoV-2 l'émergence des nouveaux variants a remis en cause les corrélations de protection basées sur les titres d'anticorps.

En effet, il a été récemment démontré que le variant Omicron est responsable d'un important **échappement immunitaire humorale**, entraînant des conséquences pratiques considérables en termes de protection conférée par les vaccins de première génération, les infections naturelles précédentes ou les anticorps monoclonaux thérapeutiques. A l'inverse, la stimulation de lymphocytes T par des peptides dérivés de la protéine spike du variant Omicron induit une réponse chez respectivement 91% et 70% des sujets vaccinés ou convalescents (310). Ces chiffres témoignent d'une **bonne activation de la mémoire cellulaire face au variant Omicron**.

L'immunité cellulaire semble moins sensible à l'échappement immunitaire causée par l'émergence des variants. De plus, la faible corrélation entre réponse mémoires humorales et cellulaires incite à **tenir compte également de la fonctionnalité des lymphocytes T** afin de définir des nouveaux corrélats de protection. L'utilisation massive de tests standardisés type IGRA peuvent être une première approche facilement applicable pour répondre à ce besoin, particulièrement urgent chez les sujets souffrant de déficits immunitaires primitifs ou secondaires.

Dans l'ensemble, l'intégralité de nos résultats ont démontré la possibilité de réaliser des **tests immunitaires fonctionnels** avec un **haut de niveau de standardisation**, ce qui représentait jusqu'ici une des principales limites à leur utilisation.

Nous avons également pu prouver que l'étude de l'immunité fonctionnelle **apportait des informations complémentaires et supplémentaires** aux tests d'immunomonitoring classiquement réalisés. L'ensemble de ces résultats ouvrent de **réelles perspectives pour l'amélioration de la gestion du risque infectieux** chez des individus présentant des altérations immunitaires.

ANNEXES

ANNEXE 1

Torque teno virus viral load as a marker of immune function in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation recipients

Les *Anelloviridae* constituent une famille de virus de découverte récente, mais paradoxalement négligé par la communauté scientifique car considéré comme des virus «orphelins» sans pathologie associée. Ce sont des virus à ADN de structure complexe et possédant de nombreux variants ou génotypes connus.

Le Torque Teno Virus (ou TTV), premier membre de la famille des *Anelloviridae* à avoir été découvert, a été isolé en 1997 au Japon chez un homme transfusé de 58 ans (311). Depuis, bien que la plupart des études se sont intéressées au genre TTV, la famille des *Anelloviridae* est aujourd'hui composée de 9 genres incluant des virus humains et animaux (312). On estime que plus de 50 % de la population générale était infectée par le TTV au début des années 2000, passant à 65% en 2020 (313,314). Concernant la détection du TTV chez les receveurs d'organes, sa prévalence dans le plasma est de 70 % en transplantation cardiaque et pulmonaire (315), 84 % en transplantation pulmonaire (316) et 74 % chez les receveurs de foie (317). En parallèle, les analyses du virome humain sanguin par séquençage haut débit révèlent également que les *Anelloviridae* et le TTV en particulier en sont des constituants majeurs, de l'ordre de 70% (315).

Les liens entre le virome ; en particulier les *Anelloviridae*; et le système immunitaire ont été largement étudiés ces dernières années (318–320). L'étude longitudinale de *De Vlaminck et al.* rapporte notamment que la composition du virome est profondément affectée par les immunosuppresseurs et peut être corrélée au risque de rejet de greffe ou de survenue d'infections chez des receveurs d'organes solides (319). Ces premières données ont incité des chercheurs à utiliser la charge virale de TTV comme marqueur de substitution de l'immunité fonctionnelle (321–323) et à proposer des seuils de charges virales élevées pour prédire la survenue d'épisodes infectieux ou de mauvais pronostic chez des sujets receveurs de greffe d'organe ou de cellules souches hématopoïétiques allant de 3 à plus de 9 log cp/mL en fonction des contextes cliniques (324–328).

Au cours de nos travaux, nous avons ainsi tenté d'évaluer si la mesure de la charge virale circulante du TTV pourrait être un biomarqueur pertinent pour refléter la fonction des lymphocytes T dans la cohorte de sujets receveurs d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques citées précédemment. Pour investiguer cette question, nous avons étudié prospectivement la corrélation entre la charge virale TTV mesurée dans le plasma, le nombre de lymphocytes et la fonctionnalité lymphocytaire T estimée par leur capacité proliférative après stimulation par un mitogène. Plus élevées par rapport aux charges virales quantifiées dans le sang de donneurs sains, les charges virales TTV retrouvées chez les receveurs de greffe de CSH s'est avérée être davantage corrélée à la fonctionnalité des lymphocytes T qu'aux différents comptes lymphocytaires. La corrélation inverse obtenue entre charge virale TTV et prolifération post stimulation suggère que **plus la fonction immunitaire des lymphocytes T diminue, plus la charge virale TTV augmente**, et ce, indépendamment du nombre de cellule.

Malgré les limites de notre étude et les données encore très débattue dans la littérature notamment concernant les seuils de charges virales (329–332), notre étude reste à ce jour **la première à évaluer le lien entre la charge virale TTV et un marqueur direct de la fonction immunitaire**, encore une fois non reflétée par le nombre de lymphocytes circulants. La mesure de la charge virale présente l'avantage d'être rapide, standardisée et facile à réaliser ; l'évaluation de la dynamique de la charge virale TTV pourrait être un **outil intéressant** pour **l'évaluation de la fonction immunitaire** chez des sujets immunodéprimés.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de l'article « **Torque teno virus viral load as a marker of immune function in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation recipients** », publié en 2020 dans la revue scientifique « Viruses ».

Publication

Torque teno virus viral load as a marker of immune function in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation recipients

William Mouton, Anne Conrad, Antonin Bal, Mathilde Boccard, Christophe Malcus, Sophie Ducastelle-Lepretre, Marie Balsat, Fiorenza Barraco, Marie-Virginie Larcher, Gaëlle Fossard, Hélène Labussière-Wallet, Florence Ader, Karen Brengel-Pesce, and Sophie Trouillet-Assant

2020

Published in *Viruses*: DOI: [10.3390/v12111292](https://doi.org/10.3390/v12111292)

1 *Research article*

2 **Torque teno virus viral load as a marker of immune** 3 **function in allogeneic haematopoietic stem cell** 4 **transplantation recipients**

5 **William Mouton^{1*}; Anne Conrad^{4, 5, 6}; Antonin Bal^{1,3,7}; Mathilde Boccard^{1, 4, 5}; Christophe**
6 **Malcus⁸; Sophie Ducastelle-Leprêtre⁹; Marie Balsat⁹; Fiorenza Barraco⁹; Marie-Virginie**
7 **Larcher⁹; Gaëlle Fossard⁹; Hélène Labussière-Wallet⁹; Florence Ader^{4, 5, 6}; Karen Brengel-**
8 **Pesce^{1, 2}; and Sophie Trouillet-Assant^{1, 3}**

9 ¹Joint Research Unit Hospices Civils de Lyon-bioMérieux, Civils Hospices of Lyon, Lyon Sud Hospital,
10 Pierre-Bénite, 69310, Rhône, France.

11 ²Open Innovation & Partnerships (OIP), bioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, 69280, Rhône, France.

12 ³Virology and Human Pathology - Virpath Team, International Centre for Research in Infectiology (CIRI),
13 INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, 69008, Rhône, France.

14 ⁴International Centre for Research in Infectiology (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon,
15 Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, 69364, Rhône, France.

16 ⁵Civil Hospices of Lyon, Croix-Rousse hospital, Infectious and Tropical Diseases Department, Lyon, 69004,
17 Rhône, France.

18 ⁶Claude Bernard Lyon I University, Villeurbanne, 69100, Rhône, France.

19 ⁷Civils Hospices of Lyon, Croix-Rousse hospital, Institute of Infectious Agents, Virology Laboratory, Lyon,
20 69004, Rhône, France.

21 ⁸Civils Hospices of Lyon, Edouard Herriot hospital, Immunology Laboratory, Lyon, 69003, Rhône, France

22 ⁹Civils Hospices of Lyon, Lyon Sud hospital, Clinical Haematology Department, Pierre-Bénite, 69310, Rhône,
23 France.

24 **On behalf of the Lyon HEMINF study group:** F. Ader, V. Alcazer, E. Bachy, M. Balsat, F. Barraco, M.
25 Boccard, C. Chidiac, A. Conrad, S. Ducastelle-Leprêtre, O. Dumitrescu, D. Dupont, V. Escuret, E. Ferrant, T.
26 Ferry, E. Frobert, H. Ghesquière, M. Heiblig, E. Hodille, L. Karlin, H. Labussière-Wallet, M-V. Larcher, F.
27 Laurent, B. Lina, G. Lina, C. Malcus, P. Miaillhes, G. Monneret, F. Morfin-Sherpa, T. Perpoint, F. Poitevin-
28 Later, M. Rabodonirina, C. Roure-Sobas, V. Safar, G. Salles, P. Sesques, S. Trouillet-Assant, F. Valour, F.
29 Venet, F. Wallet, M. Wallon.

30 * Correspondence: william.mouton1@biomerieux.com; Tel: +33(0)4 72 67 87 81;

31 Received: date; Accepted: date; Published: date

32 **Abstract:** Torque teno virus (TTV) has been proposed as a surrogate biomarker of T-cell function in
33 allogeneic-haematopoietic-stem-cell transplantation (allo-HSCT). Conflicting data exists regarding
34 the value of TTV to assess the degree of immunosuppression. The aim of the present study was to
35 investigate the correlation between TTV viral load and immune function. Using samples from a
36 prospective cohort composed of healthy-volunteers (HV) and allo-HSCT recipients at 6 months
37 post-transplantation, we assessed the correlation between TTV viraemia and immune cell counts or
38 T-cell proliferation capacity post-phytohaemagglutinin stimulation. TTV viraemia was detected in
39 68% of HV (n=80) and 100% of allo-HSCT recipients (n=41; p<0.001); it was significantly higher in
40 allo-HSCT recipients (3.9 vs. 2.1 Log copies/mL, p<0.001). There was no correlation between T-cell
41 function and CD3⁺T-cell count (rho:0.002) suggesting that T-cell count can normalise without full-
42 functional recovery. Furthermore, no significant correlation was observed between TTV viraemia
43 and absolute total/subset lymphocyte counts (rho:<0.13). The highest correlation was observed
44 between TTV viral load and T-cell proliferation capacity (rho:-0.39). We therefore report an inverse
45 correlation between T-cell function and TTV viraemia that is independent of T-cell count.
46 Monitoring of TTV viraemia could be a fast suitable option to objectively assess the competence of
47 immune function in at-risk populations.

48 **Keywords:** Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT); Torque teno virus
49 (TTV); Immune functional assay; Immunocompetence; Biomarker
50

51 1. Introduction

52 Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a cellular therapy used for
53 the cure of malignant and non-malignant haematological disorders. From the immunological point
54 of view, allo-HSCT recipients represent a highly specific population experiencing a phase of
55 profound immunosuppression followed by gradual immune recovery [1–3]. Both the speed and
56 quality of immune reconstitution are variable; these depend on haematological and transplant
57 characteristics, as well as post-transplant complications such as graft-versus-host-disease (GvHD).
58 This is also of importance as prolonged immunosuppression exposes allo-HSCT recipients to
59 transplant rejection, relapse of the underlying disease and infectious complications [4].

60 During the immune reconstitution period, tools to effectively measure the individual degree of
61 immunosuppression are needed. Absolute lymphocyte counts, such as counts of T-cell subtype
62 populations, are currently used as biomarkers of immune reconstitution, although this is not
63 informative on their function [5–7]. A simple blood biomarker mirroring T-cell function would be
64 useful, and measuring the blood viral load of torque teno virus (TTV) may be of interest in this
65 context. TTV is a ubiquitous, non-enveloped DNA virus from the *Anelloviridae* family with no known
66 pathogenicity and constitutes the main component of the human blood virome [8]. Previous studies
67 in the transplant setting have suggested that TTV viral load and/or the composition of the
68 *Anelloviridae* virome could be surrogate markers of immune competence and could be useful to
69 monitor patients' immunity and to guide pharmacological interventions [9–14]. However, none of
70 these analysed the correlation between TTV viral load and a direct markers of immune function; only
71 indirect markers of immunocompetence have been previously used, such as clinical adverse
72 outcomes (type of disease, graft rejection, infections, or GvHD) or immune cell counts for which
73 conflicting data exists, especially in the allo-HSCT context [9,15]. In addition to being based only on
74 an indirect correlation, the link between TTV and immune function warrants further investigation.
75 We therefore studied prospectively the correlation between TTV viraemia, immune cell counts and
76 lymphocyte competency estimated by their proliferating capacity in allo-HSCT recipients at 6 months
77 post-transplant.

78 2. Materials and Methods

79 2.1. Study population

80 Were included, adult (≥ 18 years) allo-HSCT recipients transplanted at the haematology
81 department of the Lyon university hospital (France) and enrolled in the prospective, single-centre
82 cohort study "VaccHemInf" between May 2018 and April 2020. The VaccHemInf cohort study has
83 been previously described and aims at studying vaccine immunogenicity and immune reconstitution
84 after allo-HSCT [16]. The cohort has been approved by a regional review board (*Comité de Protection*
85 *des Personnes Sud-Est V*, Grenoble, France; number 69HCL17_0769) and is registered in
86 *ClinicalTrial.gov* (NCT03659773). At inclusion, demographics (age and sex), haematological and
87 transplant-related (underlying haematological disease [based on 2016 revision of the World Health
88 Organization classification of myeloid and lymphoid neoplasms], conditioning regimen, stem cell
89 source, and donor type) as well as post-transplant characteristics (GvHD, immunomodulatory
90 medication[s]) and immunosuppressive therapies including antithymocyte globulins, cyclosporine,
91 tacrolimus, methotrexate, mycophenolate mofetil, cyclophosphamide, corticosteroids ≥ 1 mg/kg > 21
92 days) were retrieved from medical records through an electronic case report form (eCRF). The
93 presence of viral opportunistic infection/reactivation (except TTV viral load) was also routinely
94 monitored by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) in the routine virology laboratory and
95 reported in the eCRF during the post-transplant period. Infections, infectious agent-related

96 reactivations and diseases was reported using classification guidelines from European Group for
97 Blood and Marrow Transplantation, as reported previously [16]. Concomitantly, healthy volunteers
98 (HV) were recruited among donors to the Lyon blood transfusion centre (*Etablissement Français du*
99 *Sang*, EFS) and were considered as a control group. According to the EFS procedures, informed
100 consent was obtained from HV and personal data were anonymous.

101 2.2. Blood sampling

102 Before initiation of the recommended vaccination schedule after allo-HSCT [17,18], samples of
103 heparinised whole blood and EDTA plasma were collected and processed for the measurement of
104 quantitative and qualitative parameters of immune reconstitution.

105 2.3. TTV viral load quantification

106 TTV viral DNA (elution volume 50 μ L) was extracted from 200 μ L of plasma sample using an
107 easyMag extractor (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) following the manufacturer's instructions.
108 The presence and viral load of TTV were then determined using the TTV R-GENE[®] kit (available for
109 research use only, not for diagnostic, Ref#69-030; bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) as previously
110 described [19,20]. Log of TTV DNA copy number/mL (Log copies/mL) plasma are used to describe
111 TTV viral load. The lowest viral load detected was 0.46 Log copies/mL.

112 2.4. T-cell proliferation assay

113 Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from fresh heparinised blood
114 samples using a Ficoll density gradient centrifugation (U-04; Eurobio, Les Ulis, France). Then, 10⁵
115 cells/well were incubated 24 hours in supplemented culture medium (RPMI 1640; Eurobio) in a 96-
116 well cell culture plate at 37°C under 5% CO₂. PBMCs were then stimulated in duplicate with
117 phytohaemagglutinin (PHA) at 4 μ g/mL (R30852801; Remel[™], Dartford, Kent, UK) and incubated
118 for 72 hours. Then, cellular pellets were analysed for T-cell proliferation using the Click-It[®] EdU
119 AF488 flow kit (C10420; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) to measure incorporation of 5-
120 ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) according to the previously published protocol [21]. The proportion
121 (%) of EdU⁺ proliferating cells (among CD3⁺ T-cell) was obtained by flow cytometry analyses
122 performed on a BD LSR Fortessa[™] flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). For each
123 experiment, a minimum of 2.5 \times 10³ CD3⁺ T-cells was recorded. Data were analysed using BD
124 FACSDiva Software (version 8.0.3; BD Biosciences).

125 2.5. Post-transplant T-cell immunophenotyping

126 Extensive T-cell immunophenotyping by flow cytometry on whole blood was performed at the
127 immunology laboratory of the Lyon university hospital. Counts of naive CD4⁺ and CD8⁺ T-cell
128 (CD45⁺CCR7⁺), central memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell (CD45RA⁺CCR7⁺), effector memory CD4⁺ and
129 CD8⁺ T-cell (CD45RA⁺CCR7⁺), differentiated memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell (CD45RA⁺CCR7⁻) were
130 determined (cells/ μ L) as previously described [15]. The normal values for each type of cells have been
131 provided by the immunology laboratory.

132 2.6. Statistical analysis

133 The Shapiro-Wilk normality test was used to determine the distribution of data, and accordingly
134 quantitative data was expressed as mean (range) or median [interquartile range [IQR]. TTV viral load
135 was log-transformed for analysis (Log copies/mL). For HV and allo-HSCT recipients' datasets,
136 analysis of variance was performed using *F*-test and differences were calculated using a parametric
137 unpaired *t* test with Welch's correction. Correlations were assessed using a parametric Pearson rho
138 correlation coefficient (rho [95% confidence interval, CI]). Regression analyses were conducted to
139 evaluate the association between the dependent variable, TTV viral load, and independent variables
140 (proportion of proliferating cells, absolute lymphocytes counts, and CD3⁺ T-cell counts). Differences

141 in TTV plasma viral load according to several clinical characteristics were performed using the non-
142 parametric Mann-Whitney test.

143 A p-value of <0.05 was considered significant. Statistical analyses were conducted using
144 GraphPad Prism® software (version 5; GraphPad software, La Jolla, CA, USA) and R (version 3.5.1,
145 R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for
146 Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>).

147 3. Results

148 3.1. Participant characteristics

149 A total of 41 allo-HSCT recipients and 80 HV were included. Age (median [IQR]: 46 [31-53] vs.
150 56 [40-64] years, $p=0.32$) and sex ratio (1.6 vs. 1.4, $p=0.85$) were similar among allo-HSCT recipients
151 and HV. Allo-HSCT recipients were enrolled at a median [IQR] of 6 [5-8] months post-transplant.
152 Patient characteristics are summarised in Table 1; of note, 17% ($n=7$) had chronic GvHD and 78%
153 ($n=32$) of allo-HSCT recipients were still under immunosuppressive medication.

154 **Table 1.** Clinical characteristics of allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients.

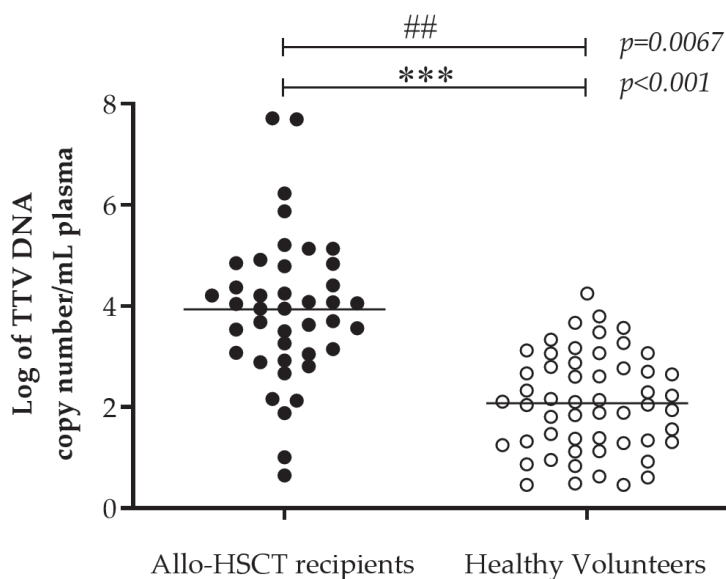
	Patients n= 41
Demographics	56 [40-64]
Age, median [IQR]	24 (59)
Time from transplantation in months, median [IQR]	6 [5-8]
Haematological and transplant-related characteristics. n (%)	
<i>Underlying haematological diseases</i>	
Myeloid neoplasm and acute leukaemia	37 (90)
Mature lymphoid. histiocytic. and dendritic neoplasms	4 (10)
CR before the engraftment. n (%)	39 (95)
<i>Donor types</i>	
Matched related	23 (56)
Unrelated	18 (44)
Fully matched	15 (37)
HLA mismatched	3 (7)
<i>Stem cell source</i>	
Peripheral blood cells	28 (68)
Bone marrow	13 (32)
<i>Conditioning regimen</i>	
MAC	17 (41)
RIC	24 (59)
TBI	11 (27)
Post-transplant complications. n (%)	
Acute GvHD	30 (73)
Grade I/II	21/9
Chronic GvHD	7 (17)
Limited/Extensive	5/2
Immunophenotyping. mean (range)	
Absolute lymphocytes (NV. 1000-2800/ μ L)	1659 (410-5350)
CD3 ⁺ T-cells (NV. 521-1772/ μ L)	915 (175-3406)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-cells (NV. 336-1126/ μ L)	273 (38-876)
Naïve CD4 ⁺ (CD45 ⁺ CCR7 ⁺) (NV. 121-456/ μ L)	45 (0-445)
Central Memory CD4 ⁺ (CD45RA-CCR7 ⁺) (NV. 92-341/ μ L)	60 (1-168)
Effector Memory CD4 ⁺ (CD45RA-CCR7 ⁻) (NV. 59-321/ μ L)	163 (4-522)

102/ μ L)	Differentiated Memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV. 11-102/ μ L)	19 (0-147)
	CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-cells (NV. 125-780/ μ L)	602 (60-2779)
	Naïve CD8 ⁺ (CD45 ⁺ CCR7 ⁺) (NV. 86-257/ μ L)	40 (0-241)
	Central Memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺) (NV. 19-93/ μ L)	17 (0-127)
	Effector Memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV. 15-162/ μ L)	286 (0-1517)
212/ μ L)	Differentiated Memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV. 39-212/ μ L)	257 (0-1474)
	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio (NV. 0.9-6)	0.84 (0.13- 8.88)
Post-transplant immunomodulatory therapy at inclusion, n (%)		
	IS Therapy	32 (78)
	Corticosteroids	5 (12)
	IVIG infusion	23 (56)
	Time since last IVIG infusion, month (median [IQR])	4 [2-5]
	DLI	7 (17)
	ECP	2 (5)

155 Abbreviations: Allo. allogeneic; CR. complete remission; DLI. donor lymphocyte infusion; ECP. extracorporeal
 156 photochemotherapy; GvHD. graft-versus-host disease; HLA. human leukocyte antigen; HSCT. haematopoietic
 157 stem cells transplantation; IQR. interquartile range; IS. immunosuppressive; MAC. myeloablative conditioning;
 158 NK. Natural Killer; NV. normal values; RIC. reduced intensity conditioning; TBI. total body irradiation.

159 3.2. Plasma TTV viral load in allo-HSCT recipients and HV

160 TTV was detected in 100% (41/41) of allo-HSCT recipients and 68% (54/80) of HV ($p < 0.001$). Mean
 161 (range) TTV viral load was significantly higher in allo-HSCT recipients compared to HV [3.9 (0.7-7.7)
 162 vs 2.1 (0.5-4.3) Log copies/mL respectively, $p < 0.001$; Figure 1].



163

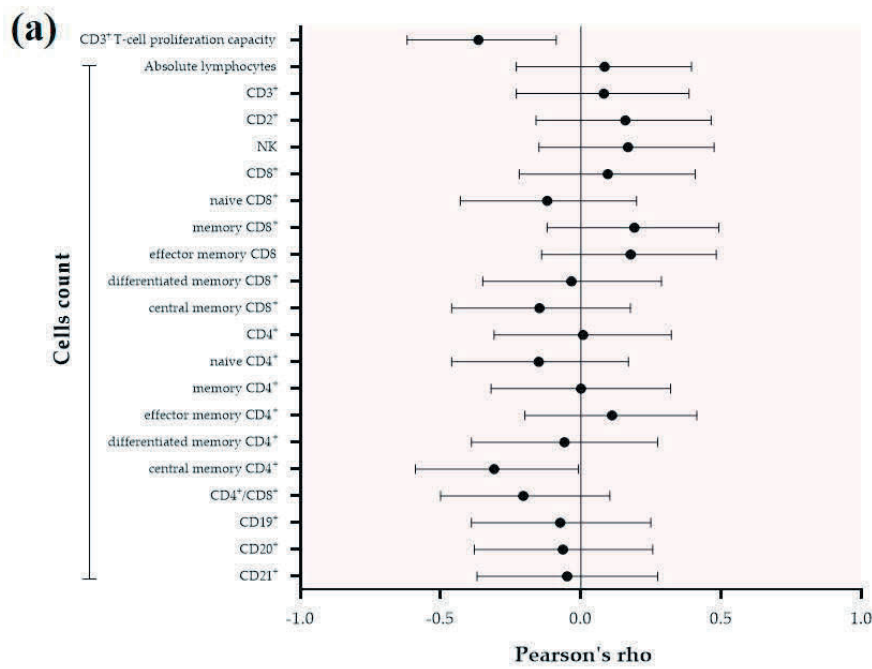
164 **Figure 1.** TTV viral load in healthy volunteers and allo-HSCT plasma samples

165 TTV viral load from 41 allo-HSCT recipients (black) and 54 healthy volunteers (white) plasma was
 166 quantified by real-time qPCR. Variance was compared using F-test (## $p < 0.01$). The mean TTV viral
 167 load (black line) was compared using unpaired t test with Welch's correction (** $p < 0.001$).
 168 Abbreviations: Allo. allogeneic; HSCT. haematopoietic stem cells transplantation; TTV. torque teno
 169 virus.

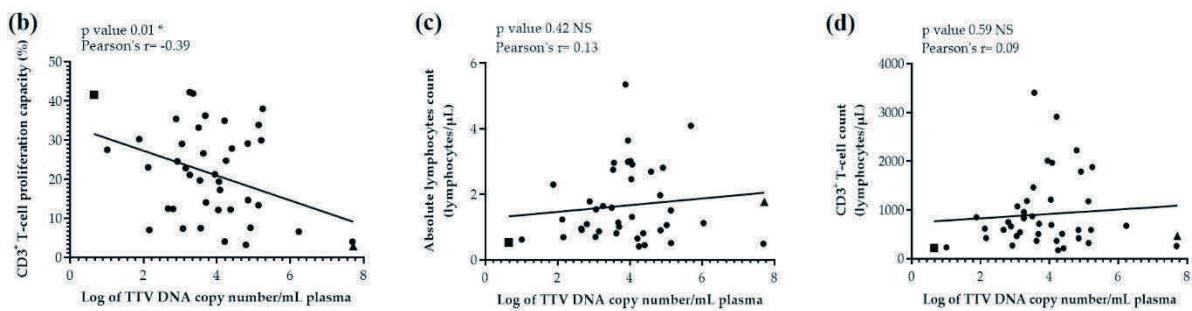
170 No correlation was found between the delay post-transplant [5-8 months] and plasma TTV viral
 171 load (Pearson's rho $\rho=0.03$, 95% CI [-0.2811 to 0.3338], $p=0.86$; Figure S1).

172 3.3. Correlation between TTV viral load and T-cell counts or proliferation capacity

173 In allo-HSCT recipients, absolute lymphocytes and CD3+ T-cells counts were within normal
 174 value ranges. Five out of ten lymphocyte subtype counts studied were lower than the normal value
 175 range, such as naïve and central memory CD3+CD4+ or CD3+CD8+ T-cells (individual values available
 176 in Table S1). A significant lower mean (range) proliferation capacity among CD3+ T-cells was
 177 observed in allo-HSCT recipients compared to HV [21.3% (2.9-42.3%) vs. 40.5% (29.7-55.3%), $p<0.001$].
 178 In addition, a significantly wider range and a more heterogeneous distribution of proliferation
 179 capacity were observed among allo-HSCT recipients compared to HV (2.9%-42.3% vs. 29.7%-55.3%,
 180 respectively, F-test $p=0.004$), indicating the inter-individual variability in the immune reconstitution
 181 after allo-HSCT (Figure S2). Correlations between TTV viral load and T-cell proliferation capacity or
 182 absolute cell counts were then analysed among allo-HSCT recipients (Figure 2A). The highest
 183 correlation was between TTV viral load and T-cell proliferation capacity (Pearson's rho $\rho=-0.39$, [-
 184 0.62 to -0.09]; Figure 2B); there was no significant correlation between TTV viral load and absolute
 185 lymphocytes (Figure 2C) or CD3+ T-cell counts (Figure 2D).



186



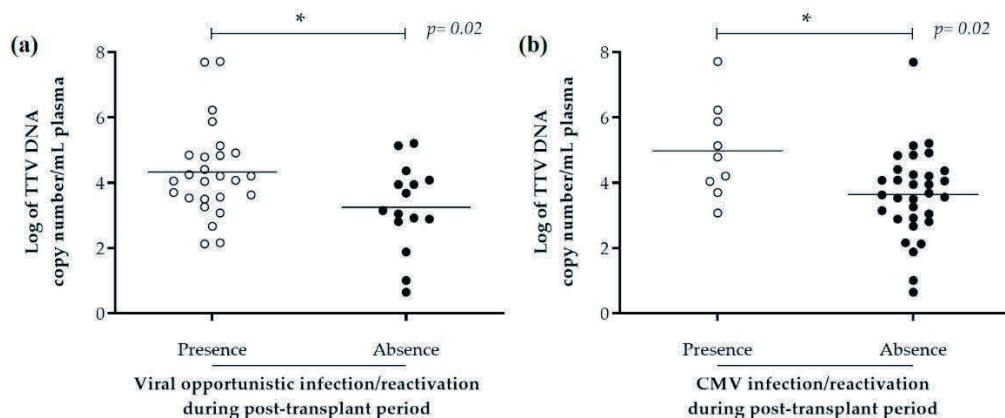
187

188 **Figure 2.** Overall correlation of TTV plasma viral load from 41 allo-HSCT recipients plasma versus T-
 189 cell subtype counts and CD3+ T-cell proliferation capacity (a). Pearson's rho and 95% confidence
 190 interval (95%CI) for all parameters are represented by black dots and lines, respectively. Detailed
 191 correlation of TTV viral load from 41 allo-HSCT recipients' plasma versus: (b) CD3+ T-cell
 192 proliferation capacity, (c) Absolute lymphocyte count, and (d) CD3+ T-cell count. Extreme patients:

193 "A" (square) and "B" (triangle), as well as the linear regression (black line) are presented. Correlation
 194 of TTV viral load (x-axis) and cell count or CD3+ T-cell proliferation capacity (y-axis) was determined
 195 using Pearson's correlation coefficient. Abbreviations: NK. Natural killer; PHA. Phytohemagglutinin;
 196 TTV. torque teno virus

197 3.4. Correlation between (post-)transplant characteristics and TTV viral load

198 There was a significantly higher median [IQR] plasma TTV viral load in allo-HSCT recipients
 199 with viral opportunistic infection/reactivation (4.1 Log copies/mL [3.5-4.9], n=26, p=0.02) compared
 200 to other allo-HSCT recipients (3.2 Log copies/mL [2.8-4.1], n=15; Figure 3A). This was also the case
 201 for allo-HSCT recipients with CMV infection/reactivation (4.8 Log copies/mL [4.0-5.9], n=9, p=0.02)
 202 compared to other allo-HSCT recipients (3.7 Log copies/mL [2.9-4.3], n=32; Figure 3B). Other
 203 characteristics did not significantly impact TTV viral loads in univariate analysis (Table S2).



204 **Figure 3.** TTV viral load in allo-HSCT recipients according to post transplant viral
 205 infection/reactivation. TTV viral load from 41 allo-HSCT with (white) or without (black) (a) viral
 206 opportunistic infection/reactivation and (b) CMV infection/reactivation during post-transplant
 207 period. Comparison between groups was performed using Mann-Whitney test (***, p< 0.001).
 208 Abbreviations: Allo. allogeneic; CMV. Cytomegalovirus; HSCT. haematopoietic stem cells
 209 transplantation; TTV. torque teno virus.
 210

211 3.5. Clinical characteristics of allo-HSCT recipients with extreme values of TTV viral load

212 By analysing at an individual level the correlation between the TTV viral load and the T-cell
 213 proliferation capacity in response to PHA stimulation, we noticed that patient 'A' with the lowest
 214 viral load (0.65 Log copies/mL) had one of the highest T-cell proliferation capacity (41.6% EdU+
 215 proliferating cells among CD3+ T-cell; square on Figure 2B). Conversely, patient 'B' with the highest
 216 viral load (7.72 Log copies/mL) had the lowest T-cell proliferation capacity (2.9% EdU+ proliferating
 217 cells among CD3+ T-cell; triangle on Figure 2B). Patient 'A' had an uncomplicated post-transplant
 218 course (Figure S3A); conversely, patient 'B' suffered from chronic GvHD (grade I requiring
 219 immunosuppressive therapy [topical corticosteroids], received monthly intravenous
 220 immunoglobulin infusions and had presented multiple episodes of post-transplant infections (Figure
 221 S3B). Patient characteristics are summarised in Table 2.
 222

223

Table 2. Clinical characteristics of patients with extreme values of TTV viral load.

	Patient A	Patient B
Demographics		
Age	52	57
Sex	Male	Female
Haematological and transplant-related characteristics		
Underlying haematological diseases	Mature B cells neoplasm	Acute myeloid leukaemia
CR before the engraftment	Yes	Yes
Donor types	Geno-identical	Pheno-identical (9/10)
Stem cell sources	Bone marrow	Peripheral blood cells
Conditioning regimen	MAC	RIC
Total body irradiation	Yes	No
Post-transplant complications		
Acute GvHD	No	Yes, grade I
Chronic GvHD	No	No
Post-transplant immunomodulatory therapy		
IS therapy	No	Yes
IVIG infusion	No	Yes
Number of infections after transplantation	0	5
TTV viral load in Log copies/mL	0.65	7.72
CD3⁺ T-cell proliferation capacity	41.6	2.9

224

225

226

Abbreviations: GvHD. graft versus host disease; IS. immunosuppressive therapy; IVIG; intravenous immunoglobulin; MAC. myeloablative conditioning; RIC. reduced intensity conditioning; TTV. torque teno virus.

227

4. Discussion

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

In the present study we measured TTV viral load in allo-HSCT recipients at a median time of 6 months post-transplant and in HV. The frequency and level of TTV viral load in HV was coherent with the findings of a recent study reported by Focosi *et al.* (prevalence of 65% and 2.3 ± 0.7 Log copies/mL of TTV viral load) [22]. In allo-HSCT recipients, while absolute lymphocytes and CD3⁺ T-cells counts had normal values, TTV viral load was significantly higher than in HV, as previously reported [14,23]. Interestingly, despite heterogeneity in CD3⁺ T-cell proliferation among allo-HSCT recipients, the highest correlation was observed between TTV viral load and CD3⁺ T-cell proliferation in comparison with all T-cell subtype counts. Thus, as previously established, T-cell function and TTV viral load are inversely correlated [12,24]. In line with this observation, Focosi *et al.* suggested that TTV viral load is associated with the number of CD8⁺/CD57⁺ T-cells, a subtype of lymphocyte described as potential markers of immunosenescence and found in greater proportions in conditions such as acquired immunodeficiency states, transplants, or persistent viral infections [25].

240

241

242

243

244

245

246

In allo-HSCT recipients, the peak of TTV viral load occurs approximately at 3 to 6 months post-transplant before returning to value observed prior transplantation [9,26]. In the present study, we observed that at 6 months post-transplant during the immune reconstitution period, some patients are still unable to regulate the TTV replication, leading to high blood viral load, despite a sufficient number of T-cells. This observation has been also reported for other viruses such as cytomegalovirus (CMV) or Epstein-Barr virus (EBV) [9,27,28]

247

248

249

250

251

252

253

In addition, the lack of correlation between T-cell function, assessed by proliferative capacity in response to PHA stimulation, and the absolute number of T-cell subtypes (Pearson's rho: 0.002, 95CI [-0.3257; 0.3223]; data not shown) suggests that evaluation of lymphocyte counts at 6 months post-transplant cannot be used as a relevant marker of reconstitution of immune functions: T-cells can normalise without necessarily restoring immunity and T-cells count does not allow to reveal the inter-individual variability of allo-HSCT recipients [7]. In addition, in the early post-transplant period, despite conflicting data [15]; a few studies [13,29] report a weak correlation between T-cell count and TTV viral load. This correlation can be explained by the absolute lymphocyte count reconstitution

254 post engraftment, which then serve as a TTV replication reservoir, thus avoiding extrapolation
255 between TTV and T-cell function. Indeed, as suggested by Pradier *et al.*, the correlation between T-
256 cell subtype count and TTV viral load can vary according to the interval post-transplant [5]. This
257 result highlights the need for new markers to evaluate lymphocyte function. The use of an immune
258 functional assay (IFA) such as the assessment of post-stimulation T-cell proliferation capacity could
259 fill this need but its implementation in clinical practice remains difficult. TTV could be interesting as
260 a biomarker to estimate immune function and finally to predict infectious and/or clinical events
261 related to the immune system [5,9,22,26,30].

262 The present study found a correlation between T-cell function, assessed by the proliferation
263 capacity in response to PHA stimulation, and TTV viral load in a well-characterised cohort of allo-
264 HSCT recipients. These data suggest an interplay between TTV replication and cellular immune
265 reconstitution after transplantation, especially the reconstitution of T-cells which are one of the main
266 replicating site of TTV [31].

267 The study does, however, have limitations, notably related to the small number of patients. For
268 instance, because allo-HSCT recipients were referred for vaccination by their haematologists, we
269 cannot exclude a selection bias, which could explain the absence of difference between clinical
270 characteristics (e.g. underlying disease, conditioning, immunosuppressive therapy, or GvHD) and
271 TTV viral load (Table S2). Moreover, it would be interesting to validate these results by assessing
272 kinetics of TTV viral load and lymphocyte proliferative capacities at consecutive time points in this
273 specific recipient population or in other immunocompromised populations. Furthermore, assessing
274 the T-cell function through the measurement of their proliferating capacity might be a reductionist
275 view of immune competency, and additional tests are needed to confirm the conclusions made.

276 5. Conclusions

277 In summary, we found an inverse correlation between the TTV viral load and T-cell function,
278 independently of the count of T-cells. The evaluation of immune competency, for at-risk populations,
279 using the monitoring of TTV viraemia requires further assessment, as currently under evaluation in
280 kidney transplant recipients [32]. Indeed, during the dynamic process of immune reconstitution post-
281 transplant, a pivotal period for allo-HSCT recipients, a rapid and individual assessment of the
282 immune system's capacities could be of clinical interest to adapt anti-infectious prophylactic
283 treatments, to guide the immunosuppressant treatment and *in fine* prevent graft rejection GvHD,
284 infectious events and relapsing disease, the main causes of morbimortality in this population.

285 **Supplementary Materials:** Figure S1: Correlation between TTV viral load and delays from HSCT; Figure S2:
286 Proliferation capacity of CD3⁺ T-cell of allo-HSCT recipients compared to healthy volunteers; Figure S3:
287 Chronological descriptive follow-up of patients with extreme values of TTV viral load; Table S1: T-cell
288 immunophenotyping of allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients and Table S2: Comparison of
289 TTV plasma viral load with clinical characteristics of 41 allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients.

290 **Author Contributions:** Conceptualisation and methodology, WM, AC, AB, MB, FA and STA; validation FA,
291 STA and KBP; formal analysis, WM; investigation, WM, AB, MB, KBP, and STA; resources, AC, CM, SDL, MBA,
292 FB, MVL, GF, HLW and FA, were involved in patient care; writing—original draft preparation WM and STA;
293 writing—review and editing, WM, AC, AB, MB, FA, KBP and STA; visualisation, WM; supervision and project
294 administration, FA, KBP and STA; funding acquisition, AC and FA. All authors have read and agreed to the
295 published version of the manuscript. KBP and STA take responsibility for the integrity of the data analysis.

296 **Funding:** “This research was funded by an internal grant from the Hospices Civils de Lyon (Appel d’Offre Jeune
297 Chercheur 2018, to AC) and by the the Région Auvergne-Rhône-Alpes (Pack Ambition Recherche 2019, to FA).

298 **Acknowledgments:** The authors would like to thank Philip Robinson for helpful reviewing of the manuscript
299 and the Direction de la Recherche Clinique et de l’Innovation (DRCI) des Hospices Civils de Lyon, the Hospices
300 Civils de Lyon, as well as the Région Auvergne-Rhône-Alpes for supporting the VaccHemInf cohort and the
301 FIGHT project.

302 **Conflicts of Interest:** WM, and KBP, are employed in bioMérieux SA, an in vitro diagnostic company. AB has
303 received research grant from bioMérieux and has served as consultant. The other authors have no relevant
304 affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial

305 conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment,
306 consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending,
307 or royalties.

308 References

- 309 1. Bosch, M.; Khan, F.M.; Storek, J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation: *Current*
310 *Opinion in Hematology* **2012**, *19*, 324–335, doi:10.1097/MOH.0b013e328353bc7d.
- 311 2. Ogonek, J.; Kralj Juric, M.; Ghimire, S.; Varanasi, P.R.; Holler, E.; Greinix, H.; Weissinger, E. Immune
312 Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front. Immunol.* **2016**, *7*,
313 doi:10.3389/fimmu.2016.00507.
- 314 3. de Silva, H.D.; Ffrench, R.A.; Korem, M.; Orłowski, E.; Curtis, D.J.; Spencer, A.; Avery, S.; Patil, S.;
315 Morrissey, C.O. Contemporary analysis of functional immune recovery to opportunistic and vaccine-
316 preventable infections after allogeneic haemopoietic stem cell transplantation. *Clin Transl Immunol* **2018**,
317 *7*, e1040, doi:10.1002/cti2.1040.
- 318 4. Sahin, U.; Toprak, S.K.; Atilla, P.A.; Atilla, E.; Demirer, T. An overview of infectious complications after
319 allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Infect. Chemother.* **2016**, *22*, 505–514,
320 doi:10.1016/j.jiac.2016.05.006.
- 321 5. Pradier, A.; Masouridi-Levrat, S.; Bosshard, C.; Dantin, C.; Vu, D.-L.; Zanella, M.-C.; Boely, E.; Tapparel,
322 C.; Kaiser, L.; Chalandon, Y.; et al. Torque Teno Virus as a Potential Biomarker for Complications and
323 Survival After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* **2020**, *11*, 998,
324 doi:10.3389/fimmu.2020.00998.
- 325 6. Hoshina, T.; Ohga, S.; Fujiyoshi, J.; Nanishi, E.; Takimoto, T.; Kanno, S.; Nishio, H.; Saito, M.; Akeda, Y.;
326 Oishi, K.; et al. Memory B-Cell Pools Predict the Immune Response to Pneumococcal Conjugate Vaccine
327 in Immunocompromised Children. *J Infect Dis.* **2016**, *213*, 848–855, doi:10.1093/infdis/jiv469.
- 328 7. Luo, Y.; Xie, Y.; Zhang, W.; Lin, Q.; Tang, G.; Wu, S.; Huang, M.; Yin, B.; Huang, J.; Wei, W.; et al.
329 Combination of lymphocyte number and function in evaluating host immunity. *Aging (Albany NY)* **2019**,
330 *11*, 12685–12707, doi:10.18632/aging.102595.
- 331 8. Focosi, D.; Antonelli, G.; Pistello, M.; Maggi, F. Torquetenovirus: the human virome from bench to
332 bedside. *Clinical Microbiology and Infection* **2016**, *22*, 589–593, doi:10.1016/j.cmi.2016.04.007.
- 333 9. Wohlfarth, P.; Leiner, M.; Schoergenhofer, C.; Hopfinger, G.; Goerzer, I.; Puchhammer-Stoeckl, E.;
334 Rabitsch, W. Torquetenovirus Dynamics and Immune Marker Properties in Patients Following Allogeneic
335 Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Prospective Longitudinal Study. *Biology of Blood and Marrow*
336 *Transplantation* **2018**, *24*, 194–199, doi:10.1016/j.bbmt.2017.09.020.
- 337 10. Mitchell, A.B.; Glanville, A.R. Kinetics of TTV-DNA Plasma Load: A Global Measure of Immune
338 Suppression? *Transplantation* **2019**, *103*, 660–661, doi:10.1097/TP.0000000000002437.
- 339 11. Focosi, D.; Maggi, F.; Albani, M.; Macera, L.; Ricci, V.; Gagnani, S.; Di Beo, S.; Ghimenti, M.; Antonelli,
340 G.; Bendinelli, M.; et al. Torquetenovirus viremia kinetics after autologous stem cell transplantation are
341 predictable and may serve as a surrogate marker of functional immune reconstitution. *Journal of Clinical*
342 *Virology* **2010**, *47*, 189–192, doi:10.1016/j.jcv.2009.11.027.
- 343 12. De Vlaminc, I.; Khush, K.K.; Strehl, C.; Kohli, B.; Luikart, H.; Neff, N.F.; Okamoto, J.; Snyder, T.M.;
344 Cornfield, D.N.; Nicolls, M.R.; et al. Temporal Response of the Human Virome to Immunosuppression
345 and Antiviral Therapy. *Cell* **2013**, *155*, 1178–1187, doi:10.1016/j.cell.2013.10.034.
- 346 13. Gilles, R.; Herling, M.; Holtick, U.; Heger, E.; Awerkiew, S.; Fish, I.; Höller, K.; Sierra, S.; Knops, E.; Kaiser,
347 R.; et al. Dynamics of Torque Teno virus viremia could predict risk of complications after allogeneic

- 348 hematopoietic stem cell transplantation. *Med Microbiol Immunol* **2017**, *206*, 355–362, doi:10.1007/s00430-
349 017-0511-4.
- 350 14. Masouridi-Levrat, S.; Pradier, A.; Simonetta, F.; Kaiser, L.; Chalandon, Y.; Roosnek, E. Torque teno virus
351 in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies.
352 *Bone Marrow Transplant* **2016**, *51*, 440–442, doi:10.1038/bmt.2015.262.
- 353 15. Kosulin, K.; Kernbichler, S.; Pichler, H.; Lawitschka, A.; Geyeregger, R.; Witt, V.; Lion, T. Post-transplant
354 Replication of Torque Teno Virus in Granulocytes. *Front Microbiol* **2018**, *9*, 2956,
355 doi:10.3389/fmicb.2018.02956.
- 356 16. Conrad, A.; Boccard, M.; Valour, F.; Alcazer, V.; Tovar Sanchez, A.-T.; Chidiac, C.; Laurent, F.; Vanhems,
357 P.; Salles, G.; Brengel-Pesce, K.; et al. VaccHemInf project: protocol for a prospective cohort study of
358 efficacy, safety and characterisation of immune functional response to vaccinations in haematopoietic
359 stem cell transplant recipients. *BMJ Open* **2019**, *9*, e026093, doi:10.1136/bmjopen-2018-026093.
- 360 17. Cordonnier, C.; Einarsdottir, S.; Cesaro, S.; Di Blasi, R.; Mikulska, M.; Rieger, C.; de Lavallade, H.; Gallo,
361 G.; Lehrnbecher, T.; Engelhard, D.; et al. Vaccination of haemopoietic stem cell transplant recipients:
362 guidelines of the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis* **2019**,
363 *19*, e200–e212, doi:10.1016/S1473-3099(18)30600-5.
- 364 18. Vaccination des personnes immunodéprimées ou aspléniques. Recommandations. 168.
- 365 19. Kulifaj, D.; Essig, M.; Meynier, F.; Pichon, N.; Munteanu, E.; Moulinas, R.; Joannes, M.; Heckel, D.;
366 Combrisson, J.; Barranger, C.; et al. Torque teno virus (TTV) in immunosuppressed host: Performances
367 studies of TTV R-Gene® kit and donors and recipients kidney samples genotyping. *Journal of Clinical*
368 *Virology* **2016**, *82*, S103–S104, doi:10.1016/j.jcv.2016.08.206.
- 369 20. Kulifaj, D.; Durgueil-Lariviere, B.; Meynier, F.; Munteanu, E.; Pichon, N.; Dubé, M.; Joannes, M.; Essig, M.;
370 Hantz, S.; Barranger, C.; et al. Development of a standardized real time PCR for Torque teno viruses (TTV)
371 viral load detection and quantification: A new tool for immune monitoring. *Journal of Clinical Virology*
372 **2018**, *105*, 118–127, doi:10.1016/j.jcv.2018.06.010.
- 373 21. Poujol, F.; Monneret, G.; Friggeri, A.; Rimmelé, T.; Malcus, C.; Poitevin-Later, F.; Pachot, A.; Lepape, A.;
374 Textoris, J.; Venet, F. Flow cytometric evaluation of lymphocyte transformation test based on 5-ethynyl-
375 2'-deoxyuridine incorporation as a clinical alternative to tritiated thymidine uptake measurement. *Journal*
376 *of Immunological Methods* **2014**, *415*, 71–79, doi:10.1016/j.jim.2014.10.006.
- 377 22. Focosi, D.; Spezia, P.G.; Macera, L.; Salvadori, S.; Navarro, D.; Lanza, M.; Antonelli, G.; Pistello, M.; Maggi,
378 F. Assessment of prevalence and load of torquetenovirus viraemia in a large cohort of healthy blood
379 donors. *Clinical Microbiology and Infection* **2020**, S1198743X20300367, doi:10.1016/j.cmi.2020.01.011.
- 380 23. Tyagi, A.; Pradier, A.; Baumer, O.; Uppugunduri, C.R.S.; Huezo-Diaz, P.; Posfay-Barbe, K.M.; Roosnek,
381 E.; Ansari, M. Validation of SYBR Green based quantification assay for the detection of human Torque
382 Teno virus titers from plasma. *Viol J* **2013**, *10*, 191, doi:10.1186/1743-422X-10-191.
- 383 24. Fernández-Ruiz, M. Torque Teno virus load as a surrogate marker for the net state of immunosuppression:
384 The beneficial side of the virome. *Am J Transplant* **2020**, doi:10.1111/ajt.15872.
- 385 25. Focosi, D.; Bestagno, M.; Burrone, O.; Petrini, M. CD57⁺ T lymphocytes and functional immune deficiency.
386 *Journal of Leukocyte Biology* **2010**, *87*, 107–116, doi:10.1189/jlb.0809566.
- 387 26. Albert, E.; Solano, C.; Giménez, E.; Focosi, D.; Pérez, A.; Macera, L.; Piñana, J.L.; Mateo, E.M.; Boluda,
388 J.C.H.; Maggi, F.; et al. Kinetics of Alphatorquevirus plasma DNAemia at late times after allogeneic
389 hematopoietic stem cell transplantation. *Med Microbiol Immunol* **2019**, *208*, 253–258, doi:10.1007/s00430-
390 019-00586-w.

- 391 27. Ljungman, P.; Hakki, M.; Boeckh, M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients.
392 *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **2011**, *25*, 151–169, doi:10.1016/j.hoc.2010.11.011.
- 393 28. Liu, L.; Zhang, X.; Feng, S. Epstein-Barr Virus-Related Post-Transplantation Lymphoproliferative
394 Disorders After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow*
395 *Transplantation* **2018**, *24*, 1341–1349, doi:10.1016/j.bbmt.2018.02.026.
- 396 29. Albert, E.; Solano, C.; Pascual, T.; Torres, I.; Macera, L.; Focosi, D.; Maggi, F.; Giménez, E.; Amat, P.;
397 Navarro, D. Dynamics of Torque Teno virus plasma DNAemia in allogeneic stem cell transplant
398 recipients. *J. Clin. Virol.* **2017**, *94*, 22–28, doi:10.1016/j.jcv.2017.07.001.
- 399 30. Schmitz, J.; Kobbe, G.; Kondakci, M.; Schuler, E.; Magorsch, M.; Adams, O. The Value of Torque Teno
400 Virus (TTV) as a Marker for the Degree of Immunosuppression in Adult Patients after Hematopoietic
401 Stem Cell Transplantation (HSCT). *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **2019**, S1083879119307426,
402 doi:10.1016/j.bbmt.2019.11.002.
- 403 31. Focosi, D.; Macera, L.; Boggi, U.; Nelli, L.C.; Maggi, F. Short-term kinetics of torque teno virus viraemia
404 after induction immunosuppression confirm T lymphocytes as the main replication-competent cells.
405 *Journal of General Virology* **2015**, *96*, 115–117, doi:10.1099/vir.0.070094-0.
- 406 32. Doberer, K.; Schiemann, M.; Strassl, R.; Haupenthal, F.; Dermuth, F.; Görzer, I.; Eskandary, F.; Reindl-
407 Schwaighofer, R.; Kikić, Ž.; Puchhammer-Stöckl, E.; et al. Torque teno virus for risk stratification of graft
408 rejection and infection in kidney transplant recipients – A prospective observational trial. *Am J Transplant*
409 **2020**, ajt.15810, doi:10.1111/ajt.15810.
- 410

ANNEXE 2

Publication

Early nasal type I IFN immunity against SARS-CoV-2 is compromised in patients with autoantibodies against type I IFNs

Jonathan Lopez* ; Marine Mommert* ; **William Mouton*** ; Andrés Pizzorno* ; Karen
Bregel-Pesce* ; Mehdi Mezidi ; Marine Villard ; Bruno Lina ; Jean-Christophe Richard ; Jean-
Baptiste Fassier ; Valérie Cheynet ; Blandine Padey ; Victoria Duliere ; Thomas Julien ;
Stéphane Paul ; Paul Bastard ; Alexandre Belot ; Antonin Bal ; Jean-Laurent Casanova ;
Manuel Rosa-Calatrava ; Florence Morfin ; Thierry Walzer ; Sophie Trouillet-Assant

*Equally contributed to this work

2021

Published in J Exp Med.: DOI: 10.1084/jem.20211211

ARTICLE

Early nasal type I IFN immunity against SARS-CoV-2 is compromised in patients with autoantibodies against type I IFNs

Jonathan Lopez^{1*}, Marine Mommert^{2,3*}, William Mouton^{2,4*}, Andrés Pizzorno^{4*}, Karen Brengel-Pesce^{2*}, Mehdi Mezidi⁵, Marine Villard⁴, Bruno Lina^{4,6}, Jean-Christophe Richard⁵, Jean-Baptiste Fassier^{7,8}, Valérie Cheynet², Blandine Padey^{4,9}, Victoria Duliere^{4,10}, Thomas Julien^{4,10}, Stéphane Paul⁴, Paul Bastard^{11,12,13}, Alexandre Belot^{3,4}, Antonin Bal^{5,6}, Jean-Laurent Casanova^{11,12,13,14}, Manuel Rosa-Calatrava^{4,10}, Florence Morfin^{5,6}, Thierry Walzer⁴, and Sophie Trouillet-Assant⁴

IFN-I and IFN-III immunity in the nasal mucosa is poorly characterized during SARS-CoV-2 infection. We analyze the nasal IFN-I/III signature, namely the expression of ISGF-3–dependent IFN-stimulated genes, in mildly symptomatic COVID-19 patients and show its correlation with serum IFN- α_2 levels, which peak at symptom onset and return to baseline from day 10 onward. Moreover, the nasal IFN-I/III signature correlates with the nasopharyngeal viral load and is associated with the presence of infectious viruses. By contrast, we observe low nasal IFN-I/III scores despite high nasal viral loads in a subset of critically ill COVID-19 patients, which correlates with the presence of autoantibodies (auto-Abs) against IFN-I in both blood and nasopharyngeal mucosa. In addition, functional assays in a reconstituted human airway epithelium model of SARS-CoV-2 infection confirm the role of such auto-Abs in abrogating the antiviral effects of IFN-I, but not those of IFN-III. Thus, IFN-I auto-Abs may compromise not only systemic but also local antiviral IFN-I immunity at the early stages of SARS-CoV-2 infection.

Introduction

Cell-intrinsic immunity starts with microbial detection through innate sensors. In case of infection by RNA viruses such as SARS-CoV-2, the sensing may involve cytosolic retinoic acid-inducible gene I, melanoma differentiation-associated protein 5 (Schultze and Aschenbrenner, 2021), and endosomal TLR3 (Gao et al., 2021). The activation of these receptors triggers a signaling cascade that leads to the induction of type I and III IFNs (IFN-I and IFN-III). During the early phase of this cascade, the transcription of different IFN-I and IFN-III genes and numerous IFN-stimulated genes (ISGs) is induced. Secreted IFN-I binds to IFN

receptors that signal through JAK1 and tyrosine kinase 2 and activate STAT1, STAT2, and IFN regulatory factor 9. The last three then form a complex called ISGF-3 that translocates to the nucleus and binds to IFN-stimulated response elements (ISREs), thereby inducing the expression of hundreds of ISGs, most of which have antiviral activity. Secreted IFN-III binds to another receptor complex composed of IFNLR and IL10RB and activates the same ISGF-3 complex, inducing the expression of a large number of overlapping ISGs (Lazear et al., 2019). ISGF-3 may also participate to the induction of ISGs downstream IFN-II

¹Molecular biology core facility, Civils Hospices of Lyon, Lyon Sud Hospital, Pierre-Bénite, France; ²Joint Research Unit Civils Hospices of Lyon-bioMérieux, Civils Hospices of Lyon, Lyon Sud Hospital, Pierre-Bénite, France; ³Open Innovation & Partnerships, bioMérieux S.A., Marcy l’Etoile, France; ⁴International Center of Research in Infectiology, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1111, Centre National de la Recherche Scientifique UMR5308, École normale supérieure Lyon, Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, Rhône, France; ⁵Intensive Care Medicine, Croix-Rousse hospital, Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, France; ⁶Virology laboratory, Institute of Infectious Agents, Laboratory associated with the National Reference Centre for Respiratory Viruses, Civils Hospices of Lyon, Lyon, France; ⁷Occupational Health and Medicine Department, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; ⁸Université Claude Bernard Lyon 1, Institut français des sciences et technologies des transports, de l’aménagement et des réseaux, Unité Mixte de Recherche Epidémiologique et de Surveillance Transport Travail Environnement, UMR T_9405, Lyon University, Lyon, France; ⁹Signia Therapeutics SAS, Lyon, France; ¹⁰VirNext, Faculty of Medicine RTH Laennec, Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon University, Lyon, France; ¹¹Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Necker Branch, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1163, Necker Hospital for Sick Children, Paris, France; ¹²University of Paris, Imagine Institute, Paris, France; ¹³St. Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, Rockefeller Branch, The Rockefeller University, New York, NY; ¹⁴Howard Hughes Medical Institute, New York, NY.

*J. Lopez, M. Mommert, W. Mouton, A. Pizzorno, and K. Brengel-Pesce contributed equally to this paper; Correspondence to Thierry Walzer: thierry.walzer@inserm.fr; Sophie Trouillet-Assant: sophie.assant@chu-lyon.fr

On behalf of the Lyon COVID study group (Jimmy Perrot, Isabelle Mosnier, Kahina Saker, Guy Oriol, Sylvie Pons, Alexandre Gaymard, Laurence Generenaz, Sylvie Pillet, Bruno Pozzetto, Quentin Lebon, Virginie Pitot, and Audrey Guichard).

© 2021 Lopez et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms/>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 4.0 International license, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).



(Platanitis et al., 2019) but is not essential for IFN- γ -dependent immunity (Rosain et al., 2019).

IFN-I and IFN-III participate in the first line of defense against infection, as they promote virus clearance, induce tissue repair, and stimulate the adaptive immune response. However, IFN-I activity has been reported at very low or undetectable levels in the blood (Hadjadj et al., 2020; Trouillet-Assant et al., 2020b) and the nasal epithelium (Ziegler et al., 2021) of some critically ill COVID-19 patients. This defect is explained in some patients by inborn genetic defects of IFN-I induction or amplification (Zhang et al., 2020b) and in others by the presence of neutralizing autoantibodies (auto-Abs) against type I IFNs, mainly IFN- α and/or IFN- ω and, in rare cases, IFN- β (Bastard et al., 2020). These auto-Abs underlie life-threatening pneumonia in at least 10% of intensive care unit (ICU)-admitted COVID-19 patients, as reported by multiple independent cohort studies (Zhang et al., 2020b; Bastard et al., 2020; Troya et al., 2021; Koning et al., 2021; van der Wijst et al., 2021 Preprint). While IFN-I immunity is essential for pulmonary immunity to SARS-CoV-2, the contribution of IFN-III immunity remains unknown.

The delayed production of IFN-I is thought to result in unbalanced immune responses unable to clear the virus (Channappanavar et al., 2016; Carvalho et al., 2021; Blanco-Melo et al., 2020). A two-step model of pathogenesis has proposed that insufficient IFN-I levels and hence insufficient ISGs induction during the first 10 d of infection underly viral spread, thereby accounting for the subsequent pulmonary and systemic inflammation that is characteristic of critical cases in which leukocytes attempt to resolve what IFN-I did not in the first place (Zhang et al., 2020a). However, few studies have performed longitudinal measurements of immunity during the acute phases of infection, especially in mildly symptomatic individuals, and thus the dynamics of IFN-I activity relative to virus infection and other immunological perturbations remains largely elusive. Moreover, early host-pathogen interactions occurring at the primary infection site (i.e., the nasal mucosa) are likely to influence in a major way the clinical outcome of infection (Robinot et al., 2021). While many studies have characterized the systemic immune response against SARS-CoV-2, little is known about the immune events occurring in the nasopharyngeal (NP) mucosa. Two recent RNA-sequencing studies have reported ISGs induction in the nasal mucosa of mildly symptomatic COVID-19 patients at diagnosis (Mick et al., 2020; Ng et al., 2021), but whether or how this induction correlates with viral parameters, the dynamics of the peripheral immune response, the delay after symptom onset, and the clinical outcome remains unclear. Moreover, epithelial cells specifically express the IFN- λ (IFN-III) receptor. This receptor signals through a similar JAK-STAT pathway as the IFN-I receptor complex and induces many of the same ISGs that are regulated by the binding of ISGF-3 to ISREs (Schneider et al., 2014), and both IFN-I and IFN-III can restrict SARS-CoV-2 infection of human airway epithelial cultures (Vanderheiden et al., 2020). However, the relative contributions of IFN-I and IFN-III in the defense against SARS-CoV-2 infection *in vivo* remain unknown. Here, we set out to fill these gaps in knowledge by studying in parallel mucosal and systemic immunity in COVID-19 patients using different

Table 1. Demographic and clinical characteristics of health care workers with mild COVID-19 symptoms and critically ill COVID-19 patients

	Mild COVID-19 (n = 44)	Critically ill COVID-19 (n = 26)
Demographics		
Age (yr), median [IQR]	38.0 [28.8–48.0]	56.5 [54.0–68.0]
Sex		
Male, n (%)	5 (11)	19 (73)
Female, n (%)	39 (89)	7 (27)
BMI (kg/m ²), median [IQR]	23.9 [22.4–26.3]	30.2 [27.1–34.2]
Clinical characteristics		
Delay between symptom onset and ICU admission (days), median [IQR]	N/A	8.0 [6.0–11.8]
ICU length of stay (days), median (minimum-maximum)	N/A	11.5 (3–69)
Mortality, n (%)	N/A	8 (31)

All laboratory data were recorded at recipient inclusion. BMI, body mass index; IQR, interquartile range; N/A, not applicable.

RNA-based technologies and comparing patients with and without auto-Abs neutralizing IFN-I.

Results

Blood IFN-I activity is high at diagnosis and correlates with viral load in mildly symptomatic COVID-19 patients

We aimed to study the dynamics of nasal and blood transcriptome in patients during SARS-CoV-2 infection. For this purpose, we constituted a cohort of health care workers presenting mild COVID-19 symptoms ($n = 44$ patients; Trouillet-Assant et al., 2020a) and no respiratory coinfection and for whom the delay between symptom onset and SARS-CoV-2 molecular screening was ≤ 7 d (Table 1). We collected blood samples and nasal swabs weekly for 4 wk, starting at diagnosis (four different visits [V1–V4]; see Fig. S1, which outlines the study); a group of uninfected healthy controls (HCs) was also included ($n = 5$). We first measured the transcript levels of 800 genes associated with different immune pathways in blood cells using the NanoString technology (“host response” panel). We compared changes in gene expression between mildly symptomatic patients at each time point of the study (V1–V4) and HCs in order to identify differentially expressed genes (DEGs; Table S2). Most changes in gene expression were found at V1 (i.e., at diagnosis of COVID-19; Fig. S2 A). A principal-component analysis confirmed this result and additionally showed that all patients at V3 and V4 and two thirds of patients at V2 grouped together with HCs, while one third of V2 samples clustered between V1 and the other samples (Fig. 1 A). Thus, changes in gene expression in leukocytes mainly occurred before seroconversion, which generally occurs between V1 and V2 (Fig. S2 B). The top functional pathways associated with DEG at V1 according to the nSolver NanoString analysis software were ISGs, including IFN-I- and

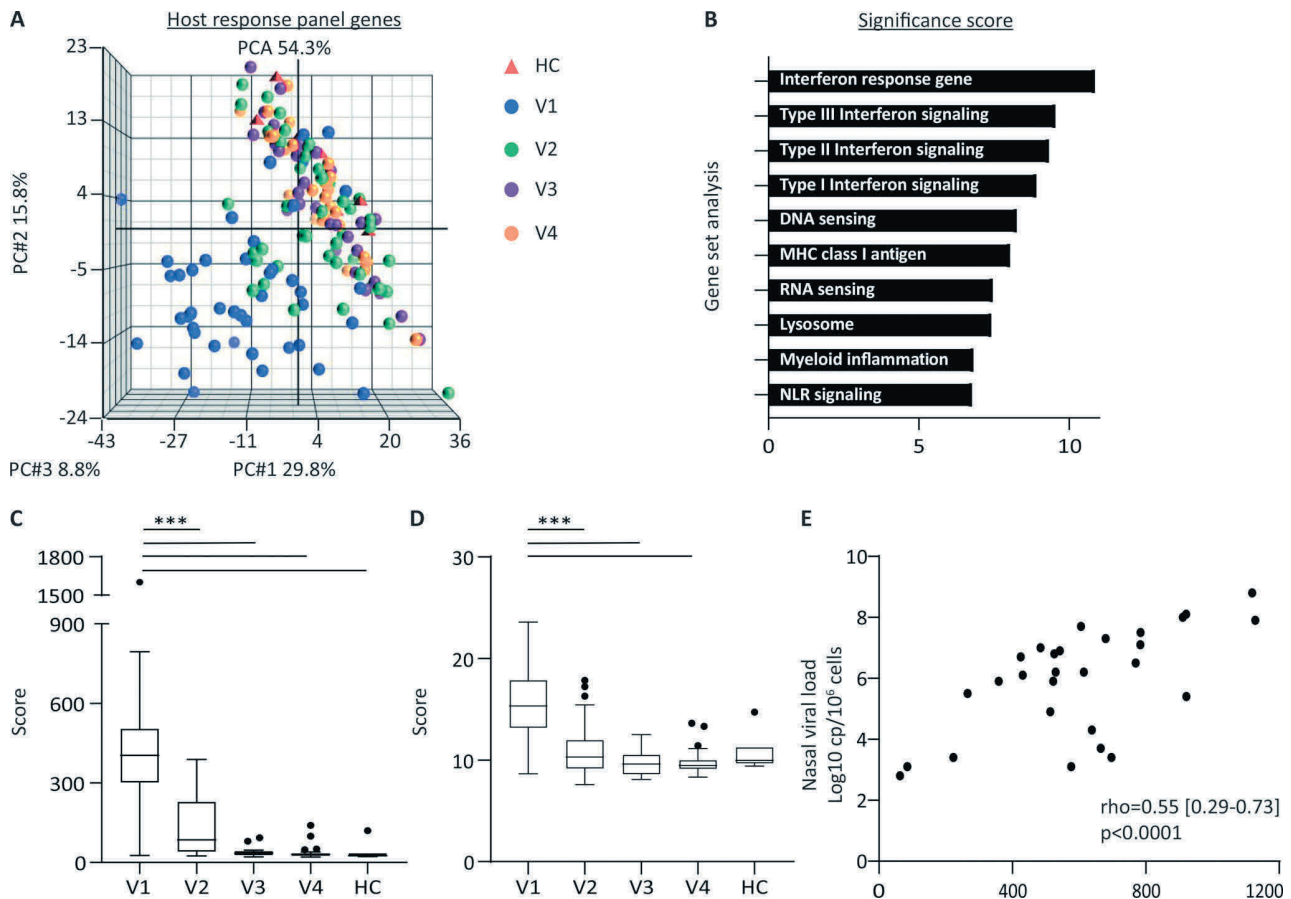


Figure 1. SARS-CoV-2 infection leads to a transient and acute type I/III IFN signature in the blood. (A) Principal-component analysis (PCA) of NanoString host response gene expression data from blood of 5 HC (red triangles) and 44 COVID-19 patients (spheres) followed longitudinally from diagnosis (V1, blue) for 4 wk (V2, green; V3, purple; and V4, orange). The percentage of variance captured by each principal-component (PC) axis is indicated, as well as the total variance. The vector position for each sample was plotted and the visualization was performed using Genomics Suite 7 (Partek). (B) Pathway analysis for the 123 DEGs between V1 and V2/V3/V4 determined using nSolver NanoString analysis software. The significance scores for the top 10 pathways are indicated. NLR, nucleotide oligomerization domain–like receptor. (C and D) Box and whisker plots (using the Tukey method) showing the expression score of the indicated pathways from V1 to V4 for patients and for HCs. A Kruskal–Wallis with uncorrected Dunn’s test was used for statistical analysis of data presented in this figure (multiple comparisons; ***, $P < 0.001$). (E) Correlation between the nasal SARS-CoV-2 normalized viral load and the NanoString IFN score (49 genes differentially expressed between V1 and V2/V3/V4). The Spearman’s correlation coefficient is shown.

IFN-III-dependent ISGs (i.e., ISGs driven by ISGF-3 binding to ISRE) and IFN-II-dependent ISGs (i.e., ISGs mainly driven by γ -activated factor binding to gamma IFN activation sites; Fig. 1 B). To monitor the representation of these pathways in a longitudinal manner, we computed an expression score based on the combined expression of different ISGs (see Materials and methods). As shown in Fig. 1, C and D, the type I/III ISGs (ISG-I/III) and ISG-II scores were maximal at V1 and lower for other time points, even though they were still significantly higher at V2 compared with HC samples. Moreover, other pathways were significantly enriched at V1, including DNA/RNA sensing, MHC-I antigen presentation, lysosome, myeloid inflammation, and nucleotide oligomerization domain–like receptor signaling; for all these pathways, the scores were significantly higher at V1 compared with HCs and similar between other time points and HCs (Fig. S3). The ISG-I/III score at V1 was associated with the normalized viral load determined at diagnosis (Fig. 1 E; Spearman $\rho = 0.55$, $P < 0.0001$), but not with age, body mass index, or delay

after symptoms (Fig. S2 C). Altogether, these data highlight the predominance of ISGs among the genes induced in blood cells in response to SARS-CoV-2 infection, the transient nature of this induction, and its association with viral load.

Coordinated regulation of nasal and blood ISGs in response to IFN-I during infection

Next, we aimed to study the regulation and the role of IFN-I/III signaling in the nasal mucosa in response to SARS-CoV-2 infection. For this, we took advantage of the nasal swabs used for standard molecular SARS-CoV-2 screening. However, measuring the host response in such samples is technically challenging, as the amount of cellular material is extremely limited. To overcome this problem, we used the FilmArray technology, a nested PCR-based technique allowing rapid and sensitive measurement of ISGs transcripts that has been recently described (Mommert et al., 2021) and that we adapted for nasal swabs. This technique is advantageous, as it is semiautomated and also

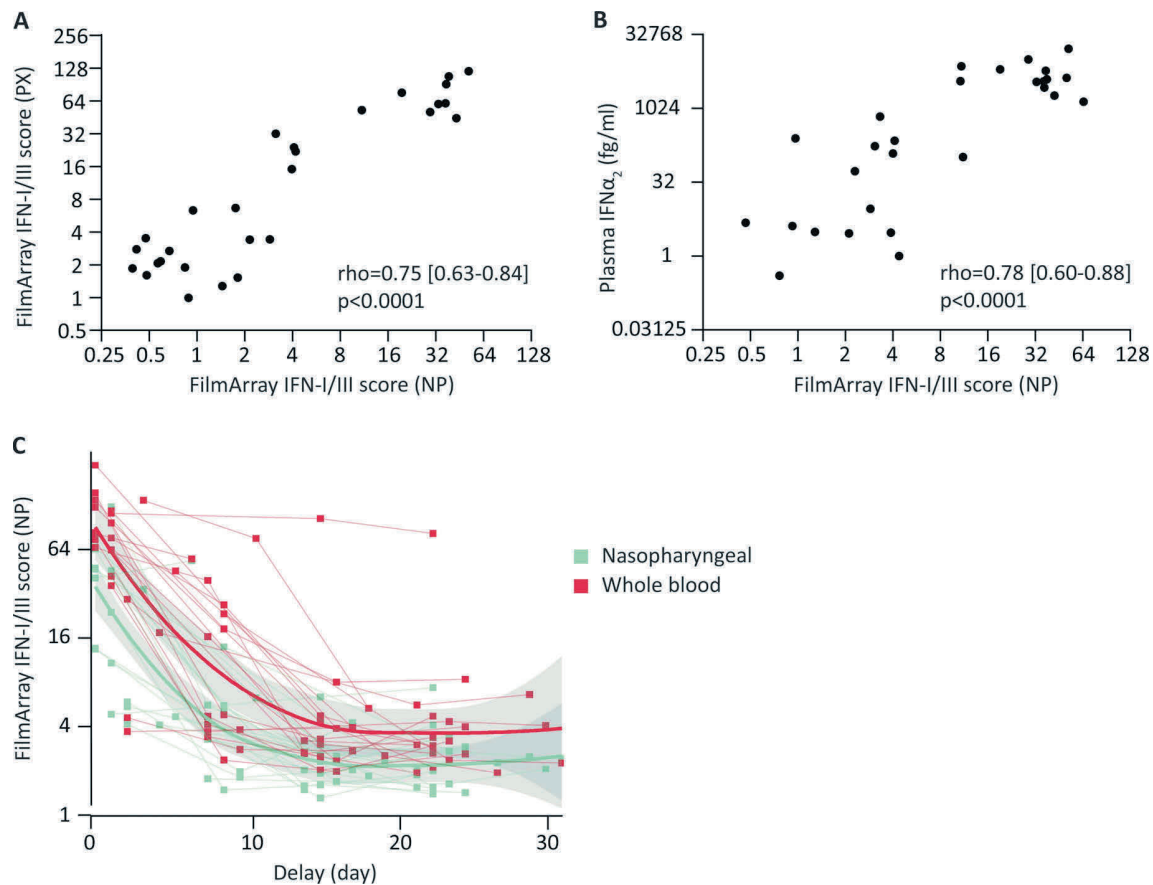


Figure 2. Nasal and blood IFN-I/III scores are correlated during SARS-CoV-2 infection. The NP IFN-I/III (IFN) score, defined by a four-ISGs transcriptional signature measured using FilmArray technology, was evaluated. **(A)** Correlation between the NP IFN-I/III score and the blood IFN-I/III score obtained from the PAXgene whole-blood sample (PX, $n = 75$ longitudinal samples from 23 patients). The Spearman's correlation coefficient is shown. **(B)** Correlation between the IFN-I/III score and IFN- α_2 levels (fg/ml) in plasma ($n = 39$ samples with a detectable value from 23 patients), measured by single-molecule array using a commercial kit. The Spearman's correlation coefficient is shown. **(C)** Kinetic measurements of the NP (green) and blood IFN-I/III scores (red) post COVID-19 diagnosis. $n = 75$ longitudinal samples from 23 patients. Fit Loess curves represent local polynomial regressions as determined by the Loess method. Confidence interval at 95% is indicated (gray area).

designed for clinical routine, providing an IFN-I/III score based on the quantification of four ISGs regulated through ISGF3-dependent ISREs (i.e., *IFI27*, *IFI44L*, *RSAD2*, and *IFIT1*; Hernandez et al., 2018). We monitored the nasal IFN-I/III score at diagnosis in 23 SARS-CoV-2-infected health care workers and compared this score with the blood IFN-I/III score and the serum level of IFN- α_2 from the same patients. There was a strong correlation between nasal and blood IFN-I/III scores (Fig. 2 A) and between the nasal IFN-I/III score and serum IFN- α_2 levels (Fig. 2 B; Spearman $\rho > 0.75$ for both comparisons). We also measured the serum level of IFN- λ_1 , even though this cytokine is believed to act in a local manner (Park and Iwasaki, 2020). IFN- λ_1 was detectable in the serum of many patients, and its levels were also correlated with the nasal and blood IFN-I/III scores, but the correlation coefficient for these relations was lower than those of IFN- α_2 and IFN-I/III scores (Fig. S4). We then compared the dynamics of the IFN-I/III score in the blood versus nasal mucosa, taking advantage of the availability of serial and paired blood samples and nasal swabs. Both parameters followed very similar kinetics, peaking at the earliest time points after symptom onset and rapidly decreasing thereafter, becoming

virtually negative 14 d after symptom onset (Fig. 2 C). This overlap confirms the coordination of nasal and systemic IFN-I/III antiviral defenses and shows that the nasal IFN-I/III score measured using FilmArray directly from swab samples is a faithful proxy of the blood IFN-I/III score in patients.

The nasal IFN-I/III score is correlated with the nasal SARS-CoV-2 load and virus infectivity

Next, we examined the possibility of using the nasal IFN-I/III score as a biomarker of SARS-CoV-2 infection when combined with SARS-CoV-2 RT-PCR. To this aim, we first tested the association between the nasal SARS-CoV-2 viral load and the nasal ISG-I/III score, both determined longitudinally and paired for each time point. There was a significant correlation between both parameters (Spearman $\rho = 0.59$ [0.42; 0.73], $P < 0.0001$; Fig. 3 A). Additionally, based on iterative comparisons, we found that a nasal viral load of 4.40 \log_{10} copies [cp]/ 10^6 cells discriminated best between patients with high and low IFN-I/III scores; accordingly, most patients with viral loads above 4.40 \log_{10} cp/ 10^6 cells had high nasal (Fig. 3 B) and blood (Fig. 3 C)

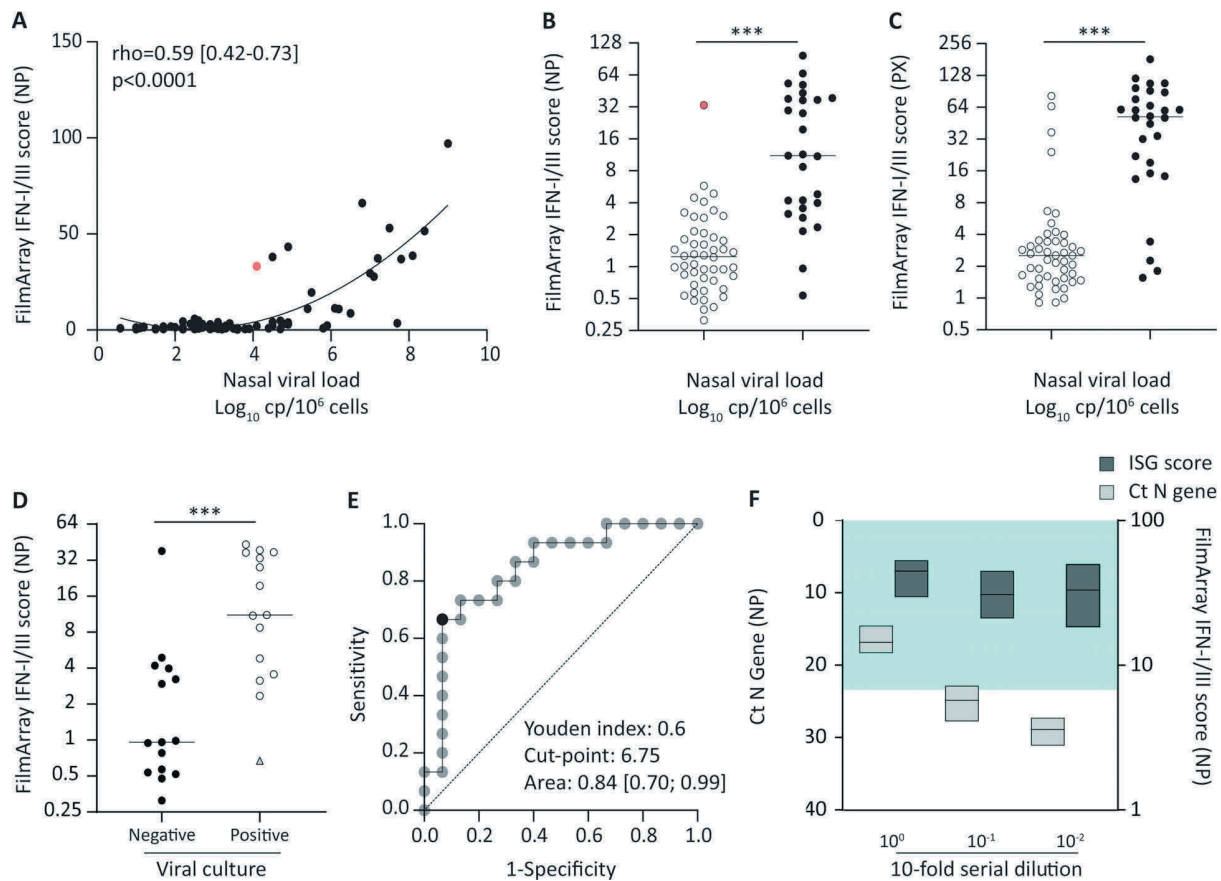


Figure 3. The nasal IFN-I/III score is a surrogate marker of SARS-CoV-2 infectivity. (A) Correlation between the NP IFN-I/III (IFN) score and the nasal SARS-CoV-2 normalized viral load ($n = 75$ longitudinal samples from 23 patients) measured using the SARS-CoV-2 R-gene kit. The Spearman's correlation coefficient is shown. Red dot corresponds to a patient with a strong nasal IFN-I/III score at V1 despite a low viral load $<4.4 \log_{10} \text{ cp}/10^6$ cells. (B and C) Scatterplots showing nasal (B) and blood (PX, PAXgene; C) IFN-I/III scores in patients with normalized viral load superior or inferior to $4.40 \log_{10} \text{ cp}/10^6$ cells ($n = 75$ longitudinal samples from 23 patients). Red dot corresponds to a patient with a strong nasal IFN-I/III score at V1 despite a low viral load $<4.4 \log_{10} \text{ cp}/10^6$ cells. Statistical comparison was performed using a nonparametric Mann-Whitney test (***, $P < 0.001$). (D) Scatterplot of the NP IFN-I/III score in patients with positive or negative nasal SARS-CoV-2 viral culture ($n = 30$ longitudinal samples from 12 patients). Filled circles represent negative virus culture samples, empty circles represent positive virus culture sample, and triangle corresponds to a sample positive on cell culture without cytopathic effect. Statistical comparison was performed using a nonparametric Mann-Whitney test (***, $P < 0.001$). (E) Receiver-operating characteristic curve discriminating between positive and negative SARS-CoV-2 viral culture result. Area under the curve and Youden index are calculated and represent the ability of the NP IFN-I/III score to separate positive and negative viral cultures. (F) 10-fold serial dilutions (10^0 to 10^{-2}) of NP swab samples were performed and followed by measurements of IFN-I/III scores (dark gray, FilmArray) and SARS-CoV-2 load (Ct detection, light gray, SARS-CoV-2 R-gene kit). Data are expressed as floating bars ($n = 3$; mean [min-max]). The green area depicts the cutoff point IFN-I/III score associated with positive viral culture (6.75).

IFN-I/III scores. A few patients had high ISGs scores despite low virus dose and vice versa, which suggests that other parameters than the virus dose, such as genetic variation, could influence ISGs induction upon infection. We then performed virus culture assays directly from nasal swabs in Vero cells as previously described (Bal et al., 2021) in order to evaluate the putative association between the nasal IFN-I/III score and the isolation of infectious virus from the swab. We found that positive virus cultures were usually associated with high median nasal IFN-I/III scores and, reciprocally, that negative cultures were almost always associated with low median IFN-I/III scores (Fig. 3 D). We then evaluated the interest of using the IFN-I/III score as a surrogate biomarker of replicative SARS-CoV-2 infection through a receiver-operating characteristic curve. The area (95% confidence interval) under the receiver-operating characteristic

curve was 0.84 (0.7; 0.99), revealing a good performance of the IFN-I/III score to predict the virus replication capacity with a cut-point score at 6.75 (Fig. 3 E). Of note, one patient had a strong nasal IFN-I/III score at V1 (33.2) despite a low viral load $<4.4 \log_{10} \text{ cp}/10^6$ cells (in red in Fig. 3, A and B). For this patient, V1 occurred only 1 d after symptom onset (unlike most of the other patients from the cohort), which suggests that the patient was probably in the ascending phase of viral replication at V1. Accordingly, for this patient, the IFN-I/III score remained high at V2 (43.2) and was associated with a high viral load ($>4.4 \log_{10} \text{ cp}/10^6$ cells); of note, the viral culture was positive for both V1 and V2 time points. Lastly, to further evaluate the relevance of using the IFN-I/III score as a marker of replicative infection, we performed comparative measurements of the IFN-I/III score and of the viral RNA in conditions of limiting material mimicked by

10-fold serial dilutions of positive swabs. The Ct (cycle threshold) values of the viral PCR rapidly increased upon swab dilutions, while the IFN-I/III scores remained relatively stable and consistently higher than the 6.75 value previously shown to discriminate between swabs containing or not replicative virus (Fig. 3 F). Altogether, our data highlight the relevance of using the nasal IFN-I/III score as a biomarker of active SARS-CoV-2 infection in combination with SARS-CoV-2 RT-PCR and as a tool to probe the mucosal pathogenesis of COVID-19 at the molecular and cellular levels.

The nasal IFN-I/III score is low in patients with neutralizing anti-type I IFN auto-Abs

A fraction of critically ill COVID-19 patients have low or undetectable blood IFN-I levels (Hadjadj et al., 2020; Trouillet-Assant et al., 2020b), which can be due to either inborn errors of IFN-I immunity (Zhang et al., 2020b), the presence of circulating auto-Abs that neutralize IFN- α and IFN- ω , or both (Bastard et al., 2020). These auto-Abs could also theoretically block mucosal IFN-I, but antibodies do not diffuse as well in tissues as they do in the blood (Iwasaki, 2017), and in some situations, they can be sequestered within the vascular compartment (Chen et al., 2018). We thus tested the relationships among disease severity, the presence of IFN-I auto-Abs, viral load, and nasal IFN-I/III score. We obtained blood and nasal swabs at ICU admission from 26 critically ill patients (Table 1). The presence of neutralizing auto-Abs against IFN- α and IFN- ω in serum was tested using a novel highly sensitive ELISA (Goncalves et al., 2021). We detected IFN- α and/or IFN- ω auto-Abs in the sera of 8 out of 26 critically ill patients and none of the mildly symptomatic patients (Fig. 4). While most patients without IFN-I auto-Abs and a viral load $>4.4 \log_{10} \text{ cp}/10^6 \text{ cells}$ had a very high ISGs score (Fig. 4 A), patients with IFN-I auto-Abs had very low nasal IFN-I/III scores, irrespective of viral load, except for three patients who displayed auto-Abs against IFN- α_2 only and for whom we assumed that IFN- ω could compensate the blockade of IFN- α_2 . The other five patients had auto-Abs against both IFN- α and IFN- ω (Fig. 4 B). These data suggest that IFN-I auto-Abs could block IFN-I in the nasal mucosa as well, which was tested by assessing the presence of neutralizing IFN-I auto-Abs in nasal swabs in patients for whom serum auto-Abs levels were also determined. Interestingly, nasal IFN-I auto-Abs were detected in half of the patients who had serum auto-Abs (Table S3). This is consistent with their previous detection in a bronchoalveolar lavage (de Prost et al., 2021). The serum level of IFN-I auto-Abs was not correlated to that of the swab, but differences in the quality of the swab may explain this discrepancy.

Thus, our data suggest that (1) IFN-I is the main inducer of strong ISGs responses in the nasal mucosa, while IFN-III seems insufficient; (2) IFN-I auto-Abs compromise early antiviral defenses in the nasal mucosa of critically ill patients, especially when auto-Abs against both IFN- α_2 and IFN- ω are present; and (3) IFN- ω is involved in nasal IFN-I immunity.

IFN-I auto-Abs block the antiviral effects of IFN-I in a human airway epithelium (HAE) model of SARS-CoV-2 infection

To assess the impact of IFN-I auto-Abs in the early defense against SARS-CoV-2 infection in a more direct manner, we used

a previously validated (Pizzorno et al., 2020) and predictive reconstituted HAE model of SARS-CoV-2 infection. In this model, HAEs were treated (24 h before and 1 h after infection) with recombinant IFN- α_2 in the presence or absence of pre-pandemic serum from HCs or patients with biallelic loss-of-function variants of AIRE (autoimmune regulator locus). The latter suffer from autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS-1) and produce a broad range of auto-Abs, including neutralizing IFN-I auto-Abs (Bruserud et al., 2016; Levin, 2006; Meager et al., 2006). This range is very similar to what is found in a subset of patients with life-threatening COVID-19 (Bastard et al., 2020), which allows testing the impact of IFN-I auto-Abs without the confounding effects of anti-SARS-CoV-2 neutralizing Abs. While recombinant IFN- α_2 significantly inhibited viral replication in the presence of serum from individuals without auto-Abs, this antiviral effect was completely abrogated in the presence of neutralizing auto-Abs from APS-1 individuals, as the viral titers were comparable to those of the untreated control (Fig. 5, A and B). These results were further confirmed by the reduced transepithelial electric resistance values (Fig. 5 C), which are used as reliable surrogate of epithelium integrity (Pizzorno et al., 2020). By contrast, the APS-1 serum had no effect on viral replication when applied in the absence of IFN-I. The presence of APS-1 serum was also associated with lower IFN- α_2 -induced IFN-induced protein 44-like (IFI44L) expression (Fig. 5 D). Moreover, the use of a serum from a non-APS-1 individual with IFN-I auto-Abs not previously infected by SARS-CoV-2 showed the same results as those obtained with the APS-1 serum (Fig. S5), excluding the possibility that other auto-Abs not directed against IFN-I in the APS-1 serum may also influence results in the HAE model.

We then directly compared the antiviral effects and ISGs induction capacity of exogenous IFN- α_2 , IFN- β_1 , IFN- λ_1 , IFN- λ_2 , IFN- λ_3 , and IFN- ω and the impact of IFN-I auto-Abs on these effects in the HAE model. A high concentration of all recombinant IFNs inhibited viral replication (Fig. 6, A-C) and induced IFI44L expression (Fig. 6 D); however, neutralizing auto-Abs abrogated only the effect of IFN- α_2 and IFN- ω and not that of IFN- β_1 , IFN- λ_1 , IFN- λ_2 , or IFN- λ_3 (Fig. 6, A-D). Altogether, these results suggest that in the nasal mucosa of infected patients, IFN- α_2 and IFN- ω have a prominent role in the antiviral response that cannot be compensated by other IFNs, probably not expressed at sufficient levels. Moreover, our results functionally validate the neutralizing activity of IFN-I auto-Abs, which further suggests that those Abs could compromise the nasal IFN-I response in a subset of critically ill patients.

Discussion

We investigated herein anti-SARS-CoV-2 IFN-I immunity in a longitudinal way in patients with mild COVID-19 manifestations. This immunity is not well characterized, as most longitudinal studies have focused on hospitalized patients (Lucas et al., 2020; Liu et al., 2021; Szabo et al., 2021; Bernardes et al., 2020). IFN-I/III ISGs and IFN-II ISGs were the main groups of genes up-regulated in the blood during infection. This finding confirms the impact of IFNs in the antiviral immune response, which is

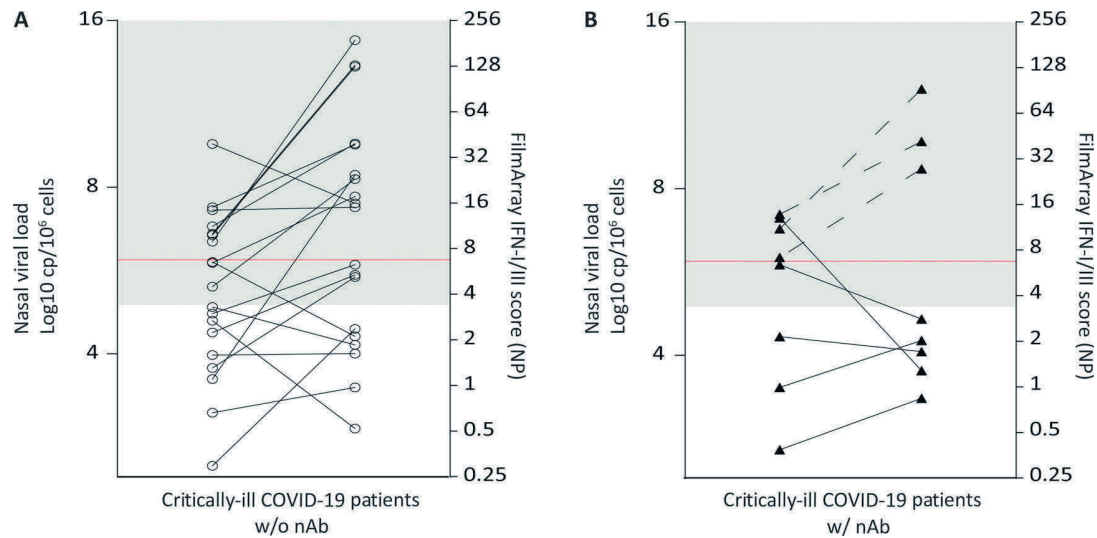


Figure 4. Critically ill COVID-19 patients with auto-Abs have a weak nasal IFN-I/III score despite high virus load. (A and B) Comparison of normalized nasal viral load and NP IFN-I/III (IFN) scores in critically ill COVID-19 patients without anti-IFN auto-Abs (A; empty spheres) or with neutralizing auto-Abs (nAb) against IFN- α (B; black triangles). The gray area represents the viral load obtained for 15 out of 17 mildly symptomatic COVID-19 patients (88%) with an IFN-I/III score >6.75 (cutoff value associated with positive viral culture, in red). Dashed lines represent patient with auto-Abs against IFN- α_2 only.

also supported by previous observations according to which severe COVID-19 patients develop auto-Abs against IFN-I or have inborn defects of IFN-I induction, amplification, or response (Bastard et al., 2020). Interestingly, other patients with these inborn defects in IFN-I induction or with auto-Abs against IFN-I are prone to other viral infections, for which there is incomplete penetrance (Bastard et al., 2021b; 2021c; Duncan et al., 2015; Gothe et al., 2020; Hernandez et al., 2019), while the penetrance of COVID-19 critical forms is probably very high. Our data show that in most patients with mild COVID-19, the up-regulation of ISGs was transient, maximal at diagnosis, and coordinated with antigen presentation, which presumably helps initiating the ensuing adaptive immune response. The ISGs wave indeed preceded seroconversion, which occurred on average 14 d after symptom onset, consistent with previous studies (Premkumar et al., 2020; Rydzynski Moderbacher et al., 2020).

We showed that the mucosal IFN-I/III signature was correlated with the blood IFN-I signature. Two recent studies have also reported a strong induction of ISGs in the nasal mucosa of SARS-CoV-2-infected patients, which was even higher compared with patients infected with other viruses, such as influenza or seasonal coronaviruses (Mick et al., 2020; Ng et al., 2021), confirming that a high ISGs expression is a hallmark of anti-SARS-CoV-2 mucosal immunity (Pizzorno et al., 2020). Interestingly, another study has also reported that the nasal ISGs expression was higher in pediatric than in adult patients infected with SARS-CoV-2 (Pierce et al., 2021), which could explain the differences in disease severity observed between these two populations. However, the pediatric patients included in the latter study were in fact symptomatic and presenting to the emergency department (Pierce et al., 2021), suggesting that their immune response was not comparable to typically asymptotically infected children.

Using FilmArray technology, we found that the nasal IFN-I/III score was commensurate to the viral load and to virus infectivity,

which is interesting, since SARS-CoV-2 RT-PCR results are often difficult to interpret in clinical routine when Ct values are high and in the absence of clinical manifestation (Han et al., 2021). The nasal ISG-I/III score could therefore be used as a biomarker of active SARS-CoV-2 infection in combination with SARS-CoV-2 RT-PCR to rapidly help in the identification of patients at risk of virus transmission and reciprocally help to avoid quarantine measures in patients who do not or no longer represent a possible source of contamination.

We also found that a sizeable fraction of critically ill patients had a low nasal IFN-I/III score despite a high viral load. These data extend previous findings that the blood IFN-I signature or the serum IFN-I concentration was very low in a subset of critically ill patients (Trouillet-Assant et al., 2020b; Bastard et al., 2020). Thus, the measurement of the nasal IFN-I/III score could be used to help stratify patients and identify patients at risk of developing severe symptoms at early stages of infection. Many COVID-19 therapeutic treatments are currently being tested (for a review, see Canedo-Marroquín et al., 2020), and it is likely that their efficacy will depend on their timely administration during the infection (Park and Iwasaki, 2020), which prompts the identification of early markers of disease severity. We also detected IFN-I auto-Abs in both serum and nasal swabs in a fraction of critically ill patients, in particular in patients with a low nasal IFN-I/III score despite a high viral load. These data suggest that IFN-I auto-Abs could explain the low nasal IFN score in a subset of patients and thus that IFNs-I are the main drivers responsible for inducing protective ISGs signatures in the nasal epithelium compared with IFNs-III. The observation that a few patients with IFN- α_2 auto-Abs without IFN- ω auto-Abs had a high nasal IFN-I/III score suggests a redundancy between IFN- α and IFN- ω in this process. The blockade of IFN-I signaling at the site of virus infection could help virus dissemination by preventing the IFN-I system to render epithelial and

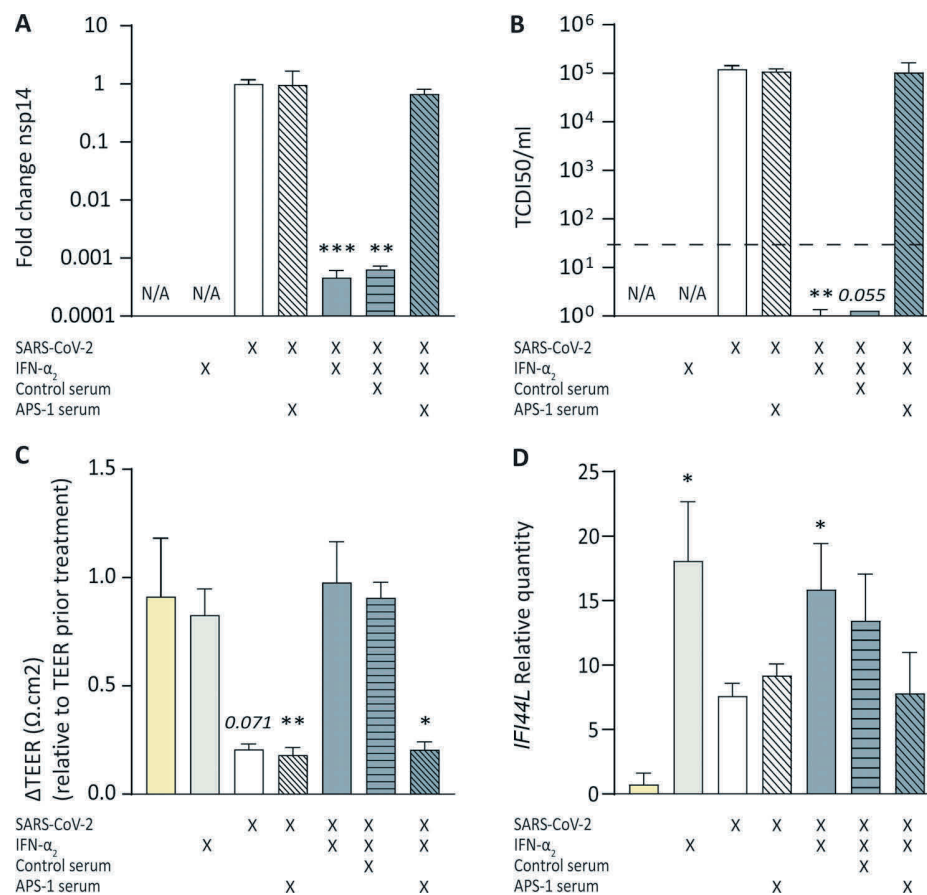


Figure 5. **Sera containing anti-IFN-I antibodies neutralize IFN- α_2 antiviral activity in a reconstituted HAE model of SARS-CoV-2 infection.** The effect of APS-1 serum was evaluated in an HAE model of SARS-CoV-2 infection. (A) Nasal HAEs were treated (24 h before and 1 h after SARS-CoV-2 infection) with recombinant IFN- α_2 in the presence or absence of APS-1 patient or control serum, as indicated. Apical washes were performed 54 hpi, and viral titers were determined by RT-PCR. Results are representative of three biological replicates and expressed as relative to the mock-treated control. (B) Apical infectious viral titers 54 hpi determined by TCID50 (median tissue culture infectious dose). The dotted line depicts the limit of detection. (C) Relative TEER (Δ TEER) between t = 0 and t = 54 hpi. (D) Relative expression of *IFI44L* assessed using FilmArray technology from total cellular RNA extracted after infection. In the figure, bars and error bars represent mean and SD, respectively. A Kruskal–Wallis with uncorrected Dunn’s test was used for statistical analysis of data presented in this figure (multiple comparisons; *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001). In A, B, and D, the reference condition was SARS-CoV-2 alone (white bars), and in C, the reference was the mock condition (beige bars).

other ACE2-expressing cells refractory to infection. We demonstrated this experimentally using a reconstructed epithelium that we infected with SARS-CoV-2 and in which we showed that serum auto-Abs could block the effects of both IFN- α and IFN- ω . A recent study has reported the presence of IFN-I auto-Abs in tracheal aspirates as well (de Prost et al., 2021), suggesting that auto-Abs could block IFN-I signaling at multiple sites. We observed that some critically ill patients had a fairly low viral load despite the presence of anti-IFN-I auto-Abs. This could be explained by later sampling for these patients, associated with a spread of the infection to the lower lungs (Wang et al., 2020).

As recently discussed (Stertz and Hale, 2021), many questions remain, such as how auto-Abs that are produced at modest titers in the serum (Goncalves et al., 2021) block IFN-I at mucosal sites where their diffusion is likely rather limited, even though we detected them in the present study. Moreover, auto-Abs are difficult to manage in clinical practice (de Prost et al., 2021; Bastard et al., 2021a), and it is unclear which therapies should be

administered to COVID-19 patients upon detection of IFN-I auto-Abs. Our findings suggest that early therapy with IFN- β , which is apparently not neutralized in most patients with auto-Abs against IFN-I and the response to which is not affected in most patients with inborn defects of IFN-I, may prevent the development of critical disease. An alternative is IFN-III, which displayed antiviral activity in our in vitro system regardless of the presence of IFN-I auto-Abs. Other studies have shown its efficacy in animal models (Park and Iwasaki, 2020). Many clinical trials on the prophylactic and therapeutic use of IFNs for COVID-19 care are ongoing (Sallard et al., 2020) and might bring answers to these questions.

Material and methods

Participants and ethics statement

HC participants

HCs were recruited among donors to the Lyon blood transfusion center (Etablissement Français du Sang) and were considered as

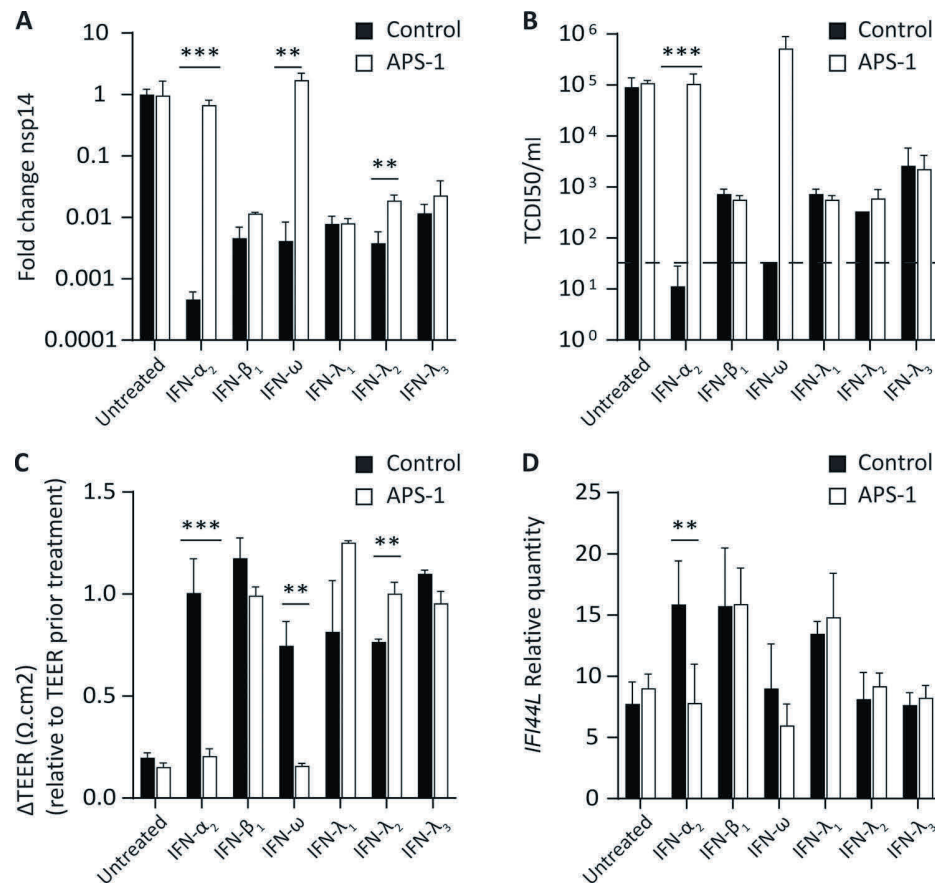


Figure 6. Sera from APS-1 patients do not influence IFN- β_1 , IFN- λ_1 , IFN- λ_2 , and IFN- λ_3 antiviral activity but block IFN- α and IFN- ω antiviral activity. The effect of APS-1 serum (white bars) was evaluated in a reconstituted HAE model of SARS-CoV-2 infection in comparison with a control condition (black bars). **(A)** Nasal HAEs were treated (24 h before and 1 h after SARS-CoV-2 infection) with recombinant IFN- α_2 , IFN- β_1 , IFN- λ_1 , IFN- λ_2 , IFN- λ_3 , or IFN- ω in the presence or absence of APS-1 serum. Apical washes were performed at 54 hpi, and viral titers were determined by RT-PCR. Results are representative of three biological replicates and expressed as relative to the mock-treated control. **(B)** Apical infectious viral titers at 54 hpi determined by TCID50. The dotted line depicts the limit of detection. **(C)** Δ TEER between $t = 0$ and $t = 54$ hpi. **(D)** Relative expression of *IFI44L* assessed using FilmArray technology from total cellular RNA extracted after infection. In the figure, bars and error bars represent mean and SD, respectively. Multiple t tests with Bonferroni–Dunn method were used for the statistical analysis of data presented in this figure (comparison between control and APS-1 serum conditions in each readout; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

a control group. According to French procedures, a written nonopposition to the use of donated blood for research purposes was obtained from HCs. The donors' personal data were anonymized before transfer to our research laboratory. We obtained approval from the local ethical committee and the French ministry of research (DC-2008-64) for handling and conservation of these samples.

Mildly symptomatic COVID-19 participants

A prospective longitudinal cohort study was conducted at the Hospices Civils de Lyon (university hospital of Lyon, France) including health care workers aged >18 yr, having given their written consent, accepting a 6-wk follow-up, and displaying at least one of the following symptoms suggestive of a SARS-CoV-2 infection: fever, respiratory symptoms, headache, anosmia, and ageusia (Trouillet-Assant et al., 2020a). Exclusion criteria were being pregnant or lactating. The COVID-19 diagnosis was confirmed by quantitative RT-PCR (Cobas SARS-CoV-2 Test; Roche

Diagnostics). The NP swab used were either in Copan Universal Transport Medium or in Cobas PCR medium tube. Clinical and microbiological data were collected for all included health care workers. Patients with a positive RT-PCR result at inclusion (V1) came back weekly (V2, V3, and V4) for blood and NP sampling until negativation (assessed by RT-PCR). Ethics approval was obtained from the national review board for biomedical research in April 2020 (Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée I, Marseille, France; ID RCB 2020-A00932-37), and the clinical study was registered at www.clinicaltrials.gov (NCT04341142, v3).

Critically ill COVID-19 patients

All critically ill patients, admitted to the ICU, were included in the MIR-COVID study. This study was registered to the Commission nationale de l'informatique et des libertés (French national data protection commission) under the number 20-097 and was approved by an ethical committee for biomedical research

(Comité de Protection des Personnes HCL) under the number 20-41. In agreement with the General Data Protection Regulation (Regulation [EU] 2016/679 and Directive 95/46/EC) and the French data protection law (law 78-17 on 06/01/1978 and Décret 2019-536 on 29/05/2019), we obtained consent from each patient or his/her next of kin. During the ICU stay, blood collected on EDTA tubes were used for anti-IFN antibody investigation as previously described. For this study, nasal swabs used for molecular SARS-CoV-2 screening at hospital admission were collected for additional experiments.

Whole-blood transcriptomic assessment

Total RNA was extracted from PAXgene tubes using the Maxwell 16 LEV simplyRNA Blood kit (Promega), following the manufacturer's guidelines. RNA quantity was determined using a Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). 200 ng total RNA was hybridized with the nCounter Host Response panel (#LBL-10805-01; NanoString) and counted on an nCounter FLEX platform according to the manufacturer's guidelines. Table S1 provides more information on the panel and the genes measured. Raw counts were normalized using internal positive standards and 12 housekeeping genes. Using ROSALIND NanoString Gene Expression packages (<https://rosalind.onramp.bio/>), we performed differential expression analysis and gene set analysis with a cutoff at ± 1.5 -fold change and an adjusted P value < 0.05. Gene expression signatures were generated by summing for each of the 60 signatures encompassed in the panel (LBL-10805-01_nCounter_Host_Reposne_Gene_List annotation file) the normalized counts of each gene divided by the median of expression in the control group. Statistical analysis and graphics were performed using Prism 9 software (<https://www.graphpad.com>).

FilmArray IFN panel

The first prototype of the IFN pouch encompasses four ISGs (IFN α inducible protein 27, *IFI44L*, IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, radical S-adenosyl methionine domain containing 2) and three housekeeping genes (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, peptidylprolyl isomerase B, and 2,4-dienoyl-CoA reductase 1) for signal normalization. 100 μ l PAXgene blood or nasal pharyngeal swab samples was tested using the IFN prototype (Tawfik et al., 2020) according to the manufacturer's instructions. In brief, the pouches were hydrated with the hydration solution supplied with the kit. The PAXgene blood or nasal pharyngeal swab samples were mixed with 800 μ l of the sample buffer provided with the kit and directly injected into the pouch and ran on FilmArray 2.0 and FilmArray Torch instruments (BioFire Diagnostics). Results were delivered in <1 h. Using a research version of the instrument, real-time quantification cycle values and post-amplification melt peaks were determined for each assay. The normalized expression values of each assay were then computed using the internal reference genes. The nasal pharyngeal ISGs score was calculated using the same method applied for PAXgene sample as previously described (Pescarmona et al., 2019).

IFN- α and IFN- ω concentration determination

Serum IFN- α_2 concentrations (fg/ml) from plasma were measured by single-molecule array using a commercial kit for

IFN- α_2 quantification (Quanterix). The assay was based on a three-step protocol using an HD-1 Analyzer (Quanterix) and required 3 h of processing time from sample to result acquisition (Wilson et al., 2016). Plasma IFN-1 concentrations were determined using Meso Scale Discovery U-PLEX platform.

Viral load measurement

The SARS-CoV-2 load was determined from the nasal pharyngeal swabs using SARS-CoV-2 R-gene kit (bioMérieux). Briefly, nucleic acid extraction was performed from 0.2 ml nasal pharyngeal swabs on NUCLISENS easyMAG, and amplification was performed using Bio-Rad CFX96. The viral load was quantified using four internally developed quantification standards (QS1-QS4 at 2.5×10^6 , 2.5×10^5 , 2.5×10^4 , and 2.5×10^3 cp/ml, respectively, of SARS-CoV-2 N gene DNA). These quantification standards were quality checked and quantified using the Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) and Applied Biosystems QuantStudio 3D Digital PCR. In parallel, nasal pharyngeal swabs were tested using the CELL Control R-GENE kit (amplification of the *HPRT1* housekeeping gene) that contains two quantification standards (QS1 at 10^4 cp/ μ l DNA standard that is 50,000 cells/PCR [i.e., 1.25×10^6 cells/ml in our conditions] and QS2 at 10^3 cp/ μ l DNA standard that is 5,000 cells/PCR [i.e., 1.25×10^5 cells/ml in our conditions]) to normalize the viral load according to the sampling quality (\log_{10} [(number of SARS-CoV-2 copies per milliliter/number of cells per milliliter) $\times 10^6$ cells per milliliter]).

Viral culture

Viral culture was performed following interim biosafety guidelines established by the World Health Organization [WHO/WPE/GIH/2020.3] from nasal pharyngeal swabs in Universal Transport Medium. RT-PCR-positive nasal pharyngeal swabs were inoculated on confluent Vero cells (ATCC CCL-81) in Eagle's minimum essential media supplemented with 2% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine, and 2% inactivated fetal bovine serum. Plates were incubated at 33°C (which was determined to be the optimal temperature for virus cultures) and 5% CO₂ for 96 h. Cytopathic effects were monitored daily; samples were harvested when positive, while negative samples at 96 h underwent subculture on new plates. Culture supernatants were sampled at 2 h after inoculation, at 96 h, and after an additional 96 h on subculture. RNA from supernatants were extracted by the automated MGISP-960 workstation using MGI Easy Magnetic Beads Virus DNA/RNA Extraction Kit (MGI Tech), and SARS-CoV-2 detection was performed using TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR kit on a QuantStudio 5 System (Applied Biosystems and Thermo Fisher Scientific).

Serological investigation

The presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies was evaluated using the Wantai Ab assay detecting total antibodies against the receptor-binding domain of the S protein.

The presence of anti-IFN- α_2 antibodies was investigated using a commercially available kit (Thermo Fisher Scientific; Gonçalves et al., 2021). The neutralizing capacity of patient sera against IFN- α was then evaluated as previously described (Bastard et al., 2021c).

Viral infection and IFN treatment in reconstituted HAE

MucilAir nasal HAE reconstituted from human primary cells was provided by Epithelix SARL and maintained in air-liquid interphase at 37°C and 5% CO₂ in specific culture medium in Costar Transwell inserts (Corning) according to the manufacturer's instructions. 1 d before infection (d-1), HAEs were mock treated or treated through the basolateral pole with a 2 ng/ml or 20 ng/ml final dilution of recombinant IFN- α_{2a} , IFN- β_1 , IFN- λ_1 , IFN- λ_2 , IFN- λ_3 (PBL Assay Science), or IFN- ω (Merck) in 700 μ l MucilAir culture medium. To assess the potential neutralizing effect of anti-IFN-I antibodies, recombinant IFN- α_{2a} was preincubated (37°C, 1 h) before addition to HAE with a 1% final dilution of inactivated (56°C, 30 min) pre-COVID-19-pandemic patient sera, containing or not anti-IFN- α antibodies collected from autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients and HCs, respectively. A third serum, obtained from a non-autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patient who tested positive for auto-Abs against type I IFNs, was also used as control. 24 h after IFN treatment (d0) in the presence or not of sera, the apical poles of HAE were gently washed twice with warm OptiMEM medium (GIBCO BRL and Thermo Fisher Scientific) and then infected with a 150 μ l dilution of SARS-CoV-2 virus in OptiMEM medium at a multiplicity of infection of 0.1, as previously described (Pizzorno et al., 2020). Basolateral treatment with recombinant IFN (with or without sera) was repeated 1 hpi (hour postinfection) in the same conditions as on d-1. Variations in trans-epithelial electrical resistance (TEER) were measured using a dedicated volt-ohm meter (EVOM2, Epithelial Volt/Ohm Meter) and expressed in Ohm/cm². At 54 hpi, HAE apical poles were washed with warm OptiMEM and collected in two tubes, one for TCID50 viral titration and one for quantification of viral genome by RT-PCR. HAE cells were harvested in RLT buffer (Qiagen), and total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) for subsequent gene expression analyses.

Statistical analysis

Nonparametric Wilcoxon-Mann-Whitney tests and Spearman's correlation tests were performed for all comparisons, unless otherwise specified. A χ^2 test was performed to analyze contingency tables. To calculate the virus load threshold that better divided patients into two ISGs groups, we used the lowest P value of nonparametric significance test (Wilcoxon rank sum) iteratively applied to the ISGs score, split over normalized nasal viral load thresholds ranging from minimum (0.60) to maximum detected values (9.00) with a step of 0.01. All statistical analyses were conducted using R (the R Foundation; <https://www.r-project.org/foundation/>, version 3.6.1) and GraphPad Prism 8.3.0 software. A P value of < 0.05 was considered statistically significant. Correlations were only performed on dually detected samples.

Online supplemental material

Fig. S1 is a graphical outline of the study. Fig. S2 shows a heatmap of genes differentially expressed between COVID-19 patients at different time points after symptom onset. It also shows seroconversion relative to time after symptom onset and the

relations between the IFN score and clinical or virological parameters. Fig. S3 shows the dynamics of blood expression of transcripts related to different immune pathways during SARS-CoV-2 infection. Fig. S4 shows the correlation between blood IFN-I/III scores and serum IFN- λ_1 levels. Fig. S5 shows the effect of a serum from a non-APS-1 patient containing IFN-I auto-Abs on the antiviral activity of IFN-I in the HAE model of SARS-CoV-2 infection. Table S1 lists all genes whose expression is measured in the host response NanoString panel and functional annotation of these genes. Table S2 lists genes differentially expressed between blood cells in mild COVID-19 patients at diagnosis and blood cells from HCs. Table S3 is a contingency table relative to IFN- α auto-Ab detection from nasal and plasma paired samples from mildly symptomatic and critically ill COVID-19 patients.

Acknowledgments

We thank all patients for their participation. We also thank all personnel of the occupational health and medicine department of Hospices Civils de Lyon who contributed to sample collection. Human biological samples and associated data were obtained from NeuroBioTec (Centre de Ressources Biologiques des Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; Biobank BB-0033-00046). We thank Karima Brahami and all members of the Direction de la Recherche Clinique et de l'innovation (Hospices Civils de Lyon) for their reactivity and Emilie Laurent and Cedrine Milesi (VirPath team) for their technical support. The authors would like to thank Hélène Boyer for a helpful review of the manuscript.

T. Walzer's laboratory is supported by the Agence Nationale de la Recherche, the Fondation ARC ( quipe labellis e), and the Institut National du Cancer and receives institutional grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Claude Bernard Lyon 1 University, and  cole normale supérieure de Lyon. The VirPath team is supported by REACTing, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, the Agence Nationale de la Recherche, and Institut Mérieux (Mérieux Research grant). This study was supported by the Hospices Civils de Lyon and the Fondation des Hospices Civils de Lyon. The Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases is supported by the National Institutes of Health (R01AI088364), the National Center for Advancing Translational Sciences, National Institutes of Health Clinical and Translational Science Award program (UL1 TR001866), an Emergent Ventures Fast Grant, the Mercatus Center at George Mason University, the Fisher Center for Alzheimer's Research Foundation, the Meyer Foundation, the JPB Foundation, the Agence Nationale de la Recherche under the "Investments for the Future" program (ANR-10-IAHU-01), the Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases Laboratory of Excellence (ANR-10-LABX-62-IBEID), the French Foundation for Medical Research (EQU201903007798), the French Foundation for Medical Research and Agence Nationale de la Recherche GENCOVID project (ANR-20-COVI-0003), Agence Nationale de la Recherche Nord-Sud (ANRS-COV05), Agence Nationale de la Recherche

AABIFNCOV project (ANR-20-C11-0001), the Square Foundation, Grandir - Fonds de solidarité pour l'enfance, the SCOR Corporate Foundation for Science, the Howard Hughes Medical Institute, the Rockefeller University, the St. Giles Foundation, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and the University of Paris.

Author contributions: J. Lopez contributed to conceptualization, data curation, formal analysis, supervision, validation, investigation, visualization, methodology, and writing (original draft). M. Mommert contributed to conceptualization, data curation, formal analysis, validation, investigation, visualization, and methodology. W. Mouton contributed to conceptualization, data curation, formal analysis, validation, investigation, visualization, methodology, and writing (original draft, review and editing). A. Pizzorno contributed to conceptualization, data curation, formal analysis, supervision, validation, investigation, visualization, methodology, and writing (original draft, review and editing). K. Brengel-Pesce contributed to conceptualization, supervision, validation, investigation, and methodology. M. Mezidi contributed resources. J.-B. Fassier contributed resources and contributed to funding acquisition. M. Villard contributed to investigation and methodology. B. Lina contributed to methodology and funding acquisition. J.-C. Richard contributed resources. V. Cheynet contributed to data curation, formal analysis, supervision, validation, and methodology. B. Padey contributed to formal analysis and methodology. V. Duliere contributed to formal analysis and methodology. T. Julien contributed to formal analysis and methodology. S. Paul contributed resource. P. Bastard contributed to conceptualization, formal analysis, validation, investigation, visualization, methodology, and writing (original draft). A. Belot contributed resources and contributed to conceptualization. A. Bal contributed to conceptualization, formal analysis, validation, and methodology. J.-L. Casanova contributed to conceptualization and writing (original draft, review and editing). M. Rosa-Calatrava contributed to methodology and funding acquisition and writing (original draft, review and editing). F. Morfin contributed to conceptualization, data curation, formal analysis, validation, investigation, and methodology. T. Walzer contributed to conceptualization, methodology, investigation, visualization, and writing (original draft, review and editing). S. Trouillet-Assant contributed to conceptualization, resources, funding acquisition, investigation, visualization, methodology, project administration, and writing (original draft, review and editing).

Disclosures: M. Mommert, W. Mouton, K. Brengel-Pesce, A. Bal, and V. Cheynet reported personal fees from bioMérieux during the conduct of the study and personal fees from bioMérieux outside the submitted work. M. Mommert, K. Brengel-Pesce, and S. Trouillet-Assant have a patent to FR2107421 pending. A. Pizzorno, B. Padey, and M. Rosa-Calatrava reported a patent to FR 20/02351 (Therapeutic treatments against SARS-CoV-2) pending. S. Trouillet-Assant and J.-B. Fassier reported non-financial support from bioMérieux during the conduct of the study and non-financial support from bioMérieux outside the submitted work. No other disclosures were reported.

Submitted: 3 June 2021

Revised: 17 July 2021

Accepted: 20 July 2021

References

- Bal, A., M.-A. Traubad, J.-B. Fassier, M. Rabilloud, K. Saker, C. Langlois-Jacques, N. Guibert, A. Paul, D. Alfaiate, A. Massardier-Pilonchery, et al. COVID SER Study Group. 2021. Six-month antibody response to SARS-CoV-2 in healthcare workers assessed by virus neutralization and commercial assays. *Clin. Microbiol. Infect.* 27:933–935. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.01.003>
- Bastard, P., L.B. Rosen, Q. Zhang, E. Michailidis, H.-H. Hoffmann, Y. Zhang, K. Dorgham, Q. Philippot, J. Rosain, V. Béziat, et al. COVID Human Genetic Effort. 2020. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 370:eabd4585. <https://doi.org/10.1126/science.abd4585>
- Bastard, P., R. Lévy, S. Henriquez, C. Bodemer, T.-A. Szwebel, and J.-L. Casanova. 2021a. Interferon- β Therapy in a Patient with Incontinentia Pigmenti and Autoantibodies against Type I IFNs Infected with SARS-CoV-2. *J. Clin. Immunol.* 41:931–933. <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01023-5>
- Bastard, P., J. Manry, J. Chen, J. Rosain, Y. Seeleuthner, O. AbuZaitun, L. Lorenzo, T. Khan, M. Hasek, N. Hernandez, et al. 2021b. Herpes simplex encephalitis in a patient with a distinctive form of inherited IFNAR1 deficiency. *J. Clin. Invest.* 131:e139980. <https://doi.org/10.1172/JCI139980>
- Bastard, P., E. Michailidis, H.-H. Hoffmann, M. Chbihi, T. Le Voyer, J. Rosain, Q. Philippot, Y. Seeleuthner, A. Gervais, M. Materna, et al. 2021c. Autoantibodies to type I IFNs can underlie adverse reactions to yellow fever live attenuated vaccine. *J. Exp. Med.* 218:e20202486. <https://doi.org/10.1084/jem.20202486>
- Bernardes, J.P., N. Mishra, F. Tran, T. Bahmer, L. Best, J.I. Blase, D. Bordoni, J. Franzenburg, U. Geisen, J. Josephs-Spaulding, et al. Deutsche COVID-19 Omics Initiative (DeCOI). 2020. Longitudinal Multi-omics Analyses Identify Responses of Megakaryocytes, Erythroid Cells, and Plasma-blasts as Hallmarks of Severe COVID-19. *Immunity*. 53:1296–1314.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.017>
- Blanco-Melo, D., B.E. Nilsson-Payant, W.-C. Liu, S. Uhl, D. Hoagland, R. Møller, T.X. Jordan, K. Oishi, M. Panis, D. Sachs, et al. 2020. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*. 181:1036–1045.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
- Bruserud, Ø., B.E. Oftedal, N. Landegren, M.M. Erichsen, E. Bratland, K. Lima, A.P. Jørgensen, A.G. Myhre, J. Svartberg, K.J. Fougner, et al. 2016. A Longitudinal Follow-up of Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type 1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101:2975–2983. <https://doi.org/10.1210/je.2016-1821>
- Canedo-Marroquín, G., F. Saavedra, C.A. Andrade, R.V. Berrios, L. Rodríguez-Guilarte, M.C. Opazo, C.A. Riedel, and A.M. Kalergis. 2020. SARS-CoV-2: Immune Response Elicited by Infection and Development of Vaccines and Treatments. *Front. Immunol.* 11:569760. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.569760>
- Carvalho, T., F. Krammer, and A. Iwasaki. 2021. The first 12 months of COVID-19: a timeline of immunological insights. *Nat. Rev. Immunol.* 21:245–256. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00522-1>
- Channappanavar, R., A.R. Fehr, R. Vijay, M. Mack, J. Zhao, D.K. Meyerholz, and S. Perlman. 2016. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. *Cell Host Microbe*. 19:181–193. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.007>
- Chen, C.-C., E. Pouliquen, A. Broisat, F. Andreatta, M. Racapé, P. Bruneval, L. Kessler, M. Ahmadi, S. Bacot, C. Saison-Delaplace, et al. 2018. Endothelial chimerism and vascular sequestration protect pancreatic islet grafts from antibody-mediated rejection. *J. Clin. Invest.* 128:219–232. <https://doi.org/10.1172/JCI93542>
- de Prost, N., P. Bastard, R. Arrester, S. Fourati, M. Mahévas, S. Burrel, K. Dorgham, G. Gorochoy, Y. Tandjaoui-Lambiotte, I. Azzaoui, et al. 2021. Plasma Exchange to Rescue Patients with Autoantibodies Against Type I Interferons and Life-Threatening COVID-19 Pneumonia. *J. Clin. Immunol.* 41:536–544. <https://doi.org/10.1007/s10875-021-00994-9>
- Duncan, C.J.A., S.M.B. Mohamad, D.F. Young, A.J. Skelton, T.R. Leahy, D.C. Munday, K.M. Butler, S. Morfopoulou, J.R. Brown, M. Hubank, et al. 2015. Human IFNAR2 deficiency: Lessons for antiviral immunity. *Sci. Transl. Med.* 7:307ra154. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac4227>

- Gao, D., M.J. Ciancanelli, P. Zhang, O. Harschnitz, V. Bondet, M. Hasek, J. Chen, X. Mu, Y. Itan, A. Cobat, et al. 2021. TLR3 controls constitutive IFN- β antiviral immunity in human fibroblasts and cortical neurons. *J. Clin. Invest.* 131:e134529. <https://doi.org/10.1172/JCI134529>
- Goncalves, D., M. Mezidi, M. Perret, K. Saker, N. Fabien, R. Pescarmona, C. Lombard, T. Walzer, J.L. Casanova, A. Belot, et al. 2021. Antibodies against type-I Interferon: detection and association with severe clinical outcome in COVID-19 patients. *Clin. Transl. Immunology*. In press.
- Gothe, F., C.F. Hatton, L. Truong, Z. Klimova, V. Kanderova, M. Fejtikova, A. Grainger, V. Bigley, J. Perthen, D. Mitra, et al. 2020. A novel case of homozygous IFNAR1 deficiency with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Clin. Infect. Dis.*:ciaa1790. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1790>
- Hadjadj, J., N. Yatim, L. Barnabei, A. Corneau, J. Boussier, N. Smith, H. Péré, B. Charbit, V. Bondet, C. Chenevier-Gobeaux, et al. 2020. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*. 369:718–724. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027>
- Han, M.S., J.-H. Byun, Y. Cho, and J.H. Rim. 2021. RT-PCR for SARS-CoV-2: quantitative versus qualitative. *Lancet Infect. Dis.* 21:165. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30424-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30424-2)
- Hernandez, N., I. Melki, H. Jing, T. Habib, S.S.Y. Huang, J. Danielson, T. Kula, S. Drutman, S. Belkaya, V. Rattina, et al. 2018. Life-threatening influenza pneumonia in a child with inherited IRF9 deficiency. *J. Exp. Med.* 215:2567–2585. <https://doi.org/10.1084/jem.20180628>
- Hernandez, N., G. Bucciol, L. Moens, J. Le Pen, M. Shahrooei, E. Goudouris, A. Shirkan, M. Changi-Ashtiani, H. Rokni-Zadeh, E.H. Sayar, et al. 2019. Inherited IFNAR1 deficiency in otherwise healthy patients with adverse reaction to measles and yellow fever live vaccines. *J. Exp. Med.* 216:2057–2070. <https://doi.org/10.1084/jem.20182295>
- Iwasaki, A. 2017. Immune Regulation of Antibody Access to Neuronal Tissues. *Trends Mol. Med.* 23:227–245. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.01.004>
- Koning, R., P. Bastard, J.-L. Casanova, M.C. Brouwer, and D. van de Beek. with the Amsterdam U.M.C. COVID-19 Biobank Investigators. 2021. Auto-antibodies against type I interferons are associated with multi-organ failure in COVID-19 patients. *Intensive Care Med.* 47:704–706. <https://doi.org/10.1007/s00134-021-06392-4>
- Lazear, H.M., J.W. Schoggins, and M.S. Diamond. 2019. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*. 50:907–923. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.025>
- Levin, M. 2006. Anti-interferon auto-antibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1. *PLoS Med.* 3:e292. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030292>
- Liu, C., A.J. Martins, W.W. Lau, N. Rachmaninoff, J. Chen, L. Imberti, D. Mostaghimi, D.L. Fink, P.D. Burbelo, K. Dobbs, et al. COVID Clinicians. 2021. Time-resolved systems immunology reveals a late juncture linked to fatal COVID-19. *Cell*. 184:1836–1857.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.018>
- Lucas, C., P. Wong, J. Klein, T.B.R. Castro, J. Silva, M. Sundaram, M.K. Ellingson, T. Mao, J.E. Oh, B. Israelow, et al. Yale IMPACT Team. 2020. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 584:463–469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2588-y>
- Meager, A., K. Visvalingam, P. Peterson, K. Möll, A. Murumägi, K. Krohn, P. Eskelin, J. Perheentupa, E. Husebye, Y. Kadota, and N. Willcox. 2006. Anti-interferon autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1. *PLoS Med.* 3:e289. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030289>
- Mick, E., J. Kamm, A.O. Pisco, K. Ratnasiri, J.M. Babik, G. Castañeda, J.L. DeRisi, A.M. Detweiler, S.L. Hao, K.N. Kangelaris, et al. 2020. Upper airway gene expression reveals suppressed immune responses to SARS-CoV-2 compared with other respiratory viruses. *Nat. Commun.* 11:5854. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19587-y>
- Mommert, M., M. Perret, M. Hockin, S. Viel, A. Belot, J.-C. Richard, M. Mezidi, J.-B. Fassier, E. Javouhey, A. Hemmert, et al. COVID-HCL Study Group. 2021. Type-I Interferon assessment in 45 minutes using the FilmArray[®] PCR platform in SARS-CoV-2 and other viral infections. *Eur. J. Immunol.* 51:989–994. <https://doi.org/10.1002/eji.202048978>
- Ng, D.L., A.C. Granados, Y.A. Santos, V. Servellita, G.M. Goldgof, C. Meydan, A. Sotomayor-Gonzalez, A.G. Levine, J. Balcerek, L.M. Han, et al. 2021. A diagnostic host response biosignature for COVID-19 from RNA profiling of nasal swabs and blood. *Sci. Adv.* 7:eabe5984. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe5984>
- Park, A., and A. Iwasaki. 2020. Type I and Type III Interferons - Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. *Cell Host Microbe*. 27:870–878. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.008>
- Pescarmona, R., A. Belot, M. Villard, L. Besson, J. Lopez, I. Mosnier, A.-L. Mathieu, C. Lombard, L. Garnier, C. Frachette, et al. 2019. Comparison of RT-qPCR and Nanostring in the measurement of blood interferon response for the diagnosis of type I interferonopathies. *Cytokine*. 113:446–452. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.10.023>
- Pierce, C.A., S. Sy, B. Galen, D.Y. Goldstein, E. Orner, M.J. Keller, K.C. Herold, and B.C. Herold. 2021. Natural mucosal barriers and COVID-19 in children. *JCI Insight*. 6:e148694. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.148694>
- Pizzorno, A., B. Padey, T. Julien, S. Trouillet-Assant, A. Traversier, E. Errazuriz-Cerda, J. Fourret, J. Dubois, A. Gaymard, F.-X. Lescure, et al. 2020. Characterization and Treatment of SARS-CoV-2 in Nasal and Bronchial Human Airway Epithelia. *Cell Rep Med*. 1:100059. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100059>
- Platanitis, E., D. Demiroz, A. Schneller, K. Fischer, C. Capelle, M. Hartl, T. Gossenreiter, M. Müller, M. Novatchkova, and T. Decker. 2019. A molecular switch from STAT2-IRF9 to ISGF3 underlies interferon-induced gene transcription. *Nat. Commun.* 10:2921. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10970-y>
- Premkumar, L., B. Segovia-Chumbez, R. Jodi, D.R. Martinez, R. Raut, A. Markmann, C. Cornaby, L. Bartelt, S. Weiss, Y. Park, et al. 2020. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci. Immunol.* 5:eabc8413. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abc8413>
- Robinot, R., M. Hubert, G.D. de Melo, F. Lazarini, T. Bruel, N. Smith, S. Levallois, F. Larrous, J. Fernandes, S. Gellenoncourt, et al. 2021. SARS-CoV-2 infection induces the dedifferentiation of multiciliated cells and impairs mucociliary clearance. *Nat. Commun.* 12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24521-x>
- Rosain, J., X.-F. Kong, R. Martinez-Barricarte, C. Oleaga-Quintas, N. Ramirez-Alejo, J. Markle, S. Okada, S. Boisson-Dupuis, J.-L. Casanova, and J. Bustamante. 2019. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: 2014–2018 update. *Immunol. Cell Biol.* 97:360–367. <https://doi.org/10.1111/imcb.12210>
- Rydzynski Moderbacher, C., S.I. Ramirez, J.M. Dan, A. Griffoni, K.M. Hastie, D. Weiskopf, S. Belanger, R.K. Abbott, C. Kim, J. Choi, et al. 2020. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 183:996–1012.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.038>
- Sallard, E., F.-X. Lescure, Y. Yazdanpanah, F. Mentre, and N. Peiffer-Smadja. 2020. Type 1 interferons as a potential treatment against COVID-19. *Antiviral Res.* 178:104791. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104791>
- Schneider, W.M., M.D. Chevillotte, and C.M. Rice. 2014. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32:513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
- Schultze, J.L., and A.C. Aschenbrenner. 2021. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell*. 184:1671–1692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.029>
- Stertz, S., and B.G. Hale. 2021. Interferon system deficiencies exacerbating severe pandemic virus infections. *Trends Microbiol.*:S0966-842X(21)00060-3. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.03.001>
- Szabo, P.A., P. Dogra, J.I. Gray, S.B. Wells, T.J. Connors, S.P. Weisberg, I. Krupska, R. Matsumoto, M.M.L. Poon, E. Idzikowski, et al. 2021. Longitudinal profiling of respiratory and systemic immune responses reveals myeloid cell-driven lung inflammation in severe COVID-19. *Immunity*. 54:797–814.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.03.005>
- Tawfik, D.M., L. Vachot, A. Bocquet, F. Venet, T. Rimmelé, G. Monneret, S. Blein, J.L. Montgomery, A.C. Hemmert, A. Pachot, et al. 2020. Immune Profiling Panel: A Proof-of-Concept Study of a New Multiplex Molecular Tool to Assess the Immune Status of Critically Ill Patients. *J. Infect. Dis.* 222(Suppl 2):S84–S95. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa248>
- Trouillet-Assant, S., C. Albert Vega, A. Bal, J.A. Nazare, P. Fascia, A. Paul, A. Massardier-Pilonchery, C. D. Aubarede, N. Guibert, V. Pitiot, et al. COVID-SER study group. 2020a. Assessment of serological techniques for screening patients for COVID-19 (COVID-SER): a prospective, multicentric study. *BMJ Open*. 10:e041268. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-041268>
- Trouillet-Assant, S., S. Viel, A. Gaymard, S. Pons, J.-C. Richard, M. Perret, M. Villard, K. Brengel-Pesce, B. Lina, M. Mezidi, et al. COVID HCL Study group. 2020b. Type I IFN immunoprofiling in COVID-19 patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 146:206–208.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.029>
- Troya, J., P. Bastard, L. Planas-Serra, P. Ryan, M. Ruiz, M. de Carranza, J. Torres, A. Martínez, L. Abel, J.-L. Casanova, and A. Pujol. 2021. Neutralizing

- Autoantibodies to Type I IFNs in >10% of Patients with Severe COVID-19 Pneumonia Hospitalized in Madrid, Spain. *J. Clin. Immunol.* 41:914–922. <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01036-0>
- van der Wijst, M.G.P., S.E. Vazquez, G.C. Hartoularos, P. Bastard, T. Grant, R. Bueno, D.S. Lee, J.R. Greenland, Y. Sun, R. Perez, et al. 2021. Longitudinal single-cell epitope and RNA-sequencing reveals the immunological impact of type I interferon autoantibodies in critical COVID-19. *bioRxiv*. (Preprint posted March 10, 2021) <https://doi.org/10.1101/2021.03.09.434529>
- Vanderheiden, A., P. Ralfs, T. Chirkova, A.A. Upadhyay, M.G. Zimmerman, S. Bedoya, H. Aoued, G.M. Tharp, K.L. Pellegrini, C. Manfredi, et al. 2020. Type I and Type III Interferons Restrict SARS-CoV-2 Infection of Human Airway Epithelial Cultures. *J. Virol.* 94:e00985–e20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00985-20>
- Wang, K., X. Zhang, J. Sun, J. Ye, F. Wang, J. Hua, H. Zhang, T. Shi, Q. Li, and X. Wu. 2020. Differences of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Shedding Duration in Sputum and Nasopharyngeal Swab Specimens Among Adult Inpatients With Coronavirus Disease 2019. *Chest.* 158:1876–1884. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.06.015>
- Wilson, D.H., D.M. Rissin, C.W. Kan, D.R. Fournier, T. Piech, T.G. Campbell, R.E. Meyer, M.W. Fishburn, C. Cabrera, P.P. Patel, et al. 2016. The Simoa HD-1 Analyzer: A Novel Fully Automated Digital Immunoassay Analyzer with Single-Molecule Sensitivity and Multiplexing. *J. Lab. Autom.* 21:533–547. <https://doi.org/10.1177/2211068215589580>
- Zhang, Q., P. Bastard, A. Bolze, E. Jouanguy, S.-Y. Zhang, A. Cobat, L.D. Notarangelo, H.C. Su, L. Abel, and J.-L. Casanova. COVID Human Genetic Effort. 2020a. Life-Threatening COVID-19: Defective Interferons Unleash Excessive Inflammation. *Med (N Y)*. 1:14–20. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2020.12.001>
- Zhang, Q., P. Bastard, Z. Liu, J. Le Pen, M. Moncada-Velez, J. Chen, M. Ogishi, I.K.D. Sabli, S. Hodeib, C. Korol, et al. NIAID-USUHS/TAGC COVID Immunity Group. 2020b. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science.* 370:eabd4570. <https://doi.org/10.1126/science.abd4570>
- Ziegler, C.G.K., V.N. Miao, A.H. Owings, A.W. Navia, Y. Tang, J.D. Bromley, P. Lotfy, M. Sloan, H. Laird, H.B. Williams, et al. 2021. Impaired local intrinsic immunity to SARS-CoV-2 infection in severe COVID-19. *Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.023>

Supplemental material

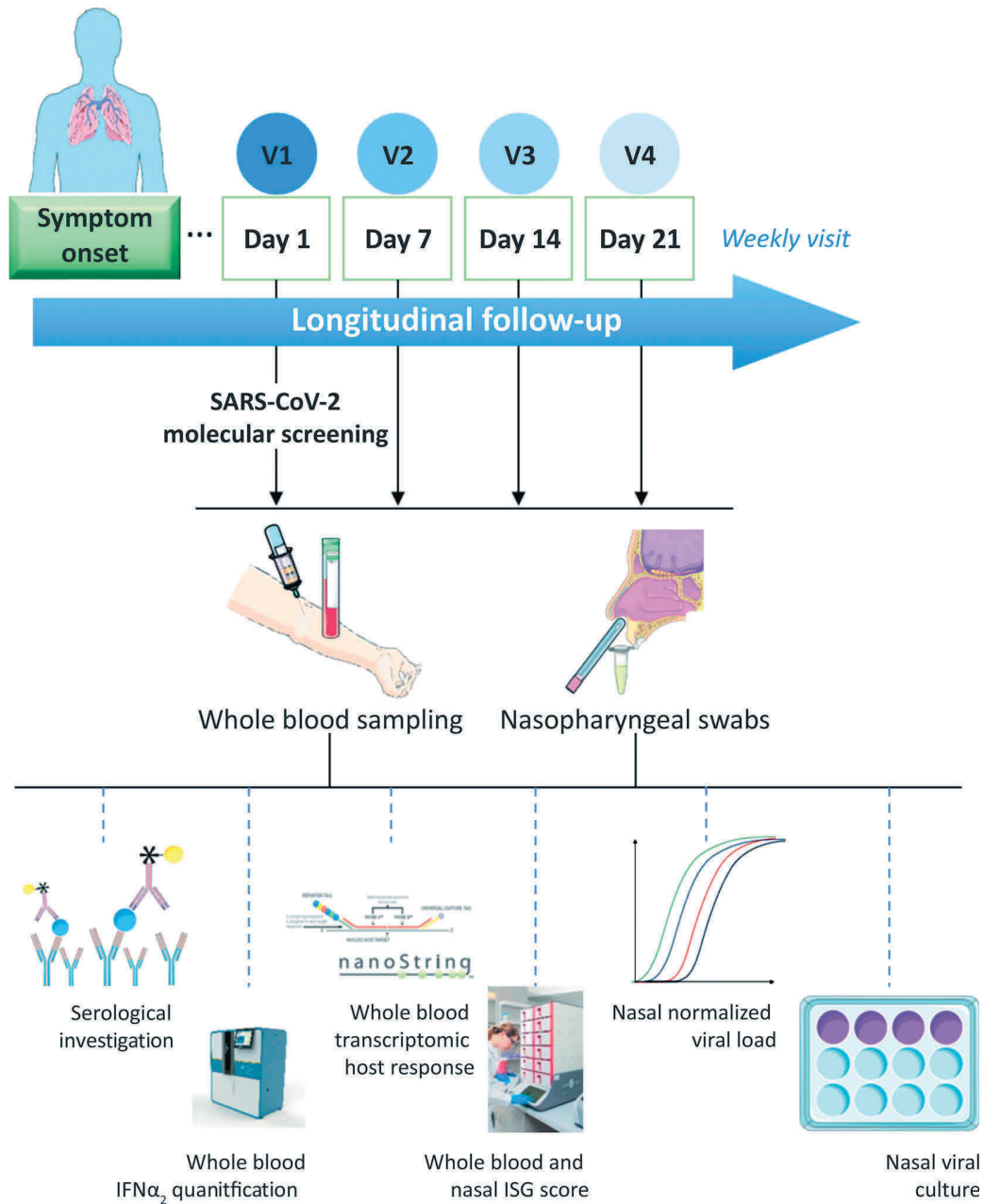


Figure S1. **Graphical outline of the study.** Parts of the figure were drawn by using pictures from Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/>), licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). Simoa HD-1 illustration used with permission from Quanterix and Nanostring.

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/121/10/e20211211/1426366/jem_20211211.pdf by guest on 04 February 2022

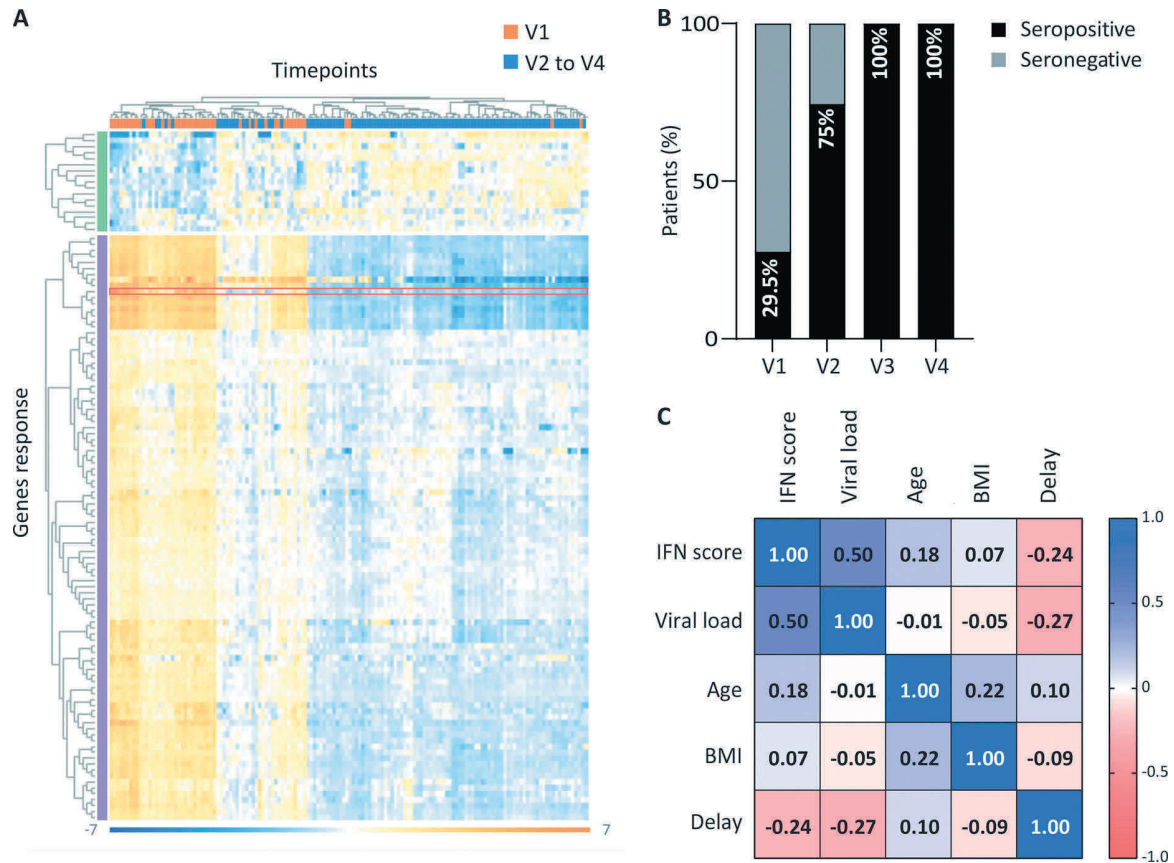


Figure S2. **Whole-blood transcriptomic analysis at different time points post-diagnosis.** (A) Unsupervised clustering of V1 (orange columns) and V2–V4 samples (blue columns) and DEGs, measured using the NanoString host response panel. The green vertical bar highlights the 17 genes down-regulated at V1 compared with V2/V3/V4, and the purple bar highlights the 106 genes up-regulated at V1 compared with V2/V3/V4. (B) Histogram bars showing the percentage of seroconverted (Wantai total SARS-CoV-2 Ig) patients within the cohort of mildly symptomatic COVID-19 health care workers at the different time points of the longitudinal follow-up. (C) Pearson correlation table between NanoString IFN score, nasal viral load, age, body mass index (BMI), and delay after symptoms.

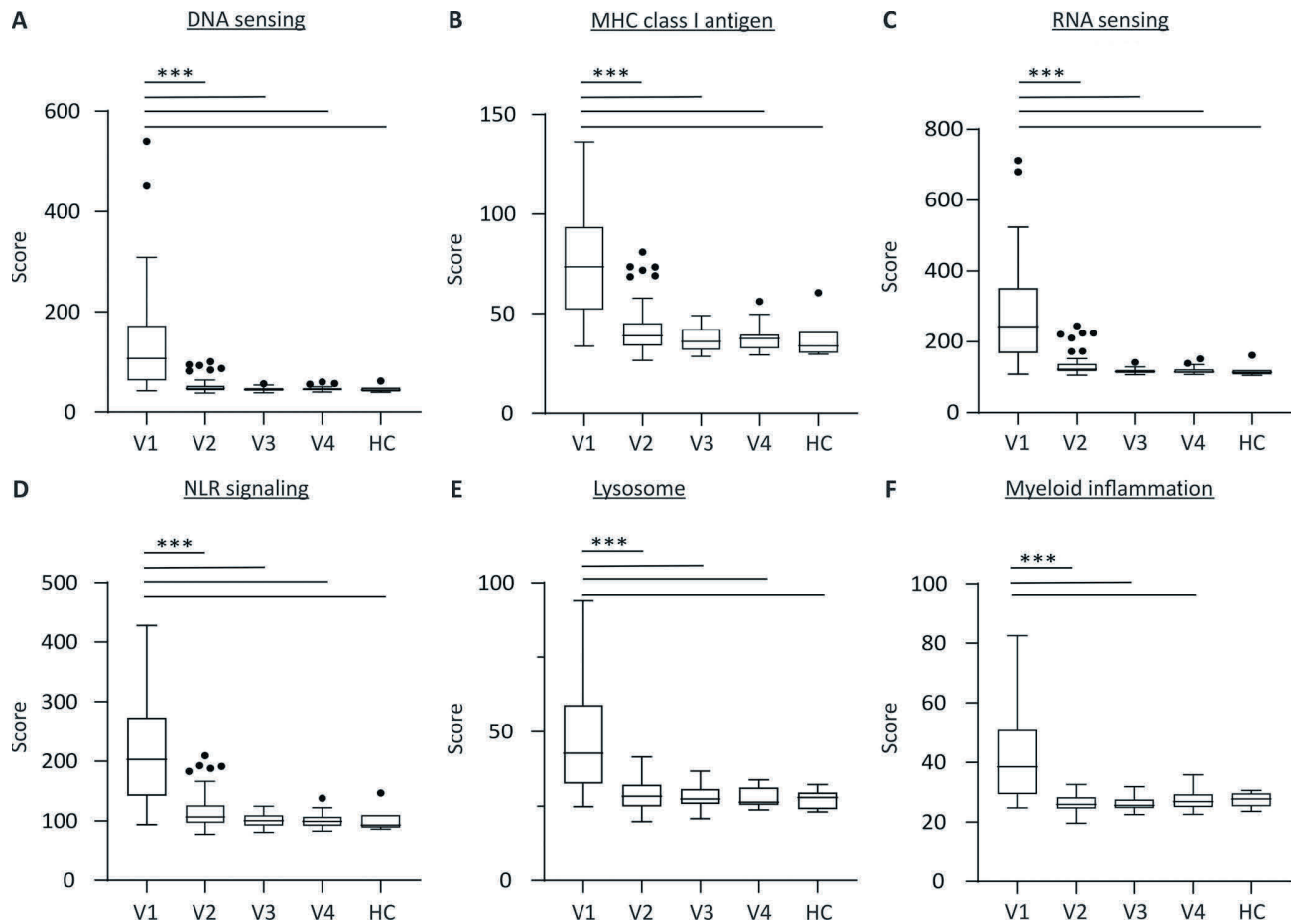


Figure S3. **Dynamics of induction in the blood of different immune pathways during SARS-CoV-2 infection.** (A-F) Boxplots showing the blood expression score for different pathways significantly modulated from V1 to V4. A Kruskal-Wallis with uncorrected Dunn's test was used for statistical analysis of data presented in this figure (multiple comparisons; ***, $P < 0.001$).

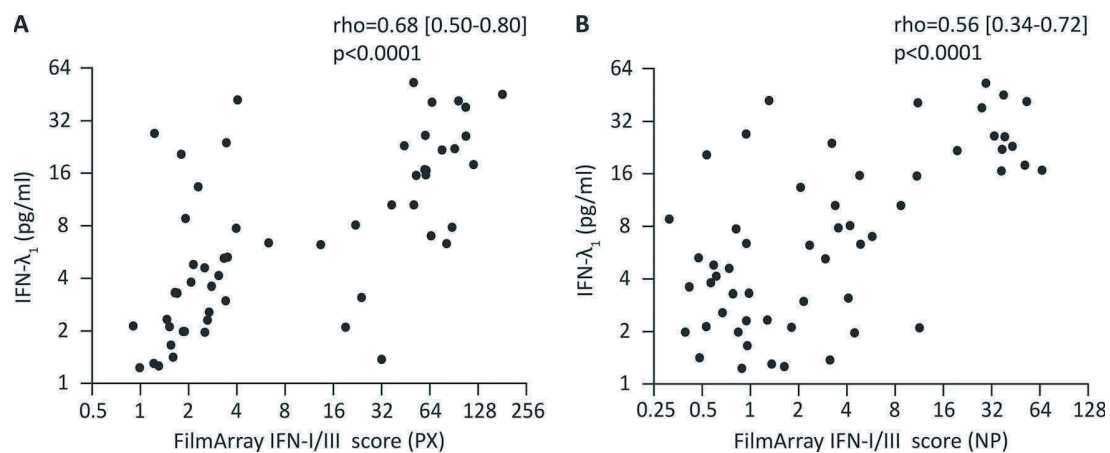


Figure S4. **Correlation between IFN-I/III scores and serum I IFN- λ_1 levels.** (A and B) Correlation between the blood (A; PX) or NP (B) IFN-I/III scores and plasmatic IFN- λ_1 levels ($n = 56$ samples with a detectable value from 22 patients), determined by ELISA. The Spearman's correlation coefficient is shown.

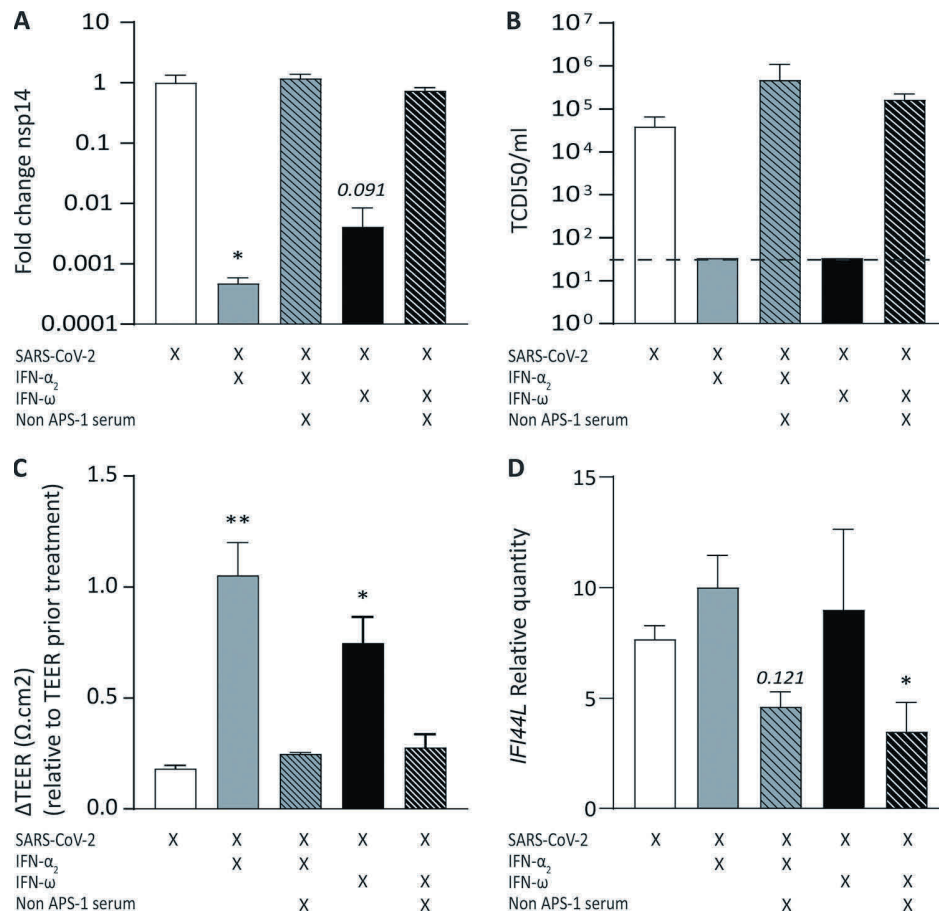


Figure S5. **Sera containing anti-IFN-I antibodies neutralize IFN- α_2 antiviral activity in a reconstituted HAE model of SARS-CoV-2 infection.** The effect of a serum from a non-APS-1 patient containing IFN-I auto-Abs was evaluated in a reconstituted HAE model of SARS-CoV-2 infection. **(A)** Nasal HAEs were treated (24 h before and 1 h after SARS-CoV-2 infection) with recombinant IFN- α_2 in the presence or absence of the indicated sera. Apical washes were performed 54 hpi, and viral titers were determined by RT-PCR. Results are representative of three biological replicates and expressed as relative to the mock-treated control. **(B)** Apical infectious viral titers 54 hpi determined by TCID50. The dotted line depicts the limit of detection. **(C)** Δ TEER between $t = 0$ and $t = 54$ hpi. **(D)** Relative expression of *IFI44L* assessed using FilmArray technology from total cellular RNA extracted after infection. In the figure, bars and error bars represent mean and SD, respectively. A Kruskal-Wallis with uncorrected Dunn's test was used for statistical analysis of data presented in this figure (multiple comparisons; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). In all conditions, the reference condition was SARS-CoV-2 alone (white bars).

Tables S1 and S2 are provided online as separate Excel files, and Table S3 is provided online as a separate PDF. Table S1 lists all genes whose expression is measured in the host response NanoString panel and functional annotation of these genes. Table S2 lists genes differentially expressed between blood cells in mild COVID-19 patients at diagnosis and blood cells from HCs. Table S3 is a 2×2 contingency table relative to IFN- α auto-Ab detection from nasal and plasma paired samples from mildly symptomatic and critically ill COVID-19 patients.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Todoric K, Koontz JB, Mattox D, Tarrant TK. Autoimmunity in Immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep.* août 2013;13(4):361-70.
2. Costagliola G, Cappelli S, Consolini R. Autoimmunity in Primary Immunodeficiency Disorders: An Updated Review on Pathogenic and Clinical Implications. *J Clin Med.* 15 oct 2021;10(20):4729.
3. Giardino G, Gallo V, Prencipe R, Gaudino G, Romano R, De Cataldis M, et al. Unbalanced Immune System: Immunodeficiencies and Autoimmunity. *Front Pediatr.* 6 oct 2016;4:107.
4. Sánchez-Ramón S, Bermúdez A, González-Granado LI, Rodríguez-Gallego C, Sastre A, Soler-Palacín P, et al. Primary and Secondary Immunodeficiency Diseases in Oncohaematology: Warning Signs, Diagnosis, and Management. *Front Immunol.* 26 mars 2019;10:586.
5. Schulz TF. Cancer and viral infections in immunocompromised individuals. *Int J Cancer.* 15 oct 2009;125(8):1755-63.
6. Mortaz E, Tabarsi P, Mansouri D, Khosravi A, Garssen J, Velayati A, et al. Cancers Related to Immunodeficiencies: Update and Perspectives. *Front Immunol.* 2016;7:365.
7. Gordon S. Phagocytosis: The Legacy of Metchnikoff. *Cell.* août 2016;166(5):1065-8.
8. Kaufmann SHE. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol.* juill 2008;9(7):705-12.
9. Gallo RC, Montagnier L. The Discovery of HIV as the Cause of AIDS. *N Engl J Med.* 11 déc 2003;349(24):2283-5.
10. Hench PS, Kendall EC, Slocumb CH, Polley HF. Adrenocortical Hormone in Arthritis : Preliminary Report. *Ann Rheum Dis.* 1 juin 1949;8(2):97-104.
11. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H. Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocytic agent. *Agents Actions.* juill 1976;6(4):468-75.
12. Meyts I, Bousfiha A, Duff C, Singh S, Lau YL, Condino-Neto A, et al. Primary Immunodeficiencies: A Decade of Progress and a Promising Future. *Front Immunol.* 18 févr 2021;11:625753.
13. Notarangelo L, Casanova JL, Fischer A, Puck J, Rosen F, Seger R, et al. Primary immunodeficiency diseases: An update. *J Allergy Clin Immunol.* sept 2004;114(3):677-87.
14. Quinn J, Modell V, Orange JS, Modell F. Growth in diagnosis and treatment of primary immunodeficiency within the global Jeffrey Modell Centers Network. *Allergy Asthma Clin Immunol Off J Can Soc Allergy Clin Immunol.* 4 mars 2022;18(1):19.
15. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol.* janv 2020;40(1):24-64.
16. Suarez & Cheminan - Deficit immunitaire.pdf.
17. Evaluation a priori de l'extension du dépistage neonatal au deficit immunitaire combine severe - HAS.pdf.

18. Abolhassani H, Azizi G, Sharifi L, Yazdani R, Mohsenzadegan M, Delavari S, et al. Global systematic review of primary immunodeficiency registries. *Expert Rev Clin Immunol*. 2 juill 2020;16(7):717-32.
19. C'est quoi un DIP ? – Iris. <https://associationiris.org/dip/cest-quoi-un-dip/>
20. Ageing and health <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>
21. Aiello A, Farzaneh F, Candore G, Caruso C, Davinelli S, Gambino CM, et al. Immunosenescence and Its Hallmarks: How to Oppose Aging Strategically? A Review of Potential Options for Therapeutic Intervention. *Front Immunol*. 25 sept 2019;10:2247.
22. Preterm birth. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>
23. Melville JM, Moss TJM. The immune consequences of preterm birth. *Front Neurosci*. 2013;7:79.
24. Collins A, Weitkamp JH, Wynn JL. Why are preterm newborns at increased risk of infection? *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed*. juill 2018;103(4):F391-4.
25. Steiner L, Diesner SC, Voitl P. Risk of infection in the first year of life in preterm children: An Austrian observational study. *Ryckman KK, éditeur. PLOS ONE*. 9 déc 2019;14(12):e0224766.
26. Bourke CD, Berkley JA, Prendergast AJ. Immune Dysfunction as a Cause and Consequence of Malnutrition. *Trends Immunol*. juin 2016;37(6):386-98.
27. Rytter MJH, Kolte L, Briend A, Friis H, Christensen VB. The Immune System in Children with Malnutrition—A Systematic Review. *Akiyama T, éditeur. PLoS ONE*. 25 août 2014;9(8):e105017.
28. Schaible UE, Kaufmann SHE. Malnutrition and Infection: Complex Mechanisms and Global Impacts. *PLoS Med*. 1 mai 2007;4(5):e115.
29. Marti A, Marcos A, Martinez JA. Obesity and immune function relationships. *Obes Rev*. mai 2001;2(2):131-40.
30. Islam MN, Bradley BA, Ceredig R. Sterile post-traumatic immunosuppression. *Clin Transl Immunol*. 29 avr 2016;5(4):e77.
31. Komori A, Iriyama H, Kainoh T, Aoki M, Naito T, Abe T. The impact of infection complications after trauma differs according to trauma severity. *Sci Rep*. déc 2021;11(1):13803.
32. Eguia E, Bunn C, Kulshrestha S, Markossian T, Durazo-Arvizu R, Baker MS, et al. Trends, Cost, and Mortality From Sepsis After Trauma in the United States: An Evaluation of the National Inpatient Sample of Hospitalizations, 2012–2016. *Crit Care Med*. sept 2020;48(9):1296-303.
33. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 23 févr 2016;315(8):801.
34. Fiche d'information — Dernières statistiques sur l'état de l'épidémie de sida. <https://www.unaids.org/fr/resources/fact-sheet>
35. De Cock KM, Jaffe HW, Curran JW. Reflections on 40 Years of AIDS. *Emerg Infect Dis*. juin 2021;27(6):1553-60.

36. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Primer*. 1 oct 2015;1(1):1-22.
37. Cancer today. <http://gco.iarc.fr/today/home>
38. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. mai 2021;71(3):209-49.
39. Scherlinger M, Mertz P, Sagez F, Meyer A, Felten R, Chatelus E, et al. Worldwide trends in all-cause mortality of auto-immune systemic diseases between 2001 and 2014. *Autoimmun Rev*. juin 2020;19(6):102531.
40. Almutairi K, Nossent J, Preen D, Keen H, Inderjeeth C. The global prevalence of rheumatoid arthritis: a meta-analysis based on a systematic review. *Rheumatol Int*. mai 2021;41(5):863-77.
41. van Delft MAM, Huizinga TWJ. An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 1 juin 2020;110:102392.
42. Lau EYM, Carroll EC, Callender LA, Hood GA, Berryman V, Patrick M, et al. Type 2 diabetes is associated with the accumulation of senescent T cells. *Clin Exp Immunol*. 21 juill 2019;197(2):205-13.
43. Janssen AWM, Stienstra R, Jaeger M, van Gool AJ, Joosten LAB, Netea MG, et al. Understanding the increased risk of infections in diabetes: innate and adaptive immune responses in type 1 diabetes. *Metabolism*. août 2021;121:154795.
44. Alatab S, Sepanlou SG, Ikuta K, Vahedi H, Bisignano C, Safiri S, et al. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 1 janv 2020;5(1):17-30.
45. de Mattos BRR, Garcia MPG, Nogueira JB, Paiatto LN, Albuquerque CG, Souza CL, et al. Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:493012.
46. Hodgens A, Sharman T. Corticosteroids. *StatPearls*. Publishing; 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554612/>
47. Oppong E, Cato ACB. Effects of Glucocorticoids in the Immune System. *Adv Exp Med Biol*. 2015;872:217-33.
48. Tapia C, Nessel TA, Zito PM. Cyclosporine. *StatPearls*. Publishing; 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482450/>
49. Cronstein BN, Aune TM. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. mars 2020;16(3):145-54.
50. Ritter ML, Pirofski L. Mycophenolate mofetil: effects on cellular immune subsets, infectious complications, and antimicrobial activity. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc*. août 2009;11(4):290-7.

51. Educational Materials - JMF. <http://www.info4pi.org/library/educational-materials/10-warning-signs%20Accessed%207%20Mar%202017>.
52. Al-Herz W, Moussa MAA. Survival and Predictors of Death Among Primary Immunodeficient Patients: A Registry-Based Study. *J Clin Immunol*. juin 2012;32(3):467-73.
53. on behalf of the Dutch Working Party for Immunodeficiencies, de Pagter APJ, Bredius RGM, Kuijpers TW, Tramper J, van der Burg M, et al. Overview of 15-year severe combined immunodeficiency in the Netherlands: towards newborn blood spot screening. *Eur J Pediatr*. sept 2015;174(9):1183-8.
54. Aghamohammadi A, Pouladi N, Parvaneh N, Yeganeh M, Movahedi M, Gharagolou M, et al. Mortality and Morbidity in Common Variable Immunodeficiency. *J Trop Pediatr*. 29 sept 2006;53(1):32-8.
55. Causes de décès des personnes âgées. Insee. https://www.insee.fr/fr/statistiques/2386247#tableau-figure1_radio1
56. Causes of death statistics by age group. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Causes_of_death_statistics_by_age_group
57. Patel RM, Kandefer S, Walsh MC, Bell EF, Carlo WA, Lupton AR, et al. Causes and timing of death in extremely premature infants from 2000 through 2011. *N Engl J Med*. 22 janv 2015;372(4):331-40.
58. Jain K, Sankar MJ, Nangia S, Ballambattu VB, Sundaram V, Ramji S, et al. Causes of death in preterm neonates (<33 weeks) born in tertiary care hospitals in India: analysis of three large prospective multicentric cohorts. *J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc*. sept 2019;39(Suppl 1):13-9.
59. Muhe LM, McClure EM, Nigussie AK, Mekasha A, Worku B, Worku A, et al. Major causes of death in preterm infants in selected hospitals in Ethiopia (SIP): a prospective, cross-sectional, observational study. *Lancet Glob Health*. août 2019;7(8):e1130-8.
60. van Beek PE, Groenendaal F, Broeders L, Dijk PH, Dijkman KP, van den Dungen FAM, et al. Survival and causes of death in extremely preterm infants in the Netherlands. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. mai 2021;106(3):251-7.
61. Oza S, Lawn JE, Hogan DR, Mathers C, Cousens SN. Neonatal cause-of-death estimates for the early and late neonatal periods for 194 countries: 2000–2013. :10.
62. Elhadi M, Khaled A, Msherghi A. Infectious diseases as a cause of death among cancer patients: a trend analysis and population-based study of outcome in the United States based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Infect Agent Cancer*. 31 déc 2021;16(1):72.
63. Kiem Hao T, Nhu Hiep P, Kim Hoa NT, Van Ha C. Causes of Death in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia at Hue Central Hospital for 10 Years (2008-2018). *Glob Pediatr Health*. 2020;7:2333794X20901930.
64. Torres-Flores J, Espinoza-Zamora R, Garcia-Mendez J, Cervera-Ceballos E, Sosa-Espinoza A, Zapata-Canto N. Treatment-Related Mortality From Infectious Complications in an Acute Leukemia Clinic. *J Hematol*. déc 2020;9(4):123-31.

65. Styczyński J, Tridello G, Koster L, Iacobelli S, van Biezen A, van der Werf S, et al. Death after hematopoietic stem cell transplantation: changes over calendar year time, infections and associated factors. *Bone Marrow Transplant.* janv 2020;55(1):126-36.
66. Williams FN, Herndon DN, Hawkins HK, Lee JO, Cox RA, Kulp GA, et al. The leading causes of death after burn injury in a single pediatric burn center. *Crit Care Lond Engl.* 2009;13(6):R183.
67. A Study on the Cause of Death Due to Burn Cases and Histopathological Changes in North Indian Setting-A Cross Sectional Study. *Medico-Leg Update.* 27 janv 2020. <http://ijop.net/index.php/mlu/article/view/323>
68. Hasan DrJA, Eriby DrQH, Hammoodi DrSAK. Causes of mortality in burns, prospective study. *Int J Surg Sci.* 1 juill 2019;3(3):261-4.
69. Brusselaers N, Monstrey S, Vogelaers D, Hoste E, Blot S. Severe burn injury in Europe: a systematic review of the incidence, etiology, morbidity, and mortality. *Crit Care Lond Engl.* 2010;14(5):R188.
70. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet Lond Engl.* 12 févr 2022;399(10325):629-55.
71. Segundo GRS, Condino-Neto A. Treatment of patients with immunodeficiency: Medication, gene therapy, and transplantation. *J Pediatr (Rio J).* avr 2021;97 Suppl 1:S17-23.
72. OrtONNe N. Que veut dire Toll-like receptors et immunité innée ? 2011;4.
73. Gangloff M. Different dimerisation mode for TLR4 upon endosomal acidification? *Trends Biochem Sci.* mars 2012;37(3):92-8.
74. Maglione PJ, Simchoni N, Cunningham-Rundles C. Toll-like receptor signaling in primary immune deficiencies. *Ann N Y Acad Sci.* nov 2015;1356:1-21.
75. Aluri J, Cooper MA, Schuettpelz LG. Toll-Like Receptor Signaling in the Establishment and Function of the Immune System. *Cells.* 2 juin 2021;10(6):1374.
76. Horwood NJ, Mahon T, McDaid JP, Campbell J, Mano H, Brennan FM, et al. Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med.* 16 juin 2003;197(12):1603-11.
77. González-Serrano ME, Estrada-García I, Mogica-Martínez D, González-Garay A, López-Herrera G, Berrón-Ruiz L, et al. Increased pro-inflammatory cytokine production after lipopolysaccharide stimulation in patients with X-linked agammaglobulinemia. *J Clin Immunol.* oct 2012;32(5):967-74.
78. Cunningham-Rundles C, Radigan L, Knight AK, Zhang L, Bauer L, Nakazawa A. TLR9 activation is defective in common variable immune deficiency. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 févr 2006;176(3):1978-87.
79. Kato S, Chmielewski M, Honda H, Pecoits-Filho R, Matsuo S, Yuzawa Y, et al. Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* sept 2008;3(5):1526-33.
80. Kuroki Y, Tsuchida K, Go I, Aoyama M, Naganuma T, Takemoto Y, et al. A study of innate immunity in patients with end-stage renal disease: special reference to toll-like receptor-2 and

- 4 expression in peripheral blood monocytes of hemodialysis patients. *Int J Mol Med.* mai 2007;19(5):783-90.
81. Shaw AC, Panda A, Joshi SR, Qian F, Allore HG, Montgomery RR. Dysregulation of human Toll-like receptor function in aging. *Ageing Res Rev.* juill 2011;10(3):346-53.
 82. Kollmann TR, Levy O, Montgomery RR, Goriely S. Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. *Immunity.* 16 nov 2012;37(5):771-83.
 83. Hernández JC, Stevenson M, Latz E, Urcuqui-Inchima S. HIV type 1 infection up-regulates TLR2 and TLR4 expression and function in vivo and in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses.* oct 2012;28(10):1313-28.
 84. Donninelli G, Gessani S, Del Cornò M. Interplay between HIV-1 and Toll-like receptors in human myeloid cells: friend or foe in HIV-1 pathogenesis? *J Leukoc Biol.* 2016;99(1):97-105.
 85. El-Zayat SR, Sibaii H, Mannaa FA. Micronutrients and many important factors that affect the physiological functions of toll-like receptors. *Bull Natl Res Cent.* 29 juill 2019;43(1):123.
 86. Netea MG, Balkwill F, Chonchol M, Cominelli F, Donath MY, Giamarellos-Bourboulis EJ, et al. A guiding map for inflammation. *Nat Immunol.* 19 juill 2017;18(8):826-31.
 87. Bullock J, Rizvi SAA, Saleh AM, Ahmed SS, Do DP, Ansari RA, et al. Rheumatoid Arthritis: A Brief Overview of the Treatment. *Med Princ Pract Int J Kuwait Univ Health Sci Cent.* 2018;27(6):501-7.
 88. Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol.* 15 juin 2012;12(7):492-502.
 89. Chinen J, Shearer WT. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. *J Allergy Clin Immunol.* févr 2010;125(2 Suppl 2):S195-203.
 90. Geerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol.* déc 1999;26(3-4):259-65.
 91. Lecube A, Pachón G, Petriz J, Hernández C, Simó R. Phagocytic activity is impaired in type 2 diabetes mellitus and increases after metabolic improvement. *PLoS One.* 2011;6(8):e23366.
 92. Alba-Loureiro TC, Munhoz CD, Martins JO, Cerchiaro GA, Scavone C, Curi R, et al. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol.* août 2007;40(8):1037-44.
 93. Huggard D, Doherty DG, Molloy EJ. Immune Dysregulation in Children With Down Syndrome. *Front Pediatr.* 2020;8:73.
 94. Maheshwari A. Neutropenia in the newborn. *Curr Opin Hematol.* janv 2014;21(1):43-9.
 95. Melvan JN, Bagby GJ, Welsh DA, Nelson S, Zhang P. Neonatal sepsis and neutrophil insufficiencies. *Int Rev Immunol.* juin 2010;29(3):315-48.
 96. Moore DC. Drug-Induced Neutropenia: A Focus on Rituximab-Induced Late-Onset Neutropenia. *P T Peer-Rev J Formul Manag.* déc 2016;41(12):765-8.

97. Crawford J, Dale DC, Lyman GH. Chemotherapy-induced neutropenia: risks, consequences, and new directions for its management. *Cancer*. 15 janv 2004;100(2):228-37.
98. Ba Y, Shi Y, Jiang W, Feng J, Cheng Y, Xiao L, et al. Current management of chemotherapy-induced neutropenia in adults: key points and new challenges: Committee of Neoplastic Supportive-Care (CONS), China Anti-Cancer Association Committee of Clinical Chemotherapy, China Anti-Cancer Association. *Cancer Biol Med*. 15 nov 2020;17(4):896-909.
99. Shi X, Sims MD, Hanna MM, Xie M, Gulick PG, Zheng YH, et al. Neutropenia during HIV infection: adverse consequences and remedies. *Int Rev Immunol*. déc 2014;33(6):511-36.
100. Fadeel B, Garwicz D, Carlsson G, Sandstedt B, Nordenskjöld M. Kostmann disease and other forms of severe congenital neutropenia. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. nov 2021;110(11):2912-20.
101. Orange JS. How I Manage Natural Killer Cell Deficiency. *J Clin Immunol*. janv 2020;40(1):13-23.
102. Strauss-Albee DM, Liang EC, Ranganath T, Aziz N, Blish CA. The newborn human NK cell repertoire is phenotypically formed but functionally reduced. *Cytometry B Clin Cytom*. janv 2017;92(1):33-41.
103. Guilmot A, Hermann E, Braud VM, Carlier Y, Truyens C. Natural Killer Cell Responses to Infections in Early Life. *J Innate Immun*. 2011;3(3):280-8.
104. Guo Y, Patil NK, Luan L, Bohannon JK, Sherwood ER. The biology of natural killer cells during sepsis. *Immunology*. févr 2018;153(2):190-202.
105. Smyth MJ, Thia KYT, Street SEA, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-Mediated Cytotoxicity Is Critical for Surveillance of Spontaneous Lymphoma. *J Exp Med*. 5 sept 2000;192(5):755-60.
106. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. févr 2010;125(2 Suppl 2):S33-40.
107. Minervina A, Pogorelyy M, Mamedov I. T-cell receptor and B-cell receptor repertoire profiling in adaptive immunity. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. nov 2019;32(11):1111-23.
108. Dalakas MC. B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders. *Nat Clin Pract Neurol*. oct 2008;4(10):557-67.
109. Pierce SK. Lipid rafts and B-cell activation. *Nat Rev Immunol*. févr 2002;2(2):96-105.
110. Lymphocytopenia - Hematology and Oncology. MSD Manual Professional Edition. <https://www.msmanuals.com/professional/hematology-and-oncology/leukopenias/lymphocytopenia>
111. Warny M, Helby J, Nordestgaard BG, Birgens H, Bojesen SE. Lymphopenia and risk of infection and infection-related death in 98,344 individuals from a prospective Danish population-based study. *PLoS Med*. nov 2018;15(11):e1002685.
112. El Bakkouri J, Aadam Z, Ailal F, Alj HS, Bousfiha AA. [Humoral immunodeficiency : awareness for better support]. *Pan Afr Med J*. 2014;18:272.

113. Taneja A, Muco E, Chhabra A. Bruton Agammaglobulinemia. StatPearls. Publishing; 2022. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448170/>
114. Malik MA, Masab M. Wiskott-Aldrich Syndrome. StatPearls. Publishing; 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539838/>
115. Zonios DI, Falloon J, Bennett JE, Shaw PA, Chaitt D, Baseler MW, et al. Idiopathic CD4+ lymphocytopenia: natural history and prognostic factors. *Blood*. 15 juill 2008;112(2):287-94.
116. Tuano KS, Seth N, Chinen J. Secondary immunodeficiencies: An overview. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1 déc 2021;127(6):617-26.
117. Venet F, Davin F, Guignant C, Larue A, Cazalis MA, Darbon R, et al. EARLY ASSESSMENT OF LEUKOCYTE ALTERATIONS AT DIAGNOSIS OF SEPTIC SHOCK. *Shock*. oct 2010;34(4):358-63.
118. Cummins NW, Badley AD. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis: 2010. *Cell Death Dis*. 11 nov 2010;1:e99.
119. Zhao Q, Meng M, Kumar R, Wu Y, Huang J, Deng Y, et al. Lymphopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A systemic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. juill 2020;96:131-5.
120. Rivero SJ, Díaz-Jouanen E, Alarcón-Segovia D. Lymphopenia in systemic lupus erythematosus. Clinical, diagnostic, and prognostic significance. *Arthritis Rheum*. avr 1978;21(3):295-305.
121. Borg C, Ray-Coquard I, Philip I, Clapisson G, Bendriss-Vermare N, Menetrier-Caux C, et al. CD4 lymphopenia as a risk factor for febrile neutropenia and early death after cytotoxic chemotherapy in adult patients with cancer. *Cancer*. 1 déc 2004;101(11):2675-80.
122. Venkatesulu BP, Mallick S, Lin SH, Krishnan S. A systematic review of the influence of radiation-induced lymphopenia on survival outcomes in solid tumors. *Crit Rev Oncol Hematol*. mars 2018;123:42-51.
123. Gergely P. Drug-induced lymphopenia: focus on CD4+ and CD8+ cells. *Drug Saf*. août 1999;21(2):91-100.
124. Tam JS, Routes JM. Common variable immunodeficiency. *Am J Rhinol Allergy*. août 2013;27(4):260-5.
125. Notarangelo LD, Hayward AR. X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (XHIM). *Clin Exp Immunol*. juin 2000;120(3):399-405.
126. Ma S, Wang C, Mao X, Hao Y. B Cell Dysfunction Associated With Aging and Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2019;10:318.
127. Nikolich-Zugich J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol*. juill 2008;8(7):512-22.
128. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. déc 2013;13(12):862-74.
129. Daoud AK, Tayyar MA, Fouda IM, Harfeil NA. Effects of diabetes mellitus vs. in vitro hyperglycemia on select immune cell functions. *J Immunotoxicol*. mars 2009;6(1):36-41.

130. Daryabor G, Atashzar MR, Kabelitz D, Meri S, Kalantar K. The Effects of Type 2 Diabetes Mellitus on Organ Metabolism and the Immune System. *Front Immunol.* 2020;11:1582.
131. Iwai N, Steib C, Marzo A, Lerret NM. The Role of Hyperglycemia in CD4 T Cell Survival and Differentiation. *Am Soc Clin Lab Sci.* 1 janv 2018. <http://clsjournal.ascls.org/content/early/2018/05/22/ascls.118.000331>
132. Forconi F, Moss P. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood.* 30 juill 2015;126(5):573-81.
133. Riches JC, Gribben JG. Immunomodulation and Immune Reconstitution in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Semin Hematol.* juill 2014;51(3):228-34.
134. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell.* mai 2008;133(5):775-87.
135. Pitzalis C, Pipitone N, Bajocchi G, Hall M, Goulding N, Lee A, et al. Corticosteroids inhibit lymphocyte binding to endothelium and intercellular adhesion: an additional mechanism for their anti-inflammatory and immunosuppressive effect. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 mai 1997;158(10):5007-16.
136. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol.* avr 2017;17(4):233-47.
137. Yasir M, Goyal A, Sonthalia S. Corticosteroid Adverse Effects. *StatPearls. Publishing;* 2022 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531462/>
138. Safarini OA, Keshavamurthy C, Patel P. Calcineurin Inhibitors. *StatPearls. Publishing;* 2022 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558995/>
139. Araya AA, Tasnif Y. Tacrolimus. *StatPearls. Publishing;* 2022 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544318/>
140. Villarroel MC, Hidalgo M, Jimeno A. Mycophenolate mofetil: An update. *Drugs Today Barc Spain* 1998. juill 2009;45(7):521-32.
141. Létourneau S, van Leeuwen EMM, Krieg C, Martin C, Pantaleo G, Sprent J, et al. IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor α subunit CD25. *Proc Natl Acad Sci.* 2 févr 2010;107(5):2171-6.
142. Semerano L, Boissier MC. Les anticorps monoclonaux dans les maladies immunes inflammatoires chroniques. *médecine/sciences.* déc 2009;25(12):1108-12.
143. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term « stem cell ». *Cell Stem Cell.* 7 juin 2007;1(1):35-8.
144. Dutkowski P, de Rougemont O, Clavien PA. Alexis Carrel: genius, innovator and ideologist. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* oct 2008;8(10):1998-2003.
145. Williamson CS. FUNCTIONAL SURVIVAL OF AUTOGENOUS AND HOMOGENOUS TRANSPLANTS OF BLOOD VESSELS: An Experimental Study. *Arch Surg.* 1 mai 1947;54(5):529.

146. Jacobson LO, Marks EK, Lorenz E. The hematological effects of ionizing radiations. *Radiology*. mars 1949;52(3):371-95.
147. Becker AJ, McCULLOCH EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 2 févr 1963;197:452-4.
148. Dausset J. The major histocompatibility complex in man. *Science*. 25 sept 1981;213(4515):1469-74.
149. Henig I, Zuckerman T. Hematopoietic stem cell transplantation-50 years of evolution and future perspectives. *Rambam Maimonides Med J*. oct 2014;5(4):e0028.
150. Jansen J. The first successful allogeneic bone-marrow transplant: Georges Mathé. *Transfus Med Rev*. juill 2005;19(3):246-8.
151. Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, Clift RA, Fefer A, Flournoy N, et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood*. avr 1977;49(4):511-33.
152. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet Lond Engl*. 28 déc 1968;2(7583):1366-9.
153. Knudtzon S. In Vitro Growth of Granulocytic Colonies From Circulating Cells in Human Cord Blood. *Blood*. 1 mars 1974;43(3):357-61.
154. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. juill 1984;133(1):157-65.
155. ABM_PG_CSH_Activité_nationale_de_greffe_de_CSH_2020.pdf.
156. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 2 – Hémopathies malignes. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. :169.
157. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 17 nov 2016;7. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00507/full>
158. The biology of graft-versus-host reactions - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4875305/>
159. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer*. mai 2004;4(5):371-80.
160. Zeiser R, Blazar BR. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med*. 30 nov 2017;377(22):2167-79.
161. Aladağ E, Kelkitli E, Göker H. Acute Graft-Versus-Host Disease: A Brief Review. *Turk J Haematol Off J Turk Soc Haematol*. 20 févr 2020;37(1):1-4.

162. Hahn T, McCarthy PL, Zhang MJ, Wang D, Arora M, Frangoul H, et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplants for adults with leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 déc 2008;26(35):5728-34.
163. Jagasia M, Arora M, Flowers MED, Chao NJ, McCarthy PL, Cutler CS, et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 5 janv 2012;119(1):296-307.
164. DeFilipp Z, Alousi AM, Pidala JA, Carpenter PA, Onstad LE, Arai S, et al. Nonrelapse mortality among patients diagnosed with chronic GVHD: an updated analysis from the Chronic GVHD Consortium. *Blood Adv*. 26 oct 2021;5(20):4278-84.
165. Magro L, Forcade E, Giraud C, Granata A, Parquet N, Rohrlich PS, et al. Prise en charge de la maladie du greffon contre l'hôte chronique : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull Cancer (Paris)*. déc 2017;104(12):S145-68.
166. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*. 17 mars 2011;117(11):3214-9.
167. Bosch M, Khan FM, Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation: *Curr Opin Hematol*. juill 2012;19(4):324-35.
168. Storek J. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation – its relation to the contents of the graft. *Expert Opin Biol Ther*. mai 2008;8(5):583-97.
169. Mehta RS, Rezvani K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence*. 16 nov 2016;7(8):901-16.
170. Geddes M, Storek J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. juin 2007;20(2):329-48.
171. Conrad A, Boccard M, Valour F, Alcazer V, Tovar Sanchez AT, Chidiac C, et al. VacHemInf project: protocol for a prospective cohort study of efficacy, safety and characterisation of immune functional response to vaccinations in haematopoietic stem cell transplant recipients. *BMJ Open*. févr 2019;9(2):e026093.
172. Chemaly RF, Ghosh S, Bodey GP, Rohatgi N, Safdar A, Keating MJ, et al. Respiratory viral infections in adults with hematologic malignancies and human stem cell transplantation recipients: a retrospective study at a major cancer center. *Medicine (Baltimore)*. sept 2006;85(5):278-87.
173. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant*. oct 2009;15(10):1143-238.
174. Ljungman P. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Viral status. *Best Pract Res Clin Haematol*. juin 2007;20(2):209-17.
175. Annaloro C, Serpenti F, Saporiti G, Galassi G, Cavallaro F, Grifoni F, et al. Viral Infections in HSCT: Detection, Monitoring, Clinical Management, and Immunologic Implications. *Front Immunol*. 2020;11:569381.

176. Pereira MR, Pouch SM, Scully B. Infections in Allogeneic Stem Cell Transplantation. In: Safdar A, éditeur. *Principles and Practice of Transplant Infectious Diseases*. New York, NY: Springer New York; 2019. p. 209-26. http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9034-4_11
177. Wingard JR, Hsu J, Hiemenz JW. Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infection risks and epidemiology. *Infect Dis Clin North Am*. juin 2010;24(2):257-72.
178. Pereira MR, Pouch SM, Scully B. Infections in Allogeneic Stem Cell Transplantation. In: Safdar A, éditeur. *Principles and Practice of Transplant Infectious Diseases*. New York, NY: Springer; 2019. p. 209-26. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9034-4_11
179. Espinoza JL, Wadasaki Y, Takami A. Infection Complications in Hematopoietic Stem Cells Transplant Recipients: Do Genetics Really Matter? *Front Microbiol*. 2 oct 2018;9:2317.
180. Styczynski J, Reusser P, Einsele H, de la Camara R, Cordonnier C, Ward KN, et al. Management of HSV, VZV and EBV infections in patients with hematological malignancies and after SCT: guidelines from the Second European Conference on Infections in Leukemia. *Bone Marrow Transplant*. mai 2009;43(10):757-70.
181. Balletto E, Mikulska M. Bacterial Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 1 juill 2015;7(1):e2015045.
182. Alonso CD, Treadway SB, Hanna DB, Huff CA, Neofytos D, Carroll KC, et al. Epidemiology and outcomes of *Clostridium difficile* infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. avr 2012;54(8):1053-63.
183. Chuleerarux N, Nematollahi S, Thongkam A, Dioverti MV, Manothummetha K, Torvorapanit P, et al. The association of cytomegalovirus infection and cytomegalovirus serostatus with invasive fungal infections in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. mars 2022;28(3):332-44.
184. Chang J, Powles R, Mehta J, Paton N, Treleaven J, Jameson B. Listeriosis in bone marrow transplant recipients: incidence, clinical features, and treatment. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. nov 1995;21(5):1289-90.
185. Harrington RD, Woolfrey AE, Bowden R, McDowell MG, Hackman RC. Legionellosis in a bone marrow transplant center. *Bone Marrow Transplant*. août 1996;18(2):361-8.
186. Wang X, Patel SA, Haddadin M, Cerny J. Post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation viral reactivations and viremias: a focused review on human herpesvirus-6, BK virus and adenovirus. *Ther Adv Infect Dis*. 1 janv 2021;8:20499361211018028.
187. Zerr DM, Boeckh M, Delaney C, Martin PJ, Xie H, Adler AL, et al. HHV-6 reactivation and associated sequelae after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. nov 2012;18(11):1700-8.
188. Cesaro S, Berger M, Tridello G, Mikulska M, Ward KN, Ljungman P, et al. A survey on incidence and management of adenovirus infection after allogeneic HSCT. *Bone Marrow Transplant*. août 2019;54(8):1275-80.
189. Smatti MK, Al-Sadeq DW, Ali NH, Pintus G, Abou-Saleh H, Nasrallah GK. Epstein–Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front Oncol*. 13 juin 2018;8:211.

190. Liu L, Zhang X, Feng S. Epstein-Barr Virus-Related Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorders After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* juill 2018;24(7):1341-9.
191. Sun Y, Meng F, Han M, Zhang X, Yu L, Huang H, et al. Epidemiology, management, and outcome of invasive fungal disease in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation in China: a multicenter prospective observational study. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* juin 2015;21(6):1117-26.
192. Puerta-Alcalde P, Garcia-Vidal C. Changing Epidemiology of Invasive Fungal Disease in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Fungi.* 10 oct 2021;7(10):848.
193. Rahi MS, Jindal V, Pednekar P, Parekh J, Gunasekaran K, Sharma S, et al. Fungal infections in hematopoietic stem-cell transplant patients: a review of epidemiology, diagnosis, and management. *Ther Adv Infect Dis.* 1 janv 2021;8:20499361211039050.
194. Zuhair M, Smit GSA, Wallis G, Jabbar F, Smith C, Devleeschauwer B, et al. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* mai 2019;29(3):e2034.
195. Boeckh M, Ljungman P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood.* 4 juin 2009;113(23):5711-9.
196. Jerry Teng CL, Wang PN, Chen YC, Ko BS. Cytomegalovirus management after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A mini-review. *J Microbiol Immunol Infect.* 1 juin 2021;54(3):341-8.
197. Laemmle L, Goldstein RS, Kinchington PR. Modeling Varicella Zoster Virus Persistence and Reactivation - Closer to Resolving a Perplexing Persistent State. *Front Microbiol.* 2019;10:1634.
198. Freeman AF, Holland SM. The Hyper IgE Syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am.* mai 2008;28(2):277-viii.
199. Arvey A, Rowe M, Legutki JB, An G, Gollapudi A, Lei A, et al. Age-associated changes in the circulating human antibody repertoire are upregulated in autoimmunity. *Immun Ageing.* 6 oct 2020;17(1):28.
200. Alhadj M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *StatPearls.* Publishing; 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
201. Trofa AF, Klein NP, Paul IM, Michaels MG, Goessler M, Chandrasekaran V, et al. Immunogenicity and safety of an inactivated hepatitis A vaccine when coadministered with Diphtheria-tetanus-acellular pertussis and haemophilus influenzae type B vaccines in children 15 months of age. *Pediatr Infect Dis J.* sept 2011;30(9):e164-169.
202. Hanson KE, Gabriel N, Mchardy I, Hoffmann W, Cohen SH, Welch R, et al. 2031. False-positive Serologic Results attributable to IVIG therapy. *Open Forum Infect Dis.* 26 nov 2018;5(Suppl 1):S591-2.
203. Bright PD, Smith L, Usher J, Donati M, Johnston SL, Gompels MM, et al. False interpretation of diagnostic serology tests for patients treated with pooled human immunoglobulin G infusions: a trap for the unwary. *Clin Med Lond Engl.* avr 2015;15(2):125-9.

204. Suresh J, Kyle BD. Clinical false positives resulting from recent intravenous immunoglobulin therapy: case report. *BMC Infect Dis.* 21 mars 2021;21(1):288.
205. Pinte L, Vergez J, Liou A, Leger JM, Thibault V. Interprétation des tests sérologiques : ne pas oublier le transfert passif des immunoglobulines ! *Presse Médicale.* juill 2016;45(7-8):676-81.
206. Misra A, Theel ES. Immunity to SARS-CoV-2: What Do We Know and Should We Be Testing for It? *J Clin Microbiol.* 7 mars 2022;e0048221.
207. Krammer F. A correlate of protection for SARS-CoV-2 vaccines is urgently needed. *Nat Med.* juill 2021;27(7):1147-8.
208. Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med.* juill 2021;27(7):1205-11.
209. Saker, Pozzeto, Bal, Valette, Fassier, Saade. Are anti-receptor binding domain antibodies still a relevant proxy for monitoring SARS-CoV-2 neutralizing activity in the omicron era ? *Clinical Chemistry.* in press.
210. Reynolds CJ, Swadling L, Gibbons JM, Pade C, Jensen MP, Diniz MO, et al. Discordant neutralizing antibody and T cell responses in asymptomatic and mild SARS-CoV-2 infection. *Sci Immunol.* 23 déc 2020;5(54):eabf3698.
211. Weinberg A, Zhang JH, Oxman MN, Johnson GR, Hayward AR, Caulfield MJ, et al. Varicella-Zoster Virus–Specific Immune Responses to Herpes Zoster in Elderly Participants in a Trial of a Clinically Effective Zoster Vaccine. *J Infect Dis.* 1 oct 2009;200(7):1068-77.
212. Mank V, Brown K. Leukocytosis. *StatPearls. Publishing;* 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560882/>
213. Percival ME, Lai C, Estey E, Hourigan CS. Bone marrow evaluation for diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* juill 2017;31(4):185-92.
214. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 1 nov 2014;6(1):e2014073.
215. Garrido-Rodríguez V, Herrero-Fernández I, Castro MJ, Castillo A, Rosado-Sánchez I, Galvá MI, et al. Immunological features beyond CD4/CD8 ratio values in older individuals. *Aging.* 26 mai 2021;13(10):13443-59.
216. Herold NC, Mitra P. Immunophenotyping. *StatPearls. Publishing;* 2022 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558927/>
217. Stein DS, Korvick JA, Vermund SH. CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review. *J Infect Dis.* févr 1992;165(2):352-63.
218. Volberding PA. HIV Treatment and Prevention: An Overview of Recommendations From the IAS-USA Antiretroviral Guidelines Panel. *Top Antivir Med.* mars 2017;25(1):17-24.

219. Cordonnier C, Einarsdottir S, Cesaro S, Di Blasi R, Mikulska M, Rieger C, et al. Vaccination of haemopoietic stem cell transplant recipients: guidelines of the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis.* 2019;19(6):e200-12.
220. Vaccination des personnes immunodéprimées ou aspléniques. Recommandations. :168.
221. Leijte GP, Rimmelé T, Kox M, Bruse N, Monard C, Gossez M, et al. Monocytic HLA-DR expression kinetics in septic shock patients with different pathogens, sites of infection and adverse outcomes. *Crit Care.* 20 mars 2020;24(1):110.
222. Ladines-Castro W, Barragán-Ibañez G, Luna-Pérez MA, Santoyo-Sánchez A, Collazo-Jaloma J, Mendoza-García E, et al. Morphology of leukaemias. *Rev Médica Hosp Gen México.* 1 avr 2016;79(2):107-13.
223. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* oct 1995;9(10):1783-6.
224. Diks AM, Bonroy C, Teodosio C, Groenland RJ, de Mooij B, de Maertelaere E, et al. Impact of blood storage and sample handling on quality of high dimensional flow cytometric data in multicenter clinical research. *J Immunol Methods.* déc 2019;475:112616.
225. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Acs A, Adam D, Adam-Klages S, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol.* oct 2019;49(10):1457-973.
226. Kowalski RJ, Zeevi A, Mannon RB, Britz JA, Carruth LM. Immunodiagnostics: Evaluation of Functional T-Cell Immunocompetence in Whole Blood Independent of Circulating Cell Numbers. *J Immunotoxicol.* janv 2007;4(3):225-32.
227. Fischer A. Severe combined immunodeficiencies (SCID). *Clin Exp Immunol.* nov 2000;122(2):143-9.
228. Blevins SM, Bronze MS. Robert Koch and the « golden age » of bacteriology. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* sept 2010;14(9):e744-751.
229. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Investig Suppl.* 1968;97:77-89.
230. Maes E, Landuyt B, Mertens I, Schoofs L. Interindividual Variation in the Proteome of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *PLoS ONE.* 11 avr 2013;8(4):e61933.
231. Jahr H, Pfeiffer G, Hering BJ, Federlin K, Bretzel RG. Endotoxin-mediated activation of cytokine production in human PBMCs by collagenase and Ficoll. *J Mol Med Berl Ger.* janv 1999;77(1):118-20.
232. Duffy D, Rouilly V, Braudeau C, Corbière V, Djebali R, Ungeheuer MN, et al. Standardized whole blood stimulation improves immunomonitoring of induced immune responses in multi-center study. *Clin Immunol.* oct 2017;183:325-35.

233. Pösel C, Möller K, Fröhlich W, Schulz I, Boltze J, Wagner DC. Density Gradient Centrifugation Compromises Bone Marrow Mononuclear Cell Yield. Pelacho B, éditeur. PLoS ONE. 6 déc 2012;7(12):e50293.
234. Moris P, Bellanger A, Ofori-Anyinam O, Jongert E, Yarzabal Rodriguez JP, Janssens M. Whole blood can be used as an alternative to isolated peripheral blood mononuclear cells to measure in vitro specific T-cell responses in human samples. J Immunol Methods. mai 2021;492:112940.
235. He D, Yang CX, Sahin B, Singh A, Shannon CP, Oliveria JP, et al. Whole blood vs PBMC: compartmental differences in gene expression profiling exemplified in asthma. Allergy Asthma Clin Immunol. 21 nov 2019;15(1):67.
236. Brodin P, Duffy D, Quintana-Murci L. A Call for Blood—In Human Immunology. Immunity. juin 2019;50(6):1335-6.
237. Palacios R. Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. J Immunol Baltim Md 1950. janv 1982;128(1):337-42.
238. Ceuppens JL, Baroja ML, Lorre K, Van Damme J, Billiau A. Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accessory signal. J Immunol Baltim Md 1950. 1 déc 1988;141(11):3868-74.
239. Krakauer T. Staphylococcal Superantigens: Pyrogenic Toxins Induce Toxic Shock. Toxins. 23 mars 2019;11(3):178.
240. Huber BT, Hsu PN, Sutkowski N. Virus-encoded superantigens. Microbiol Rev. sept 1996;60(3):473-82.
241. Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DYM, Schlievert PM. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. Clin Microbiol Rev. juill 2013;26(3):422-47.
242. Tuffs SW, Haeryfar SMM, McCormick JK. Manipulation of Innate and Adaptive Immunity by Staphylococcal Superantigens. Pathog Basel Switz. 29 mai 2018;7(2):E53.
243. King TC, Upfal M, Gottlieb A, Adamo P, Bernacki E, Kadlecik CP, et al. T-SPOT.TB Interferon- γ Release Assay Performance in Healthcare Worker Screening at Nineteen U.S. Hospitals. Am J Respir Crit Care Med. 1 août 2015;192(3):367-73.
244. Sotgiu G, Saderi L, Petruccioli E, Aliberti S, Piana A, Petrone L, et al. QuantiFERON TB Gold Plus for the diagnosis of tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. J Infect. nov 2019;79(5):444-53.
245. Shafeque A, Bigio J, Hogan CA, Pai M, Banaei N. Fourth-Generation QuantiFERON-TB Gold Plus: What Is the Evidence? J Clin Microbiol. 24 août 2020;58(9):e01950-19.
246. Young HA, Bream JH. IFN-gamma: recent advances in understanding regulation of expression, biological functions, and clinical applications. Curr Top Microbiol Immunol. 2007;316:97-117.
247. Ertel W, Kremer J, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, et al. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. Blood. 1 mars 1995;85(5):1341-7.

248. Millán O, Brunet M. Cytokine-based immune monitoring. *Clin Biochem.* mars 2016;49(4-5):338-46.
249. Zeevi A, Lunz J. Cylex ImmuKnow Cell Function Assay. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2013;1034:343-51.
250. Xue F, Gao W, Qin T, Wu C, Luo Y, Chen J, et al. Immune cell function assays in the diagnosis of infection in pediatric liver transplantation: an open-labeled, two center prospective cohort study. *Transl Pediatr.* févr 2021;10(2):333-43.
251. Notarangelo LD. Functional T cell immunodeficiencies (with T cells present). *Annu Rev Immunol.* 2013;31:195-225.
252. Poujol F, Monneret G, Friggeri A, Rimmelé T, Malcus C, Poitevin-Later F, et al. Flow cytometric evaluation of lymphocyte transformation test based on 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation as a clinical alternative to tritiated thymidine uptake measurement. *J Immunol Methods.* déc 2014;415:71-9.
253. Hemmings O, Kwok M, McKendry R, Santos AF. Basophil Activation Test: Old and New Applications in Allergy. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2018;18(12):77.
254. Boccard M, Albert-Vega C, Mouton W, Durieu I, Brengel-Pesce K, Venet F, et al. Place des tests immunitaires fonctionnels dans la prise en charge du risque infectieux et de la gestion des thérapies immunosuppressives chez les patients immunodéprimés non-VIH. *Rev Médecine Interne.* 1 août 2020;41(8):545-51.
255. Stone KD, Feldman HA, Huisman C, Howlett C, Jabara HH, Bonilla FA. Analysis of in vitro lymphocyte proliferation as a screening tool for cellular immunodeficiency. *Clin Immunol Orlando Fla.* avr 2009;131(1):41-9.
256. Chen Y, Junger WG. Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2012;844:115-24.
257. Kwon WK, Choi S, Kim HJ, Huh HJ, Kang JM, Kim YJ, et al. Flow Cytometry for the Diagnosis of Primary Immunodeficiency Diseases: A Single Center Experience. *Allergy Asthma Immunol Res.* mars 2020;12(2):292-305.
258. Ling M, Murali M. Analysis of the Complement System in the Clinical Immunology Laboratory. *Clin Lab Med.* déc 2019;39(4):579-90.
259. Bryceson YT, Fauriat C, Nunes JM, Wood SM, Björkström NK, Long EO, et al. Functional analysis of human NK cells by flow cytometry. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2010;612:335-52.
260. Valiathan R, Lewis JE, Melillo AB, Leonard S, Ali KH, Asthana D. Evaluation of a flow cytometry-based assay for natural killer cell activity in clinical settings. *Scand J Immunol.* avr 2012;75(4):455-62.
261. Gardiner BJ, Lee SJ, Cristiano Y, Levvey BJ, Sullivan LC, Snell GI, et al. Evaluation of Quantiferon®-Monitor as a biomarker of immunosuppression and predictor of infection in lung transplant recipients. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* juin 2021;23(3):e13550.

262. Tapia-Calle G, Born PA, Koutsoumpli G, Gonzalez-Rodriguez MI, Hinrichs WLJ, Huckriede ALW. A PBMC-Based System to Assess Human T Cell Responses to Influenza Vaccine Candidates In Vitro. *Vaccines*. 13 nov 2019;7(4):E181.
263. Romero-Steiner S, Frasch CE, Carlone G, Fleck RA, Goldblatt D, Nahm MH. Use of opsonophagocytosis for serological evaluation of pneumococcal vaccines. *Clin Vaccine Immunol* CVI. févr 2006;13(2):165-9.
264. Romero-Steiner S, Libutti D, Pais LB, Dykes J, Anderson P, Whitin JC, et al. Standardization of an opsonophagocytic assay for the measurement of functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* using differentiated HL-60 cells. *Clin Diagn Lab Immunol*. juill 1997;4(4):415-22.
265. Becker M, Dulovic A, Junker D, Ruetalo N, Kaiser PD, Pinilla YT, et al. Immune response to SARS-CoV-2 variants of concern in vaccinated individuals. *Nat Commun*. 25 mai 2021;12(1):3109.
266. Nie J, Li Q, Wu J, Zhao C, Hao H, Liu H, et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect*. déc 2020;9(1):680-6.
267. Tan CW, Chia WN, Qin X, Liu P, Chen MIC, Tiu C, et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction. *Nat Biotechnol*. sept 2020;38(9):1073-8.
268. Wong SH, Gao Q, Tsoi KKF, Wu WKK, Tam L shan, Lee N, et al. Effect of immunosuppressive therapy on interferon γ release assay for latent tuberculosis screening in patients with autoimmune diseases: a systematic review and meta-analysis. *Thorax*. janv 2016;71(1):64-72.
269. Wang H, Wang S, Xu L, Mao Y. The Application of T.SPOT-TB Assay for Early Diagnosis of Active Tuberculosis in Chronic Kidney Disease Patients Receiving Immunosuppressive Treatment. *J Investig Surg Off J Acad Surg Res*. oct 2020;33(9):853-8.
270. Doña I, Torres MJ, Montañez MI, Fernández TD. In Vitro Diagnostic Testing for Antibiotic Allergy. *Allergy Asthma Immunol Res*. juill 2017;9(4):288-98.
271. Patel G, Saltoun C. Skin testing in allergy. *Allergy Asthma Proc*. 1 nov 2019;40(6):366-8.
272. Frati F, Incorvaia C, Cavaliere C, Di Cara G, Marcucci F, Esposito S, et al. The skin prick test. *J Biol Regul Homeost Agents*. févr 2018;32(1 Suppl. 1):19-24.
273. Santos AF, Bergmann M, Brough HA, Couto-Francisco N, Kwok M, Panetta V, et al. Basophil Activation Test Reduces Oral Food Challenges to Nuts and Sesame. *J Allergy Clin Immunol Pract*. mai 2021;9(5):2016-2027.e6.
274. Eberlein B, León Suárez I, Darsow U, Ruëff F, Behrendt H, Ring J. A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. mars 2010;40(3):411-8.
275. Tan Y, Tan Y, Li J, Hu P, Guan P, Kuang H, et al. Combined IFN- γ and IL-2 release assay for detect active pulmonary tuberculosis: a prospective multicentre diagnostic study in China. *J Transl Med*. déc 2021;19(1):1-8.
276. Kumar NP, Hissar S, Thiruvengadam K, Banurekha VV, Suresh N, Shankar J, et al. Discovery and Validation of a Three-Cytokine Plasma Signature as a Biomarker for Diagnosis of Pediatric

277. Albert Vega C, Oriol G, Bartolo F, Lopez J, Pachot A, Rimmelé T, et al. Deciphering heterogeneity of septic shock patients using immune functional assays: a proof of concept study. *Sci Rep.* déc 2020;10(1):16136.
278. Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol.* janv 2017;17(1):21-9.
279. Chansard A, Dubrulle N, Poujol de Molliens M, Falanga PB, Stephen T, Hasan M, et al. Unveiling Interindividual Variability of Human Fibroblast Innate Immune Response Using Robust Cell-Based Protocols. *Front Immunol.* 2020;11:569331.
280. Li Y, Oosting M, Deelen P, Ricaño-Ponce I, Smeekens S, Jaeger M, et al. Inter-individual variability and genetic influences on cytokine responses against bacterial and fungal pathogens. *Nat Med.* août 2016;22(8):952-60.
281. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res.* juin 2020;30(6):492-506.
282. Ter Horst R, Jaeger M, Smeekens SP, Oosting M, Swertz MA, Li Y, et al. Host and Environmental Factors Influencing Individual Human Cytokine Responses. *Cell.* 3 nov 2016;167(4):1111-1124.e13.
283. Albert-Vega C, Tawfik DM, Trouillet-Assant S, Vachot L, Mallet F, Textoris J. Immune Functional Assays, From Custom to Standardized Tests for Precision Medicine. *Front Immunol.* 16 oct 2018;9:2367.
284. Urrutia A, Duffy D, Rouilly V, Posseme C, Djebali R, Illanes G, et al. Standardized Whole-Blood Transcriptional Profiling Enables the Deconvolution of Complex Induced Immune Responses. *Cell Rep.* sept 2016;16(10):2777-91.
285. Duffy D, Rouilly V, Libri V, Hasan M, Beitz B, David M, et al. Functional Analysis via Standardized Whole-Blood Stimulation Systems Defines the Boundaries of a Healthy Immune Response to Complex Stimuli. *Immunity.* mars 2014;40(3):436-50.
286. Sahin U, Toprak SK, Atilla PA, Atilla E, Demirer T. An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* août 2016;22(8):505-14.
287. Deenadayalan A, Maddineni P, Raja A. Comparison of whole blood and PBMC assays for T-cell functional analysis. *BMC Res Notes.* 27 mars 2013;6(1):120.
288. Schwarzkopf S, Krawczyk A, Knop D, Klump H, Heinold A, Heinemann FM, et al. Cellular Immunity in COVID-19 Convalescents with PCR-Confirmed Infection but with Undetectable SARS-CoV-2-Specific IgG. *Emerg Infect Dis.* janv 2021;27(1):122-9.
289. Liu J, Chandrashekar A, Sellers D, Barrett J, Jacob-Dolan C, Lifton M, et al. Vaccines elicit highly conserved cellular immunity to SARS-CoV-2 Omicron. *Nature.* mars 2022;603(7901):493-6.
290. Murugesan K, Jagannathan P, Pham TD, Pandey S, Bonilla HF, Jacobson K, et al. Interferon- γ Release Assay for Accurate Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 T-Cell Response. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 9 oct 2020;73(9):e3130-2.

291. Petrone L, Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Najafi Fard S, Alonzi T, et al. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect.* févr 2021;27(2):286.e7-286.e13.
292. O'Brien C, Flower DR, Feighery C. Peptide length significantly influences in vitro affinity for MHC class II molecules. *Immunome Res.* 2008;4:6.
293. Ekeruche-Makinde J, Miles JJ, Berg HA van den, Skowera A, Cole DK, Dolton G, et al. Peptide length determines the outcome of TCR/peptide-MHCI engagement. *Blood.* 14 févr 2013;121(7):1112.
294. Mathiak G, Kabir K, Grass G, Keller H, Steinringer E, Minor T, et al. Lipopolysaccharides from different bacterial sources elicit disparate cytokine responses in whole blood assays. *Int J Mol Med.* janv 2003;11(1):41-4.
295. Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, Banchereau J. Lipopolysaccharides from Distinct Pathogens Induce Different Classes of Immune Responses In Vivo. *J Immunol.* 1 nov 2001;167(9):5067-76.
296. Gutschow MV, Hughey JJ, Ruggero NA, Bajar BT, Valle SD, Covert MW. Single-cell and population NF- κ B dynamic responses depend on lipopolysaccharide preparation. *PLoS One.* 2013;8(1):e53222.
297. Caroff M, Novikov A. Lipopolysaccharides: structure, function and bacterial identification. *OCL.* 2020;27:31.
298. Albert Vega C, Karakike E, Bartolo F, Mouton W, Cerrato E, Brengel-Pesce K, et al. Differential response induced by LPS and MPLA in immunocompetent and septic individuals. *Clin Immunol Orlando Fla.* mai 2021;226:108714.
299. Jing L, Laing KJ, Dong L, Russell RM, Barlow RS, Haas JG, et al. Extensive CD4 and CD8 T-cell cross-reactivity between alphaherpesviruses. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 mars 2016;196(5):2205-18.
300. Tang G, Yuan X, Luo Y, Lin Q, Chen Z, Xing X, et al. Establishing immune scoring model based on combination of the number, function, and phenotype of lymphocytes. *Aging.* 12 mai 2020;12(10):9328-43.
301. Kowalski R, Post D, Schneider MC, Britz J, Thomas J, Deierhoi M, et al. Immune cell function testing: an adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management. *Clin Transplant.* avr 2003;17(2):77-88.
302. Cassaniti I, Ferrari A, Comolli G, Sarasini A, Gregorini M, Rampino T, et al. Characterization of Varicella-Zoster (VZV) Specific T Cell Response in Healthy Subjects and Transplanted Patients by Using Enzyme Linked Immunospot (ELISpot) Assays. *Vaccines.* 6 août 2021;9(8):875.
303. Rondaan C, de Joode AAE, van Assen S, Bos NA, Westerhuis R, Westra J. Increased incidence of herpes zoster in patients on renal replacement therapy cannot be explained by intrinsic defects of cellular or humoral immunity to varicella-zoster virus. *Antiviral Res.* 1 oct 2018;158:206-12.
304. Cassaniti I, Percivalle E, Bergami F, Piralla A, Comolli G, Bruno R, et al. SARS-CoV-2 specific T-cell immunity in COVID-19 convalescent patients and unexposed controls measured by ex vivo ELISpot assay. *Clin Microbiol Infect.* juill 2021;27(7):1029-34.

305. Mah AY, Cooper MA. Metabolic Regulation of Natural Killer Cell IFN- γ Production. *Crit Rev Immunol.* 2016;36(2):131-47.
306. Brissot E, Alsuliman T, Beauvais D, Bonnin A, Mear JB, Souchet L, et al. Prophylaxie antivirale pour le CMV, l'HSV/VZV et le VHB après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques chez l'adulte : recommandations de la Société francophone de greffe de moëlle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull Cancer (Paris).* 1 janv 2020;107(1, Supplement):S1-6.
307. Merindol N, Salem Fourati I, Brito RM, Grenier AJ, Charrier E, Cordeiro P, et al. Reconstitution of protective immune responses against cytomegalovirus and varicella zoster virus does not require disease development in pediatric recipients of umbilical cord blood transplantation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 nov 2012;189(10):5016-28.
308. Jiang YC, Feng H, Lin YC, Guo XR. New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. *Int J Oral Sci.* mars 2016;8(1):1-6.
309. Paouri B, Soldatou A, Petrakou E, Theodosaki M, Tsentidis C, Kaisari K, et al. Quantiferon-Cytomegalovirus assay: A potentially useful tool in the evaluation of CMV-specific CD8+ T-cell reconstitution in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Pediatr Transplant.* août 2018;22(5):e13220.
310. Gao Y, Cai C, Grifoni A, Müller TR, Niessl J, Olofsson A, et al. Ancestral SARS-CoV-2-specific T cells cross-recognize the Omicron variant. *Nat Med.* mars 2022;28(3):472-6.
311. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun.* 8 déc 1997;241(1):92-7.
312. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* juill 2016;22(7):589-93.
313. Gallian P, Berland Y, Olmer M, Raccah D, de Micco P, Biagini P, et al. TT virus infection in French hemodialysis patients: study of prevalence and risk factors. *J Clin Microbiol.* août 1999;37(8):2538-42.
314. Focosi D, Spezia PG, Macera L, Salvadori S, Navarro D, Lanza M, et al. Assessment of prevalence and load of torquetenovirus viremia in a large cohort of healthy blood donors. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 20 janv 2020;
315. De Vlaminc I, Khush KK, Strehl C, Kohli B, Luikart H, Neff NF, et al. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell.* 21 nov 2013;155(5):1178-87.
316. Görzer I, Haloschan M, Jaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E. Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant.* mars 2014;33(3):320-3.
317. Simonetta F, Pradier A, Masouridi-Levrat S, van Delden C, Giostra E, Morard I, et al. Torque Teno Virus Load and Acute Rejection After Orthotopic Liver Transplantation. *Transplantation.* 2017;101(7):e219-21.
318. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect.* juill 2016;22(7):589-93.

319. De Vlaminck I, Khush KK, Strehl C, Kohli B, Luikart H, Neff NF, et al. Temporal Response of the Human Virome to Immunosuppression and Antiviral Therapy. *Cell*. nov 2013;155(5):1178-87.
320. Freer G, Maggi F, Pifferi M, Di Cicco ME, Peroni DG, Pistello M. The Virome and Its Major Component, Anellovirus, a Convuluted System Molding Human Immune Defenses and Possibly Affecting the Development of Asthma and Respiratory Diseases in Childhood. *Front Microbiol*. 2018;9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00686>
321. Reza Hosseini O, Drabe CH, Sørensen SS, Rasmussen A, Perch M, Ostrowski SR, et al. Torque-Teno virus viral load as a potential endogenous marker of immune function in solid organ transplantation. *Transplant Rev*. juill 2019;33(3):137-44.
322. Mitchell AB, Glanville AR. Kinetics of TTV-DNA Plasma Load: A Global Measure of Immune Suppression? *Transplantation*. avr 2019;103(4):660-1.
323. Fernández-Ruiz M. Torque Teno virus load as a surrogate marker for the net state of immunosuppression: The beneficial side of the virome. *Am J Transplant*. 2020;20(8):1963-4.
324. Doberer K, Schiemann M, Strassl R, Hauptenthal F, Dermuth F, Görzer I, et al. Torque teno virus for risk stratification of graft rejection and infection in kidney transplant recipients—A prospective observational trial. *Am J Transplant*. 8 mars 2020;ajt.15810.
325. Maggi F, Focosi D, Stazu M, Bianco G, Costa C, Macera L, et al. Early Post-Transplant Torquetenovirus Viremia Predicts Cytomegalovirus Reactivations In Solid Organ Transplant Recipients. *Sci Rep*. 19 oct 2018;8(1):15490.
326. Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, Ruiz-Merlo T, Parra P, López-Medrano F, et al. Monitoring of alphatorquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. avr 2019;19(4):1139-49.
327. Strassl R, Schiemann M, Doberer K, Görzer I, Puchhammer-Stöckl E, Eskandary F, et al. Quantification of Torque Teno Virus Viremia as a Prospective Biomarker for Infectious Disease in Kidney Allograft Recipients. *J Infect Dis*. 8 sept 2018;218(8):1191-9.
328. Pradier A, Masouridi-Levrat S, Bosshard C, Dantin C, Vu DL, Zanella MC, et al. Torque Teno Virus as a Potential Biomarker for Complications and Survival After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2020;11:998.
329. Gilles R, Herling M, Holtick U, Heger E, Awerkiew S, Fish I, et al. Dynamics of Torque Teno virus viremia could predict risk of complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. oct 2017;206(5):355-62.
330. Wohlfarth P, Leiner M, Schoergenhofer C, Hopfinger G, Goerzer I, Puchhammer-Stoeckl E, et al. Torquetenovirus Dynamics and Immune Marker Properties in Patients Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Prospective Longitudinal Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. janv 2018;24(1):194-9.
331. Schmitz J, Kobbe G, Kondakci M, Schuler E, Magorsch M, Adams O. The Value of Torque Teno Virus (TTV) as a Marker for the Degree of Immunosuppression in Adult Patients after Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT). *Biol Blood Marrow Transplant*. nov 2019;S1083879119307426.

332. Albert E, Solano C, Giménez E, Focosi D, Pérez A, Macera L, et al. The kinetics of torque teno virus plasma DNA load shortly after engraftment predicts the risk of high-level CMV DNAemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* févr 2018;53(2):180-7.