



HAL
open science

Réponse vaccinale, immunité anti-infectieuse et reconstitution immunitaire après greffe de cellules souches hématopoïétiques

Anne Conrad

► **To cite this version:**

Anne Conrad. Réponse vaccinale, immunité anti-infectieuse et reconstitution immunitaire après greffe de cellules souches hématopoïétiques. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. NNT : 2022LYO10025 . tel-04747762

HAL Id: tel-04747762

<https://theses.hal.science/tel-04747762v1>

Submitted on 22 Oct 2024

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.



**THESE de DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale N° 341
EVOLUTION ECOSYSTEMES MICROBIOLOGIE MODELISATION**

Discipline :
Maladies infectieuses, recherche clinique, innovation technologique

Soutenue publiquement le 27/09/2022

Par

Anne CONRAD

**Réponse vaccinale, immunité anti-infectieuse et
reconstitution immunitaire après greffe de cellules souches
hématopoïétiques**

Devant le jury composé de :

Pr Charles CAZANAVE

Dr Emmanuel FAURE

Pr Odile LAUNAY

Pr Yves GILLET

Pr Florence ADER

Dr Sophie ASSANT

Pr Elisabeth BOTELHO-NEVERS

Université de Bordeaux

Université de Lille

Université de Paris Cité

Université Claude Bernard Lyon I

Université Claude Bernard Lyon I

Hospices Civils de Lyon

Université de Saint-Etienne

Rapporteur

Rapporteur

Présidente

Examineur

Directrice de thèse

Co-Directrice de thèse

Membre invitée

Remerciements

Aux membres du jury. Je suis honorée que vous ayez accepté de juger ce travail et je vous remercie du temps que vous y avez consacré.

Au Pr Odile Launay, par votre expertise dans le domaine de la vaccination, vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je vous en remercie sincèrement.

Au Pr Charles Cazanave et au Dr Emmanuel Faure, je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de relire attentivement ce travail.

Aux Pr Yves Gillet et Pr Elisabeth Botelho-Nevers, merci d'avoir accepté avec enthousiasme de participer à cette soutenance.

Au Dr Sophie Assant, je te remercie sincèrement pour ton investissement (à fond !) tout au long du projet VaccHemInf-FIGHT.

J'espère que nous pourrons travailler ensemble à l'avenir.

Au Pr Florence Ader. Tu as fait tellement plus que diriger cette thèse. Je te remercie infiniment de ta confiance et de ton accompagnement depuis tant d'années déjà, avec dévouement et patience. Merci d'avoir su accepter mes défauts (mot-clé : tête de mule germano-basque), de me faire sortir de ma zone de confort et de me faire progresser continuellement dans cette aventure médicale, scientifique et humaine qu'est la voie hospitalo-universitaire.

A tous ceux sans qui ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

Je remercie chaleureusement tous les **médecins du service d'hématologie** du CHLS qui m'ont fait découvrir le monde passionnant de l'allogreffe de CSH et qui nous confient leurs patients au quotidien. Cette thèse est le fruit de cette collaboration.

Merci au **groupe VaccHemInf** et à l'ensemble des cliniciens et biologistes de l'Institut des Agents Infectieux, du laboratoire d'immunologie et du CRB-Sud des HCL qui rendent ce travail possible.

Un immense merci à toi, **William**. Nous avons mené nos thèses respectives en parallèle, traversé moments d'adversité et de bonheur. Notre confiance mutuelle et notre complicité ont grandi tout au long du projet VaccHemInf-FIGHT. Comment te remercier pour les heures passées au cytomètre, sur les analyses Nanostring... Merci pour ta motivation, ta patience et ta rigueur. J'espère que de nombreux projets collaboratifs nous attendent à l'avenir – promis, sans Click-it.

Le projet VaccHemInf-FIGHT a démarré avec toi, **Mathilde**. Je te suis reconnaissante pour toute l'énergie que tu y as mis.

Merci aux Prs Jarraud et Doublet, d'avoir accepté que je mène cette thèse au sein de **l'équipe Legiopath du CIRI**, alors que le mot *Legionella* n'apparaît pas dans ce travail.

A l'ensemble des membres du **LCR HCL-bioMérieux** et en particulier Karen Brengel-Pesce et Christelle, qui m'ont toujours agréablement accueillie au sein du laboratoire.

A **Vincent**, pour ton input hématologique et ton aide statistique et bio-info.

Aux **ARC** du projet VacHemInf-FIGHT et en particulier à Sophie Leclercq, aux infirmières de la consultation d'hématologie pour avoir assuré la logistique (et plus !) de l'étude.

J'exprime ma gratitude aux **HCL**, à la **SPILF** et à la **Région Auvergne-Rhône-Alpes** qui à travers leurs financements ont permis la réalisation de ce travail.

A tous les patients qui nous témoignent leur confiance en participant aux protocoles vaccinaux.

Je souhaite que les résultats de ce travail puissent contribuer à améliorer la prise en charge des receveurs d'allogreffe.

Merci aux **membres de mon comité de suivi de thèse**, aux Prs Olivier Epaulard, Philippe Vanhems et Karine Faure, pour vos conseils judicieux lors des comités de pilotage.

A tous ceux qui m'ont formée à la recherche et qui m'ont encouragée à poursuivre dans cette voie – vous vous reconnaissez – je vous remercie d'avoir été et d'être là.

A Florent, merci infiniment de ta bienveillance, ton écoute, tes précieux conseils et ton amitié.

A mes collègues et amis du Service des Maladies Infectieuses et Tropicales. Vous êtes une équipe en or qu'il fait bon de retrouver tous les matins. Merci de vos encouragements, votre solidarité et de m'avoir donné du temps pour mener à bien ce travail.

A mes amis.

Même si nous n'avons pas souvent l'occasion de nous voir, merci pour votre amitié. Merci d'avoir écouté mes doutes et toujours su me remotiver.

Mention spéciale pour Marion, Delphine et Nicolas, qui chacun à leur façon m'ont servi d'exemple et m'ont poussée plus loin, et pour la plus géniale Fille du Calvaire.

A ma famille.

De Malène à Jona, de Bourgbarré à Meyzieu, merci d'être simplement là, en toute circonstance. Merci pour les moments partagés et tout ce que vous m'apportez.

A Julien, pour ton soutien indéfectible. Sans toi, je n'aurais jamais pu accomplir tout cela.

A Aglaé, pour ta joie de vivre et pour rappeler tous les jours à ta maman ce qui est vraiment important.

Table des matières

Remerciements	2
Table des illustrations.....	6
Résumé.....	7
Abstract	8
Mots-clés / keywords (MeSH terms).....	9
Abréviations	10
I. Introduction et revue bibliographique	12
1. Principes généraux de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	12
1.1. Rappels historiques concernant l'allogreffe de CSH	13
1.2. Épidémiologie de l'activité d'allogreffe de CSH	14
1.3. Pronostic après allogreffe de CSH	16
1.4. La reconstitution immunitaire après allogreffe de CSH	20
a. Chronologie de la reconstitution immunitaire	21
i. Immunité innée	22
ii. Immunité adaptative : lymphocytes T.....	23
iii. Immunité adaptative : lymphocytes B	25
iv. Hyposplénie fonctionnelle après allogreffe de CSH	28
b. Facteurs influençant la reconstitution lymphocytaire	28
c. Reconstitution immunitaire et pronostic après allogreffe de CSH	30
d. Outils de mesure de la reconstitution immunitaire	31
1.5. Le risque infectieux après allogreffe de CSH	33
a. Données épidémiologiques concernant les infections après allogreffe de CSH	33
b. Chronologie du risque infectieux après allogreffe de CSH.....	35
c. Prévention du risque infectieux après allogreffe de CSH.....	37
2. Vaccination après allogreffe de CSH	41
2.1. Les grands principes de la vaccination après allogreffe de CSH.....	41
2.2. Recommandations nationales et internationales de revaccination.....	43
2.3. Couverture vaccinale après allogreffe de CSH	46
2.4. Optimisation de la revaccination après allogreffe de CSH	48
II. Problématique, hypothèses et objectifs du travail de thèse.....	50
III. Publications et travaux personnels	52
1. Premier article : état des lieux de la vaccination après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	52
2. Deuxième article : réponse vaccinale et tolérance du vaccin combiné pédiatrique penta- ou hexavalent chez l'adulte receveur d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.....	67
3. Troisième article : étude VaccHemInf-FIGHT	81
3.1. Publication : protocole de l'étude VaccHemInf-FIGHT.....	85

3.2.	Avancement de l'étude et résultats préliminaires	95
a.	Réponse vaccinale et reconstitution immunitaire après allogreffe de CSH.....	96
b.	Réponse vaccinale et reconstitution immunitaire après autogreffe de CSH	107
4.	Quatrième article : intérêt d'un « IGRA » transcriptomique pour évaluer la reconstitution d'une immunité cellulaire spécifique du VZV après allogreffe de CSH	110
IV.	Discussion générale.....	127
V.	Conclusion et perspectives.....	137
VI.	Bibliographie	139
VII.	Annexes	163
1.	Annexe 1 : Transcriptomic analysis reveals distinct profiles of functional immune reconstitution at six-months after allo-HSCT	164
2.	Annexe 2 : Torque Teno Virus Viral Load as a Marker of Immune Function in Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients.....	178

Table des illustrations

Figure 1. Evolution du nombre d'allogreffes de cellules souches hématopoïétiques en France selon le type de donneur	15
Figure 2. Répartition des indications d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques en Europe en 2019	15
Figure 3. Evolution de la probabilité de survie globale d'adultes receveurs d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques pour leucémie aiguë myéloblastique selon la période.	19
Figure 4. Reconstitution immunitaire après allogreffe de cellules souches périphériques après conditionnement myélo-ablatif	21
Figure 5. Reconstitution lymphocytaire T après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques .	24
Figure 6. Facteurs influençant la reconstitution immunitaire après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.	30
Figure 7. Les trois phases du risque infectieux après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	35
Figure 8. Calendrier vaccinal après greffe de cellules souches hématopoïétiques	44
Figure 9. Algorithme proposé par Carpenter & Englund pour décider de l'opportunité d'une revaccination précoce.	49
Figure 10. Schéma de l'étude VaccHemInf-FIGHT	82
Figure 11. Diagramme de flux des receveurs de greffe de CSH inclus dans l'étude VaccHemInf-FIGHT	95
Figure 12. Proportion de receveurs d'allogreffe de CSH séroprotégés à l'inclusion (V1) et lors de la première visite post-vaccinale (V2, après 3 doses du vaccin combiné pédiatrique hexavalent)	97
Figure 13. Evolution des concentrations d'anticorps spécifiques chez des receveurs d'allo-CSH vaccinés par 3 doses du vaccin combiné pédiatrique hexavalent	98
Figure 14. Evolution des numérations des lymphocytes totaux et principales sous-populations lymphocytaires entre l'inclusion (V1, bleu) et la première visite post-vaccinale (V2, violet) chez 109 receveurs d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	100
Figure 15. Réponse proliférative et sécrétion d'IFN-γ après stimulation de PBMC par la PHA	101
Figure 16. Concentrations d'anticorps anti-HBs mesurées avant (V1) et après (V2) vaccination chez des receveurs d'allogreffe de CSH en fonction de la maladie sous-jacente, de la source cellulaire, de la présence d'une GvHD chronique, d'un traitement par photochimiothérapie extracorporelle, par immunosuppresseurs ou par IgIV	103
Figure 17. Réponse proliférative et sécrétion d'IFN-γ après stimulation de PBMC par du vaccin anti-tétanique.	105
Figure 18. Proportion de receveurs d'autogreffe de CSH séroprotégés	108
Figure 19. Evolution des concentrations d'anticorps spécifiques chez des receveurs d'auto-CSH vaccinés par 3 doses du vaccin combiné pédiatrique hexavalent	109
Tableau 1. Recommandations nationales et internationales de revaccination des adolescents et adultes receveurs d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	44
Tableau 2. Caractéristiques démographiques et hématologiques des receveurs d'allo-CSH à l'inclusion	96
Tableau 3. Evolution des marqueurs de reconstitution immunitaire entre l'inclusion (V1) et la première visite post-vaccinale (V2) chez 109 receveurs d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	99
Tableau 4. Caractéristiques démographiques, hématologiques et état d'avancement de la reconstitution immunitaire des receveurs d'auto-CSH à l'inclusion.	107

Résumé

Au cours de la phase de reconstitution immunitaire suivant l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-CSH), la revaccination complète des receveurs d'allo-CSH est recommandée. Peu de données existent concernant l'immunogénicité et la tolérance du schéma vaccinal recommandé. Entre 2014 et 2021, nous avons conduit successivement deux études de cohorte prospectives monocentriques (VacHemInf) parmi des adultes receveurs d'allo-CSH (n=106 et n=109), vaccinés conformément aux recommandations et suivis pendant 2 ans. Dans le cadre de ce travail, nous présentons les résultats concernant la réponse au schéma vaccinal comportant 3+1 doses du vaccin combiné pédiatrique hexavalent et ses déterminants. Les taux de séroprotection obtenus à l'issue du schéma vaccinal étaient élevés pour les valences tétanos (>95%), diphtérie (>90%) et *Haemophilus influenzae* de type b (>85%), plus faibles pour la valence hépatite B (environ 80%). La source cellulaire, le type de donneur, l'antécédent de maladie du greffon contre l'hôte chronique, le traitement par photochimiothérapie extracorporelle et la numération de lymphocytes T CD4+ naïfs influençaient le niveau d'anticorps mesuré après primovaccination, de façon différentielle selon la valence examinée. Après administration de la 4^{ème} dose, l'effet de ces caractéristiques sur le niveau d'anticorps mesuré n'était plus observé, soulignant l'importance de cette dose de rappel pour une protection vaccinale efficace et durable chez tous les receveurs d'allo-CSH. La vaccination était bien tolérée. Ces données suggèrent que le schéma vaccinal comportant 3+1 doses de vaccin combiné pédiatrique est adapté à l'immunisation des adultes receveurs d'allo-CSH, sauf pour la valence hépatite B, dont l'immunogénicité devrait être optimisée par l'emploi de schémas vaccinaux adaptés à l'âge et à l'immunodépression des patients. Dans la seconde partie de ce travail, nous avons étudié la reconstitution d'une immunité cellulaire spécifique du virus varicelle zona (VZV) au moyen de trois tests de fonctionnalité immunitaire. Nos résultats suggèrent qu'environ un quart des receveurs d'allo-CSH à 6 mois post-greffe sont capables de répondre à une stimulation antigénique *ex vivo* par le VZV et que cette immunité cellulaire spécifique peut être estimée à partir d'un test innovant basé sur la quantification de l'ARNm de l'interféron- γ après 24h de stimulation d'un échantillon de sang total. Le développement d'outils d'immunomonitoring évaluant la réponse immunitaire spécifique de pathogènes opportunistes et d'antigènes vaccinaux ouvre la voie à une amélioration des stratégies de prophylaxie anti-infectieuse et vaccinale chez les patients immunodéprimés, dans le cadre d'une médecine personnalisée.

Abstract

During immune reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), complete revaccination of allo-HSCT recipients is recommended. Few data exist regarding the immunogenicity and safety of the recommended vaccine regimen. Between 2014 and 2021, we successively conducted two single-center prospective cohort studies (VacHemInf) among adult allo-HSCT recipients (n=106 and n=109), vaccinated according to current guidelines and followed for 2 years. We herein present data regarding humoral response to the (3+1)-dose regimen of hexavalent pediatric combination vaccine and its determinants. The seroprotection rates obtained at the end of the vaccination schedule were high for tetanus (>95%), diphtheria (>90%) and *Haemophilus influenzae* type b (>85%), lower for hepatitis B (around 80%). Stem cell source, donor type, history of chronic graft-versus-host disease, treatment with extracorporeal photochemotherapy and naive CD4+ T-cell count differentially influenced the level of antibodies measured after primary vaccination depending on the valency examined. After the 4th dose, the effect of these characteristics on the antibody level was no longer observed, underlining the importance of this booster dose for effective and long-lasting vaccine protection in allo-HSCT recipients. The vaccination was well tolerated. These data suggest that the (3+1)-dose regimen of pediatric combination vaccine is suitable for the immunization of adult allo-HSCT recipients, except for the hepatitis B valence, whose immunogenicity should be optimized by using vaccine regimens adapted to the age and immunosuppression of patients. In the second part of this work, we investigated the reconstitution of varicella zoster virus (VZV) specific cell-mediated immunity by three immune functional assays. Our results suggest that approximately one quarter of allo-HSCT recipients at 6 months post-transplant are able to respond to *ex vivo* antigenic stimulation by VZV, and that VZV-specific CMI can be estimated from an innovative assay based on the quantification of interferon- γ mRNA after 24h of stimulation of a whole blood sample. The development of immunomonitoring tools assessing the immune response to opportunistic pathogens and vaccine antigens opens the way to improved anti-infective and vaccine-based prophylactic strategies in immunocompromised patients, in a personalized medicine approach.

Mots-clés / keywords (MeSH terms)

Greffe de cellules souches hématopoïétiques

Reconstitution immunitaire

Vaccination

Vaccin combiné pédiatrique

Vaccin contre l'hépatite B

Test de fonctionnalité immunitaire

IGRA

Virus varicelle zona

Hematopoietic stem cell transplantation

Immune reconstitution

Vaccination

Pediatric combination vaccine

Hepatitis B vaccine

Immune Functional Assay

Interferon-Gamma Release Assay

Varicella zoster virus

Abréviations

allo-CSH	allogreffe de cellules souches hématopoïétiques
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATG	<i>anti-thymocyte globulin</i> , sérum anti-lymphocytaire
auto-CSH	autogreffe de cellules souches hématopoïétiques
BCR	<i>B-Cell Receptor</i> , récepteur des lymphocytes B
BGN	bacille à Gram négatif
Ca	coqueluche (valence vaccinale)
CAR-T	<i>chimeric antigen receptor T cells</i> , lymphocytes T à récepteur antigénique chimérique
CGP	cocci à Gram positif
CIBMTR	<i>Center for International Blood and Marrow Transplant Research</i>
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i>
CSH	cellules souches hématopoïétiques
CSP	cellules souches périphériques
D	diphthérie (valence vaccinale)
D	donneur (sérostatut)
EBMT	<i>European Society for Blood and Marrow Transplantation</i>
EBV	virus Epstein-Barr
ECIL	<i>European Conference on Infections in Leukemia</i>
EdU	5-éthynyl-2'-deoxyuridine
ELISpot	<i>Enzyme-Linked Immunospot</i>
FIGHT	<i>Fonctionnalité Immunitaire après Greffe de cellules souches Hématopoïétiques</i>
GMC	concentration moyenne géométrique
GMFR	<i>geometric mean fold rise</i>
GvHD	<i>graft-versus-host disease</i> , maladie du greffon contre l'hôte
GVL	<i>graft-versus-leukemia</i> , effet du greffon contre la leucémie
HBs	antigène de surface du virus de l'hépatite B
HBV	hépatite B (valence vaccinale)
HCL	Hospices Civils de Lyon
HCSP	Haut Conseil de Santé Publique
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> de type b
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HPE	<i>homeostatic peripheral expansion</i> , expansion homéostatique périphérique
HSV	Herpès Simplex Virus
ICS	<i>intracellular cytokine staining</i>
IC95	intervalle de confiance à 95%
IFA	<i>immune functional assay</i> , test de fonctionnalité immunitaire
IFI	infection fongique invasive
IFN- γ / <i>ifn-γ</i>	interféron- γ (protéine/gène)
Ig	immunoglobuline
IgIV	immunoglobulines intraveineuses polyvalentes
IGRA	<i>Interferon-Gamma Release Assay</i>
IIV3	vaccin antigrippal inactivé trivalent
IL	interleukine

IQR	intervalle interquartile
KREC	<i>kappa-deleting recombination excision circles</i>
LB	lymphocyte B
LPS	lipopolysaccharide
LT	lymphocyte T
NK	natural killer
OR	odds ratio
P	poliomyélite (valence vaccinale)
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , cellules mononucléées du sang périphérique
PHA	phytohémagglutinine
PNN	polynucléaire neutrophile
PTLD	<i>post-transplant lymphoproliferative disease</i> , syndrome lymphoprolifératif post-greffe
R	receveur (sérostatut)
RC1	première rémission complète
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROR	rougeole-oreillons-rubéole (valences vaccinales)
SARS-CoV-2	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SEB	entérotoxine staphylococcique B
sjTREC	<i>signal joint T-cell receptor excision circles</i>
T	tétanos (valence vaccinale)
TBE	<i>tick-born encephalitis</i> , encéphalite à tiques
TCR	<i>T-Cell Receptor</i> , récepteur des lymphocytes T
TEMRA	lymphocyte T à mémoire en différenciation terminale
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TRM	<i>treatment-related mortality</i> , mortalité reliée à la procédure de transplantation
TTV	Torque Teno Virus
UI/IU	Unités Internationales
USP	unité(s) de sang placentaire
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VPC-7/-13	vaccin antipneumococcique polysaccharidique conjugué à 7/13 valences
VPP-23	vaccin antipneumococcique polysaccharidique à 23 valences
VRS	Virus Respiratoire Syncytial
VZV	virus varicelle zona
WBMT	<i>Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation</i>

I. Introduction et revue bibliographique

1. Principes généraux de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-CSH) est une immunothérapie cellulaire adoptive qui a révolutionné la prise en charge et le pronostic des hémopathies. Hautement spécialisée, elle demeure à ce jour le traitement de choix d'un certain nombre d'hémopathies malignes (leucémies aiguës myéloblastiques, syndromes myélodysplasiques etc.) et de maladies génétiques impliquant des lignées cellulaires issues de la moelle osseuse (déficits immunitaires primitifs, hémoglobinopathies etc.).

Schématiquement, elle consiste à éradiquer les cellules souches hématopoïétiques (CSH) malades du receveur à l'aide d'une radio-chimiothérapie plus ou moins intensive, appelée conditionnement, suivie de l'infusion des CSH du donneur sain. La destruction de la moelle osseuse et du système immunitaire du receveur est en effet nécessaire pour éviter le rejet de greffe et permettre la prise du greffon provenant du donneur. A la prise de greffe, les CSH du donneur se différencient pour produire les différents éléments figurés du sang – plaquettes, globules rouges et globules blancs, support du système immunitaire inné et adaptatif. Dans le cadre des affections malignes, la réussite de l'allo-CSH repose sur l'obtention d'un état de « chimérisme » total donneur, quand les composants cellulaires du système immunitaire dérivent exclusivement des CSH du donneur et éliminent les cellules malades du receveur. Cette réaction immunitaire allogénique correspond à l'effet « *graft-versus-leukemia* » (GvL).

Les procédures d'allo-CSH se distinguent par :

- le type de conditionnement : « myélo-ablatif » ou « d'intensité réduite » ;
- le type de donneur, en fonction de sa proximité génétique déterminé par le typage HLA (pour *human leukocyte antigen*), support génétique du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) :
 - donneur apparenté géno-identique (HLA identique),
 - donneur non apparenté phéno-identique (avec éventuellement une seule incompatibilité HLA),
 - ou donneur apparenté haplo-identique (partageant seulement un haplotype HLA avec le receveur) ;
- la source cellulaire :
 - moelle osseuse prélevée sous anesthésie générale au niveau des crêtes iliaques,
 - cellules souches périphériques (CSP) collectées par prise de sang après mobilisation par des facteurs de croissance, principale source cellulaire de nos jours (1),

- ou encore unités de sang placentaire (USP, de moins en moins utilisées, grâce au recours aux donneurs alternatifs haplo-identiques) ;
- et enfin les immunosuppresseurs administrés en pré- et post-greffe pour prévenir le rejet de greffe et la maladie du greffon contre l'hôte.

1.1. Rappels historiques concernant l'allogreffe de CSH

La première description d'une transfusion de moelle osseuse, prélevée sur un donneur sain, à une jeune patiente souffrant d'aplasie médullaire remonte à 1939, par Edwin Osgood et al. (2). Bien que cette procédure ne permît pas de relancer l'hématopoïèse chez cette patiente qui décéda d'insuffisance médullaire quelques semaines plus tard, aucune réaction indésirable n'était constatée.

Par la suite, c'est la volonté de trouver un traitement curatif de l'insuffisance médullaire secondaire aux accidents d'irradiation et à la chimiothérapie qui fit progresser la recherche sur les greffes de CSH, d'abord dans des modèles animaux puis chez l'homme. Edward Donnall Thomas, en 1957, fût le premier à infuser de la moelle osseuse à des patients atteints de leucémie aiguë. Il démontra que la moelle osseuse prélevée sur un donneur et administrée par voie intraveineuse à des receveurs atteints de leucémie ou de myélome multiple, irradiés et prétraités par chimiothérapie, « prenait », n'était pas rejetée par l'organisme du receveur et permettait, transitoirement, la production de globules blancs et rouges, bien que ces patients finalement décédèrent (3).

Le perfectionnement de cette procédure par E. Thomas et ses collègues du futur Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle, Etats-Unis) dans les années 1960, conjugué à la découverte du complexe d'histocompatibilité majeur puis la meilleure compréhension du système HLA, ouvrirent la voie aux premières allo-CSH fructueuses (4). Ainsi, furent rapportées en 1968 les premières allogreffes réussies chez des patients atteints de déficits immunitaires primitifs, puis, au début des années 1970, chez des patients atteints d'aplasie médullaire ou de leucémie aiguë, mis en rémission complète (5–9). E. Thomas fût récompensé en 1990 pour ces travaux majeurs par le Prix Nobel de Médecine ou Physiologie (10).

Au-delà de la destruction du clone cellulaire malade par la radio-chimiothérapie et son remplacement par des CSH saines, la procédure d'allo-CSH est une immunothérapie adoptive

active dont le succès repose sur la réaction immunitaire allogénique des cellules immunitaires dérivées du donneur contre les cellules du receveur.

Ainsi fût observée, d'abord chez la souris puis chez l'homme, une complication immunologique de l'allo-CSH appelée « syndrome secondaire » et désormais connue sous le nom de maladie du greffon contre l'hôte (ou GvHD, acronyme anglophone pour *graft-versus-host disease*) (11,12). Georges Mathé, pionnier de l'allo-CSH en France, et ses collègues observèrent que certains de leurs patients atteints de leucémie aiguë allogreffés qui développèrent une GvHD sévère (voire mortelle) étaient en rémission complète (13).

Mathé est à l'origine du concept de l'effet GvL, clé du succès de l'allo-CSH (12) : la guérison des hémopathies malignes repose sur l'éradication des cellules malades (qui demeurent dans l'organisme du receveur après le conditionnement) par les cellules immunitaires dérivées des CSH du donneur, grâce à l'obtention d'un chimérisme total donneur. Aujourd'hui, on sait que cette réaction allogénique dirigée contre les cellules tumorales et les tissus sains du receveur est due à la différence antigénique du CMH mais aussi à des disparités d'antigènes mineurs d'histocompatibilité entre donneur et receveur.

Depuis, l'évolution constante des procédures (protocoles de conditionnement, types de donneur et de source cellulaire) et les progrès permanents concernant la prévention et le traitement des complications de l'allo-CSH ont fait de l'allo-CSH le traitement de référence des hémopathies myéloïdes malignes.

1.2. Épidémiologie de l'activité d'allogreffe de CSH

D'après le *Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation* (WBMT ; www.wbmt.org), environ 560 000 allo-CSH ont été réalisées dans le monde entre 1957 et 2016, dont 38 425 pour la seule année de 2016, avec une activité d'allo-CSH en augmentation au niveau mondial de +7%/an (14).

En Europe, la *European Society for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) a comptabilisé 19 798 allo-CSH en 2019 (+0,4%/an) (1).

En France enfin, d'après les données de l'Agence de la Biomédecine, 1 878 allo-CSH ont été réalisées chez 1 857 patients en 2020 (15). L'activité globale d'allo-CSH est relativement stable depuis 8 ans mais se modifie progressivement en ce qui concerne les types de donneur, avec un recours de plus en plus fréquent aux donneurs apparentés haplo-identiques (Figure 1).

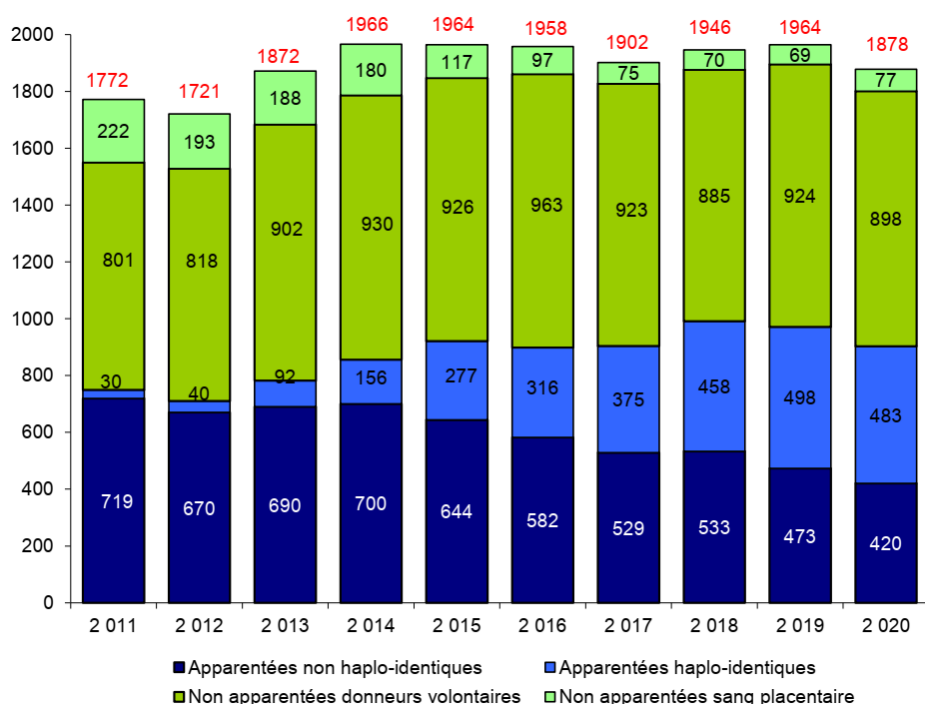


Figure 1. Evolution du nombre d'allogreffes de cellules souches hématopoïétiques en France selon le type de donneur. D'après l'Agence de la Biomédecine (15).

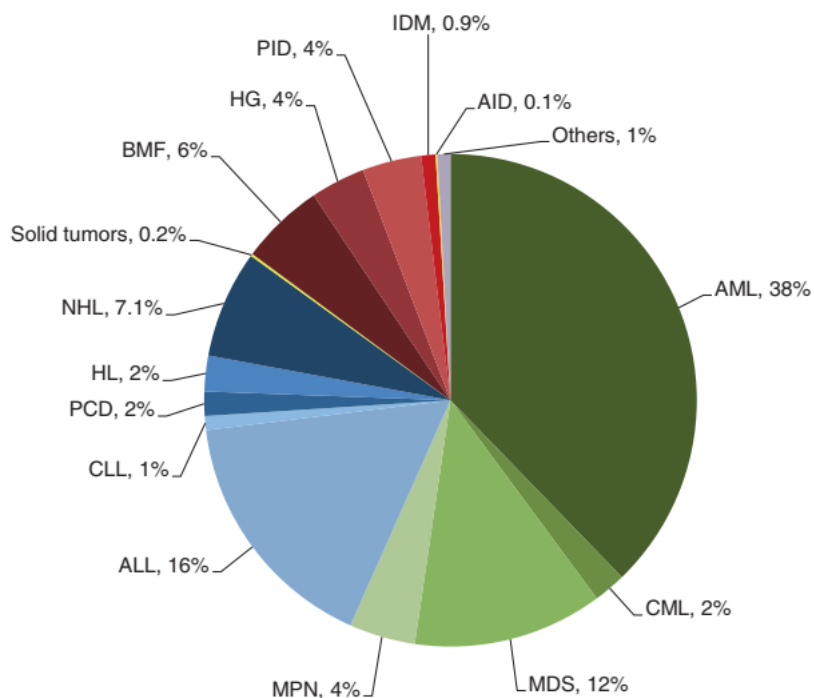


Figure 2. Répartition des indications d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques en Europe en 2019. D'après Passweg et al. (1). [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

La leucémie aiguë myéloblastique est la principale indication d'allo-CSH en Europe (38% des allo-CSH réalisées), devant la leucémie aiguë lymphoblastique (16%) et les syndromes myélodysplasiques (12%) (1) (Figure 2).

Avec l'avènement de nouvelles thérapies ciblées et d'immunothérapies adoptives transgéniques, en particulier du traitement par CAR-T cells (acronyme anglophone pour *chimeric antigen receptor T cells*), un changement des indications d'allo-CSH pour les hémopathies notamment lymphoïdes est attendu dans les années à venir (16).

1.3. Pronostic après allogreffe de CSH

Bien que les 200 premiers patients ayant reçu une allo-CSH entre les années 1957 et 1967 aient tous succombé à des complications liées à la procédure et/ou à la rechute de la maladie sous-jacente, le potentiel thérapeutique de l'allo-CSH fût reconnu (4,17). Les procédures d'allo-CSH se sont ensuite progressivement généralisées et continuellement améliorées à partir des années 1970, bouleversant dès lors le pronostic des hémopathies autrefois mortelles, en particulier des leucémies aiguës myéloblastiques.

Les progrès concernant

(i) les procédures d'allogreffe, en termes de :

- choix du conditionnement : augmentation de la proportion de conditionnements d'intensité réduite (au détriment des conditionnements myélo-ablatifs) ;
- choix du donneur : augmentation du recours à des donneurs dit « alternatifs », tels que les donneurs apparentés haplo-identiques ;
- choix de la source cellulaire : augmentation de la proportion de greffons à base de CSP (au détriment de moelle osseuse) et diminution du recours aux USP ;
- décision du moment opportun pour la réalisation de l'allo-CSH au cours de l'histoire de la maladie : allo-CSH réalisée plus précocement pour un certain nombre d'hémopathies ;

(ii) la meilleure connaissance des hémopathies malignes et de la prévention de leur rechute et

(iii) la meilleure prévention et gestion des complications liées à la greffe, qu'elles soient d'origine :

- toxique, dues aux effets secondaires du conditionnement,
- immunologique, sous forme de GvHD,
- ou encore infectieuse ;

ont tous contribué à l'amélioration constante du pronostic des patients receveurs d'une allo-CSH, et ce malgré une augmentation, en parallèle, de l'âge des receveurs d'allo-CSH (18).

Il n'en demeure pas moins que les principales complications responsables de morbi-mortalité après allo-CSH restent à ce jour la rechute de l'hémopathie, la GvHD, les infections et les effets toxiques du conditionnement sur les différents organes du receveur.

Les données épidémiologiques indiquent que le pronostic après allo-CSH est étroitement lié à l'âge du receveur, à la maladie sous-jacente et à son stade, ainsi qu'aux caractéristiques des procédures d'allo-CSH (protocole de conditionnement, type de donneur et source cellulaire).

Nous détaillerons ci-dessous prioritairement les résultats de l'allo-CSH géno-identique dans le cadre des leucémies aiguës myéloblastiques qui est associée au meilleur pronostic et donc considérée comme le « *gold standard* » de l'allo-CSH.

Différentes périodes post-greffe, aux enjeux pronostiques qui leur sont propres, peuvent être distinguées :

En ce qui concerne le pronostic à court terme (première année post-greffe), la survie globale à 100 jours post-greffe d'adultes receveurs d'allo-CSH géno-identique après conditionnement myélo-ablatif pour leucémie aiguë myéloblastique en première rémission complète (RC1) a progressé de 85% (période 1994-1995) à 94% (période 2004-2005) d'après les données nord-américaines du CIBMTR (n=38 060 patients) (19).

Dans le même temps et pour le même type de patients, la probabilité de survie globale à 1 an est passée de 69% à 75% (19).

Des données similaires ont été récemment rapportées par l'EBMT (n=38 800, tous types d'hémopathie et d'allo-CSH confondus), avec une probabilité de survie globale à 1 an passant de 57,6% (cohorte 1990-1999) à 72,1% (cohorte 2010-2016) (18).

Cette diminution du risque de mortalité précoce va de pair avec une diminution du risque de complications toxiques, infectieuses et immunologiques au cours des 100 premiers jours post-greffe. Ainsi, au Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle, Etats-Unis), au cours de la période 2003-2007 (n=1148), les risques de mortalité toute cause (odds ratio [OR] ajusté, 0,59 [IC95, 0,52-0,67]), de complication hépatique à J100 (hyperbilirubinémie $\geq 171 \mu\text{mol/L}$:

OR ajusté, 0,22 [IC95, 0,16-0,30]), de complication rénale à J100 (doublement de la créatininémie : OR ajusté, 0,47 [IC95, 0,39-0,56]), de maladie à Cytomégalovirus (CMV) à J100 (OR ajusté, 0,52 [IC95, 0,32-0,85]) et de GvHD aiguë (grades 2,3 ou 4 : OR ajusté, 0,61 [0,50-0,75]) étaient significativement diminués par rapport à la période 1993-1997 (n=1418) (20).

De nos jours, les principales causes de décès précoce au cours des 100 premiers jours après allo-CSH géno-identique sont la rechute (32%), les défaillances d'organe (31%) dues principalement à la toxicité du conditionnement et les infections (16%) (données CIBMTR 2018-2019) (21).

En ce qui concerne le pronostic à moyen terme (2-3 ans post-greffe), les données de l'EBMT (n=38 800, tous types d'hémopathie et d'allo-CSH confondus) montrent une augmentation de la probabilité de survie globale à 2 ans, passant de 46,1% pour la cohorte 1980-1989 à 61,9% pour la cohorte la plus récente (2010-2016) (18).

Ces observations sont confirmées par les données du CIBMTR, indiquant chez des adultes receveurs d'allo-CSH pour leucémie aiguë myéloblastique une augmentation de la probabilité de survie globale à 3 ans de 35% sur la période 2001-2005 à 54% sur la période 2016-2019 (21). Les courbes de probabilité de survie globale des patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique enregistrés par le CIBMTR, selon la période de greffe, sont représentées sur la figure 3.

Les causes de décès à 3 ans post-greffe chez des adultes receveurs d'allo-CSH géno-identique étaient, en 2018-2019, la rechute (53%), suivie par les défaillances d'organe et les infections (respectivement 14%) et la GvHD (12%) (21). Ces proportions relatives étaient très similaires chez les adultes receveurs d'allo-CSH non apparentée HLA-compatible.

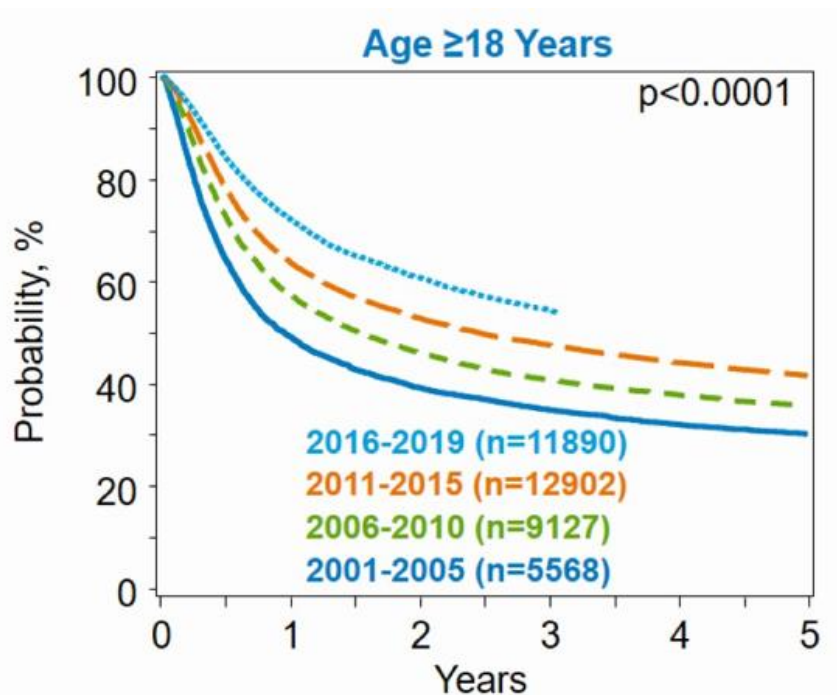


Figure 3. Evolution de la probabilité de survie globale d'adultes receveurs d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques pour leucémie aiguë myéloblastique, selon la période. D'après les données du Center for International Blood & Marrow Transplant Research (21). Analyse univariée non ajustée.

En ce qui concerne le pronostic à long terme (au-delà de la troisième année post-greffe), dans l'étude de Wingard et al. exploitant les données du CIBMTR, les receveurs d'une allo-CSH après conditionnement myélo-ablatif, en rémission à 2 ans post-greffe (n=10 632), avaient une probabilité de survie de 85% à 10 ans (22). Les principales causes de décès tardif parmi ces receveurs étaient la rechute tardive, la GvHD chronique et les infections.

Au total, ces progrès ont conduit à une augmentation progressive, au niveau de la population, du pool de patients receveurs d'une allo-CSH. D'après les projections de Majhail et al., la prévalence des receveurs d'allo-CSH est estimée en 2030 à 234 000 personnes aux Etats-Unis (23). L'espérance de vie de ces « survivants » d'allo-CSH à long terme demeure cependant inférieure à celle de la population générale, en raison notamment d'une surmortalité infectieuse par rapport à la population générale (24).

Ces patients ont des enjeux de santé bien spécifiques, dont, nous le verrons, la vaccination fait partie.

1.4. La reconstitution immunitaire après allogreffe de CSH

L'allo-CSH correspond *in fine* à la greffe d'un système immunitaire, dont l'action curative envers les hémopathies malignes repose sur l'effet GvL, réaction allogénique dirigée contre les cellules malades du receveur.

Afin de permettre la prise de greffe et le déploiement d'un « nouveau » système immunitaire à partir des CSH du donneur, un conditionnement de l'organisme du receveur est nécessaire, basé sur une chimiothérapie, associée ou non à une irradiation corporelle totale. En supprimant les CSH (dont le clone cellulaire malade) et les globules blancs du receveur, ce conditionnement a une action intensément suppressive sur le système immunitaire du receveur, indispensable pour éviter le rejet du greffon.

Les receveurs d'allo-CSH traversent ainsi à la suite du conditionnement une phase d'aplasie caractérisée par une immunodépression très profonde, touchant à la fois les compartiments inné et adaptatif du système immunitaire et exposant le receveur aux risques de rechute de l'hémopathie et aux infections. La profondeur de cette immunodépression dépend de l'intensité du conditionnement, certaines cellules immunitaires du receveur pouvant survivre au conditionnement (25,26). Certains types cellulaires en particulier – plasmocytes, cellules dendritiques tissulaires, macrophages – sont réputés relativement résistants à la radiochimiothérapie (27).

Après l'implantation des CSH du donneur au niveau de la moelle osseuse du receveur, celles-ci se différencient pour permettre le rétablissement progressif de toutes les lignées hématopoïétiques. La restauration des globules blancs, à partir du progéniteur myéloïde pour les polynucléaires et les monocytes et du progéniteur lymphoïde pour les lymphocytes et cellules apparentées, aboutit au développement d'un nouveau système immunitaire fonctionnel. Ce processus de reconstitution immunitaire, dynamique, graduel et individuel, dépendant de nombreux facteurs extrinsèques et intrinsèques, se prolonge sur plusieurs mois voire années, et peut demeurer incomplet.

Enfin, tous les receveurs d'allo-CSH sont soumis à des protocoles d'immunosuppression dès le conditionnement, plus ou moins intensifs selon le protocole d'allo-CSH, visant à prévenir le développement d'une GvHD. Cette immunosuppression sera progressivement sevrée au cours des premiers mois post-greffe.

La reconstitution immunitaire est un processus complexe, dont la progression en termes de vitesse, de quantité et de qualité est essentielle pour prévenir la rechute de l'hémopathie sous-jacente, les complications infectieuses, moduler la réaction allogénique contre l'hôte et assurer en définitive la survie du receveur d'allo-CSH.

a. Chronologie de la reconstitution immunitaire

La reconstitution des lignées hématopoïétiques et du système immunitaire après allo-CSH suit une chronologie bien établie (Figure 4), bien que les délais indiqués ci-dessous puissent fortement varier d'un receveur à l'autre, tant les facteurs intervenant dans ce processus, avant, pendant et après l'allo-CSH, sont nombreux.

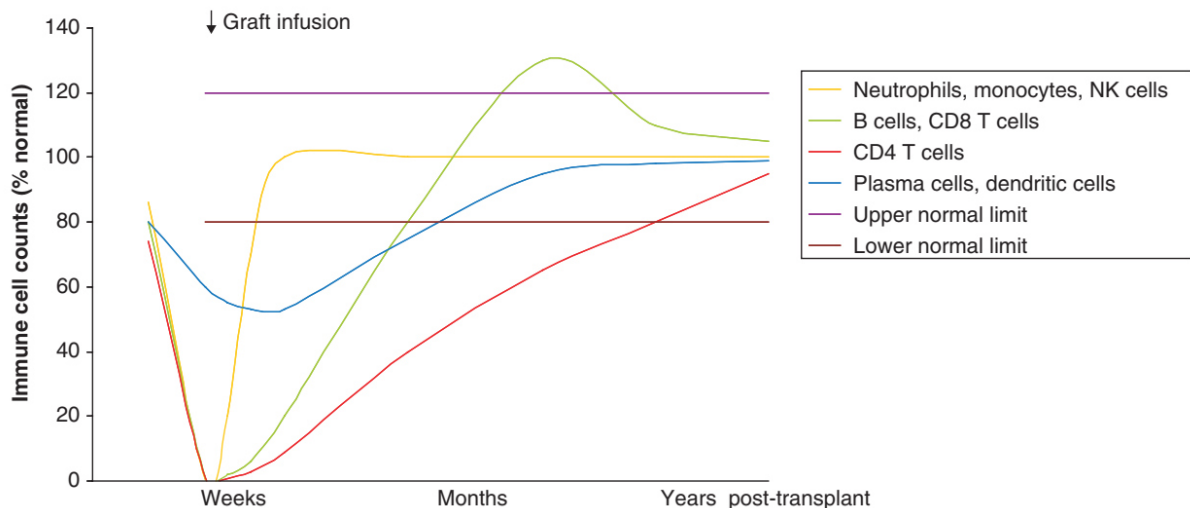


Figure 4. Reconstitution immunitaire après allogreffe de cellules souches périphériques après conditionnement myélo-ablatif. Les nombres de cellules immunitaires sont représentés en pourcentage des valeurs normales. D'après Storek (26).

L'immunité innée, système qui est basé principalement sur la reconnaissance de motifs canoniques ubiquitaires non spécifiques, se rétablit en quelques semaines à quelques mois. La reconstitution de l'immunité adaptative, fondée sur la reconnaissance d'antigènes *via* des récepteurs spécifiques, générant ainsi un répertoire qui va progressivement gagner en diversité et un pool de cellules mémoire, se compte quant à elle en plusieurs mois à années.

i. Immunité innée

Les barrières cutané-muqueuses, première ligne de défense de l'hôte contre les infections, endommagées par la radio-chimiothérapie (« mucite »), sont les premières fonctions immunitaires à se rétablir après allo-CSH.

La reconstitution immunitaire à partir des CSH du donneur débute par la lignée granulocytaire issue du progéniteur myéloïde, en parallèle à la reconstitution des lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire.

Ainsi, les premières cellules à réapparaître sont les **polynucléaires neutrophiles (PNN)**. La prise de greffe (*engraftment*) est définie par l'obtention d'un taux de PNN > 0,5 G/L et intervient habituellement dans un délai de 2 semaines en cas de greffe de CSP, 3 semaines en cas de greffe de moelle osseuse et 4 semaines en cas de greffe d'USP. Malgré l'obtention d'une quantité de PNN normale en moins d'un mois, la fonction de ces cellules, en termes de phagocytose et de chimiotactisme, reste altérée pendant environ 2 mois, voire plus longtemps en cas de GvHD (25,28–31).

Les autres cellules phagocytaires, dont les **monocytes** sanguins, précurseurs des macrophages tissulaires et des cellules dendritiques, cellules présentatrices d'antigène, retrouvent également des valeurs normales environ 1 mois après la greffe (26).

Les **cellules natural killer (NK)** CD56⁺CD16⁺, issues du progéniteur lymphoïde, mettent 1 à 4 mois à se reconstituer (32). Plusieurs équipes ont montré que la vitesse de reconstitution des cellules NK, acteurs de l'immunité antivirale et participant à l'effet GvL, était associée au risque de rechute et à la survie globale (33–35). Ainsi, un taux de cellules NK >150/μL à 3 mois post-greffe était associé à une moindre TRM (pour *treatment-related mortality*) après allo-CSH en analyse multivariée (36).

Enfin, les lymphocytes T (**LT**) $\gamma\delta$, effecteurs intermédiaires entre l'immunité innée et adaptative, intervenant eux aussi dans l'immunité antivirale et l'effet GvL, réapparaissent dans un délai de 1 à 2 mois (37–39).

ii. *Immunité adaptative : lymphocytes T*

La reconstitution de l'immunité adaptative est plus lente et fait appel à deux notions : l'expansion numérique de repopulation et la capacitation d'un répertoire lymphocytaire fonctionnel.

En ce qui concerne les **LT**, leur reconstitution repose sur deux mécanismes complémentaires (Figure 5) : l'expansion homéostatique périphérique (ou HPE, pour *homeostatic peripheral expansion*), indépendante du thymus, et la thymopoïèse *de novo*, voie de production de LT naïfs au répertoire diversifié (40).

A court terme (6 premiers mois post-greffe), les LT présents chez le receveur d'allo-CSH sont principalement de phénotype effecteur ou mémoire, arborent un répertoire restreint, et sont issus de la prolifération en périphérie des LT matures présents dans le greffon ou des rares LT du receveur ayant survécu au conditionnement (32). Une exception concerne la greffe d'USP, puisque ce type de greffons, bien que globalement pauvre en LT, contient une majorité de LT naïfs (25). Cette expansion de LT matures se fait sous l'effet de différentes cytokines, notamment l'interleukine (IL) -7 et l'IL-15 et/ou en réponse à une stimulation antigénique par l'intermédiaire du TCR (pour *T-Cell Receptor*), en particulier par les herpèsvirus latents, les alloantigènes et le microbiote intestinal (41–46).

Ce processus est plus efficace pour les **LT CD8+** qui réapparaissent par conséquent plus précocement après la greffe (en 2 à 8 mois) que les LT CD4+ (en 4 à 12 mois) (28,45). Les taux de LT CD8+ peuvent transitoirement être supérieurs aux valeurs normales de l'adulte, en raison de la prolifération de LT CD8+ spécifiques des herpèsvirus (47).

En effet, la principale fonction effectrice des LT CD8+ est représentée par leur pouvoir de cytotoxicité, envers les cellules infectées par un virus ou les cellules tumorales, après reconnaissance d'un antigène présenté par le CMH de classe I (48). Dans le contexte de l'allo-CSH, la reconstitution des LT CD8+ a été associée à une diminution du risque d'infections virales mais aussi à une augmentation du risque de GvHD aiguë et chronique (49–51).

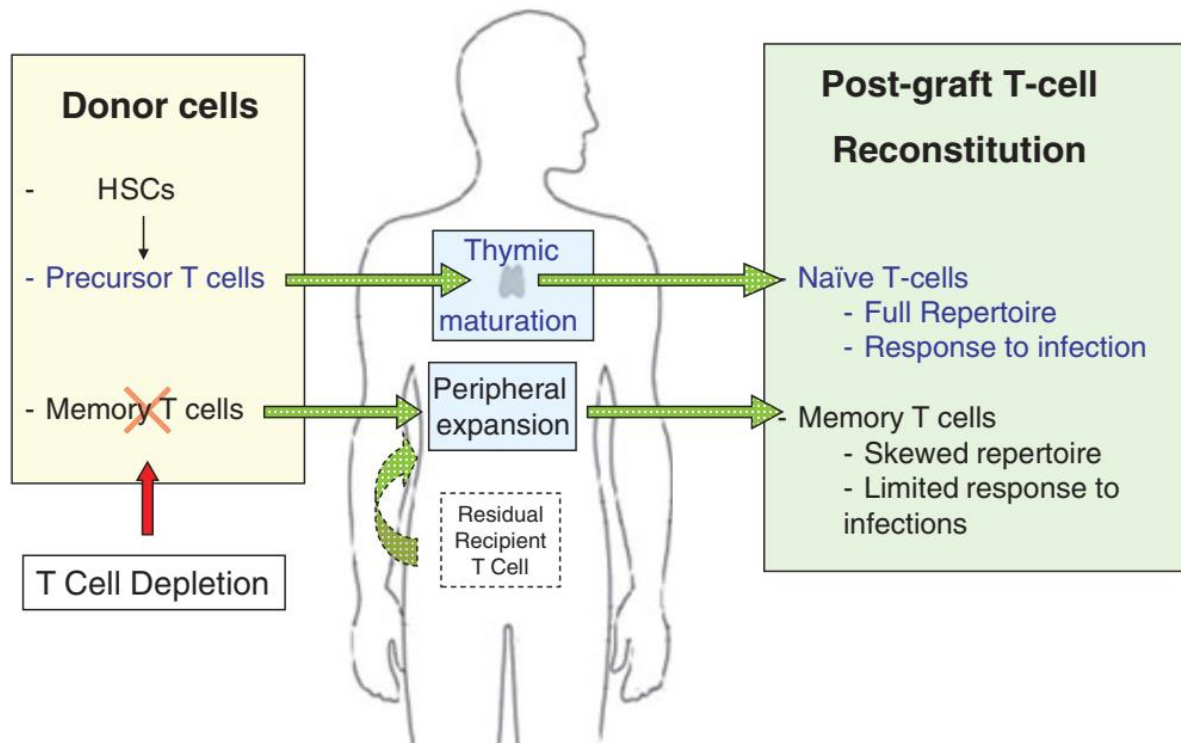


Figure 5. Reconstitution lymphocytaire T après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Deux mécanismes complémentaires interviennent : l'expansion homéostatique périphérique de lymphocytes T matures et la thymopoïèse de novo. D'après Toubert et al. (42).

Le processus de reconstitution lymphocytaire T reposant sur l'HPE permet la reconstitution précoce d'un pool de lymphocytes aux fonctionnalités cependant incomplètes, avec en particulier un répertoire restreint.

La reconstitution à long terme d'un pool de LT naïfs, au répertoire diversifié, capables de se différencier en tout type de cellule effectrice ou mémoire en réponse à des néo-antigènes, repose sur la thymopoïèse. Ce processus prend du temps, débute environ 3 mois après l'allo-CSH, se prolonge jusqu'à 30 ans après l'allo-CSH, et nécessite un thymus fonctionnel (25,28,52).

La thymopoïèse reproduit l'ontogenèse physiologique des LT : les progéniteurs lymphoïdes issus des CSH du donneur s'engageant au niveau du thymus du receveur subissent successivement un réarrangement des gènes du TCR, permettant l'acquisition d'un répertoire diversifié, puis des sélections clonales positive et négative, assurant la tolérance du soi (du receveur) (45,48). On comprend aisément que la thymopoïèse revêt une importance capitale pour l'immunité anti-infectieuse, antitumorale, la tolérance du soi et en définitive la survie après allo-CSH (38,42,53).

Les LT naïfs (CD45RA+CCR7+) générés *de novo* par le thymus (RTE, pour *recent thymic emigrant*) peuvent être identifiés par les sjTREC (pour *signal joint T-cell receptor excision circles*) (cf. infra, section I.1.4.d.).

La reconstitution des **LT CD4+** dépendant plus de ce deuxième mécanisme que celle des LT CD8+, la remontée des LT CD4+ après allo-CSH est plus lente, ce dont témoigne le ratio de LT CD4/CD8 < 1 au cours des premiers mois post-greffe (43).

La reconstitution des LT CD4+ en temps opportun a un impact critique sur le pronostic après allo-CSH, que nous détaillerons dans la section I.1.4.c (cf. infra). Les deux grandes fonctions effectrices des LT CD4+ peuvent être rappelées : la fonction auxiliaire (LT « helper ») et la fonction régulatrice (LT reg) (38).

Les LT CD4+ auxiliaires sont capables, à la suite de la présentation antigénique par une cellule présentatrice d'antigène par l'intermédiaire du CMH de classe II et sous l'effet de signaux de costimulation et de l'environnement cytokinique, de se différencier en différents sous-types auxiliaires (les plus connus étant Th1, Th2, Th17, Th folliculaire). Ces sous-types auxiliaires orientent la réponse immunitaire adaptative cellulaire et humorale, à l'image d'un « chef d'orchestre » (48).

Les LT reg (CD4+ CD25+ FoxP3+) interviennent dans la régulation homéostatique de la réponse des autres cellules immunitaires effectrices et jouent un rôle indispensable dans le maintien de la tolérance du soi. Dans le contexte de l'allo-CSH, leur reconstitution reposant prioritairement sur l'HPE, ils réapparaissent plus rapidement que les LT CD4+ totaux après la greffe et ont été associés à une diminution du risque de GvHD aiguë et chronique (26,54–57).

iii. Immunité adaptative : lymphocytes B

En ce qui concerne les lymphocytes B (**LB**), leur reconstitution après allo-CSH suit l'ontogenèse physiologique à partir des progéniteurs lymphoïdes dérivés des CSH du donneur, à la fois en termes de nombres et de types cellulaires (58). Elle a lieu successivement au niveau de la moelle osseuse puis, après stimulation antigénique, dans les organes lymphoïdes secondaires, où elle dépend de l'interaction avec les LT pour la voie de différenciation folliculaire. La reconstitution des LB est ainsi étroitement liée à celle des LT CD4+, notamment des LT folliculaires (59).

Les progéniteurs lymphoïdes donnent naissance au niveau de la moelle osseuse aux précurseurs immatures des LB, où est généré le répertoire des LB par réarrangements successifs des gènes des immunoglobulines (Ig) aboutissant à la formation du BCR (pour *B-Cell Receptor*), correspondant à une Ig membranaire. Les premiers LB à être détectables au niveau du sang périphérique, environ 2 mois après l'allo-CSH, sont des LB de phénotype transitionnel (CD19+CD21lowCD38high) (60). La proportion de LB transitionnels diminue par la suite au profit des LB naïfs (CD19+CD21+CD27-), lymphocytes matures capables de répondre à une stimulation antigénique, dont le nombre atteint des valeurs normales voire supranormales environ 1 an après la greffe (61).

L'activation et la différenciation des LB naïfs interviennent après stimulation antigénique, dans les organes lymphoïdes secondaires. On distingue les réponses folliculaire « T-dépendante » et extrafolliculaire « T-indépendante », correspondant à deux voies d'activation et de différenciation lymphocytaire B distinctes :

- En cas d'activation par un antigène protéique (« T-dépendant »), l'interaction forte des LB avec les LT CD4+ auxiliaires aboutit à la formation des centres germinatifs : les LB y subissent les phénomènes de commutation isotypique, d'hypermutation somatique des segments de gènes codant les régions variables des Ig, et de sélection par l'antigène. Ils se différencient alors en plasmablastes qui deviendront plasmocytes sécréteurs d'anticorps, ou en LB mémoire (CD19+CD27+), spécifiques de l'antigène (48).
- Les antigènes polysaccharidiques (« T-indépendants ») vont quant à eux directement activer les LB de la zone marginale splénique, aboutissant à leur différenciation rapide en plasmocytes sécréteurs d'anticorps, sans induire la formation de centres germinatifs. Cette sous-population de LB (CD19+CD27+IgM+IgD+/-) se distingue par sa capacité à produire des Ig mutées en dehors des centres germinatifs, grâce vraisemblablement à une diversification de son répertoire pré-immun durant l'ontogenèse (62,63).

La reconstitution des LB mémoire (CD19+CD27+), caractérisés précisément par la présence de mutations somatiques dans les gènes codant les régions variables des chaînes d'Ig, débute environ 1 an après la greffe et se prolonge pendant minimum 5 ans (64). Il a été observé que la reconstitution des LB mémoire « non commutés » (CD19+CD27+IgM+IgD+/-), sous-population de LB mémoire correspondant à l'équivalent circulant de LB de la zone marginale splénique, était moins efficace et retardée par rapport à celle des LB « commutés » (CD19+CD27+IgM-IgD-, IgG+ ou IgA+), contribuant à la susceptibilité des receveurs d'allo-CSH aux bactéries encapsulées (65–67).

Les LB, précurseurs des **plasmocytes**, sont un acteur clé de l'immunité humorale et de la production d'anticorps. Contrairement aux cellules immunitaires, il n'y a pas de disparition complète des Ig sériques au décours du conditionnement : les anticorps originaires du receveur vont subsister pendant un certain temps après l'allo-CSH avant de disparaître, dans un délai qui dépend de la demi-vie des anticorps et de la persistance des plasmocytes du receveur (58). Les plasmocytes du receveur résistent en effet au conditionnement, y compris myélo-ablatif, mais peuvent être détruits par la réaction du greffon contre l'hôte (68,69).

Progressivement, les Ig sériques seront sécrétées après stimulation antigénique adéquate par les plasmocytes issus des étapes successives de différenciation des CSH du donneur. La synthèse des différentes classes d'Ig suit celle observée au cours de l'ontogenèse B physiologique, avec la production d'abord d'IgM puis d'IgG1/G3 et enfin d'IgG2/4 et d'IgA, cette dernière témoignant de la capacité retrouvée de commutation isotypique (70).

Une reconstitution lymphocytaire B inadéquate est associée à un risque infectieux accru et à un risque de GvHD (43,59). Les LB semblent par ailleurs impliqués dans la physiopathologie de la GvHD chronique qui s'accompagne fréquemment de la fabrication d'auto-anticorps tissulaires (71). Au-delà du nombre de LB qui peut être insuffisant, l'immunité humorale fonctionnelle peut être durablement déficitaire après allo-CSH.

En effet, la reconstitution de l'immunité humorale fonctionnelle nécessite la coopération des LB avec un certain nombre de types cellulaires pouvant eux-mêmes être moins nombreux et/ou moins fonctionnels après allo-CSH.

Ainsi, nous avons vu que la reconstitution de certaines sous-populations de LB était dépendante de celle des LT CD4+, or celle-ci peut demeurer incomplète en cas de thymopoïèse altérée. L'activation et la différenciation des LB a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires, cependant ces derniers peuvent contenir moins de cellules folliculaires dendritiques, conséquence de la radio-chimiothérapie (59,61) : la sélection de clones lymphocytaires B de haute affinité dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires peut alors être perturbée (72). Par ailleurs, la reconstitution du pool de LB mémoire, notamment des LB mémoire « non commutés » (IgM+) est lente, or ces derniers sont impliqués dans la réponse vaccinale aux antigènes polysaccharidiques (65,66,73). En outre, il a été montré que les LB reconstitués présentaient un déficit intrinsèque de leur capacité d'hypermutation somatique, responsable d'une moindre avidité des anticorps (58,74).

iv. Hyposplénie fonctionnelle après allogreffe de CSH

Enfin, l'immunodépression et la reconstitution immunitaire après allo-CSH ne concernent pas seulement le nombre et la fonction des différents contingents lymphocytaires. Les fonctions immunitaires innée et adaptative de la rate, important organe lymphoïde, lieu de production d'opsonines spécifiques de type Ig, réservoir de LB mémoire (CD19+CD27+) et agissant comme « filtre des bactéries sanguines », peuvent être durablement altérées après allo-CSH. Cet état d'hyposplénie fonctionnelle est une conséquence des procédures du conditionnement et est exacerbée en cas de GvHD (75).

Sur le plan immunitaire, cela se traduit par un déficit en LB mémoire « non commutés » (CD19+CD27+IgM+IgD+/-), équivalent circulant des LB de la zone marginale splénique, par un défaut de production d'IgM en réponse à des antigènes polysaccharidiques et par une diminution de la capacité de phagocytose des bactéries extracellulaires, en lien avec un défaut d'opsonisation et un défaut d'activation du complément (59,62,76,77).

Sur le plan clinique, les conséquences sont une susceptibilité accrue aux infections par les bactéries encapsulées (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* etc.) et une moindre capacité de réponse aux antigènes polysaccharidiques, T-indépendants, notamment vaccinaux après allo-CSH (66,78–82).

b. Facteurs influençant la reconstitution lymphocytaire

La reconstitution immunitaire est un processus complexe et dynamique, influencé par de nombreux facteurs extrinsèques et intrinsèques au receveur, intervenant avant, pendant et après l'infusion de CSH. Cela est particulièrement documenté pour les LT.

Les principaux déterminants de la reconstitution immunitaire sont illustrés figure 6.

Il s'agit de :

- *caractéristiques du receveur* :

- **l'âge** : en raison de l'involution thymique avec l'âge, la thymopoïèse est moins performante chez les receveurs d'allo-CSH âgés (83,84) ;
- la **maladie sous-jacente** et le nombre de **lignes antérieures de chimio- et/ou radiothérapie**, voire un antécédent de greffe de CSH, pouvant affecter les cellules stromales des organes lymphoïdes primaires et secondaires et le microbiote intestinal du receveur (28,59,85–87) ;
- les **comorbidités** éventuelles responsables d'une immunodépression ;

- le **sérostatut CMV** : les receveurs séropositifs pour le CMV greffés avec les CSH d'un donneur séronégatif (R+/D-) ont une expansion plus rapide de LT CD8+, mais ceux-ci s'avèrent moins fonctionnels (88,89) ;
- le **microbiote intestinal** : récemment, plusieurs études ont mis en évidence les liens entre dysbiose intestinale et reconstitution lymphocytaire T, un appauvrissement de la diversité du microbiote modifiant les équilibres finement régulés entre immunotolérance et développement d'un répertoire fonctionnel (44,46,86,90,91) ;

- *caractéristiques de la procédure de l'allo-CSH* :

- le **type de donneur** : la compatibilité HLA du donneur ainsi que le sérostatut CMV du donneur sont associés à la reconstitution immunitaire (88) ;
- la **source cellulaire** (richesse en LT et LB matures et proportion des différents sous-types lymphocytaires) : les greffons de CSP contiennent plus de LT que les autres types de greffon, mais les USP contiennent une quantité de LT naïfs proportionnellement plus importante (47,92,93) ;
- le **conditionnement** : d'une part, l'intensité du conditionnement détermine la possibilité de survie des cellules immunitaires du receveur, d'autre part, **l'irradiation corporelle totale** (TBI, pour *total body irradiation*), affecte négativement la reconstitution lymphocytaire T et B en altérant la structure des organes lymphoïdes (66,94) ;
- le **contenu du greffon** : nombre de cellules nucléées totales et de CSH CD34+ (95) ;
- les **immunosuppresseurs** employés pour la prophylaxie de la GvHD, dont le sérum anti-lymphocytaire (ou ATG, pour *anti-thymocyte globulin*) ou le cyclophosphamide post-greffe qui déplètent *in vivo* les lymphocytes (96–98) ;

- *complications post-greffe* :

- la **GvHD** : la GvHD impacte la reconstitution lymphocytaire en soi et par l'intermédiaire des immunosuppresseurs prescrits pour la traiter. La GvHD atteint ainsi la moelle osseuse et le thymus, entravant la thymopoïèse et la reconstitution de LT naïfs, et par effet ricochet, la reconstitution lymphocytaire B (cf. supra) (66,83,99–101) ;
- le **traitement immunosuppresseur** prescrit pour traiter une GvHD ;
- les **infections** : les infections à CMV interfèrent avec la reconstitution immunitaire en favorisant l'expansion de LT de phénotype effecteur mémoire, spécifiques du CMV, au détriment des LT naïfs, restreignant ainsi le répertoire lymphocytaire T (102). Par ailleurs, les antibiotiques administrés pour traiter une infection bactérienne, en aggravant la dysbiose intestinale, aggravent la GvHD intestinale et pourraient modifier la reconstitution immunitaire (103).

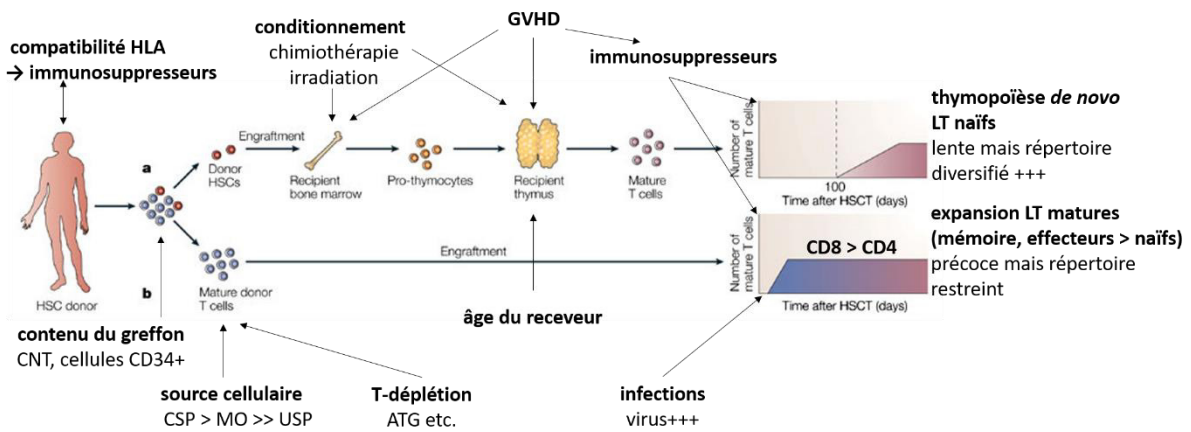


Figure 6. Facteurs influençant la reconstitution immunitaire après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. ATG, anti-thymocyte globulin ; CNT, cellules nucléées totales ; CSP, cellules souches périphériques ; GVHD, graft-versus-host disease ; HLA, Human Leukocyte Antigen ; HSC, hematopoietic stem cells ; LT, lymphocyte T ; MO, moelle osseuse ; USP, unité de sang placentaire. Adapté et modifié de Moss & Rickinson (40).

c. Reconstitution immunitaire et pronostic après allogreffe de CSH

De nombreuses études, essentiellement rétrospectives, ont rapporté que le pronostic (en termes de survie globale, de TRM, de GvHD et de complications infectieuses) après allo-CSH était intimement lié à la progression de la reconstitution immunitaire et au rétablissement rapide de certains contingents cellulaires, notamment lymphocytaires, comme nous allons le détailler (25,32,33,104,105).

Un rôle prépondérant revient à la reconstitution des LT CD4+. Ainsi, plusieurs équipes ont démontré l'importance de la reconstitution adéquate des LT CD4+ et de leurs sous-types, et ce dès le premier mois post-greffe.

Dans l'étude prospective (n=410) de Waller et al., des taux plus élevés de LT CD4+, notamment naïfs et centraux mémoire, à 1 mois post-greffe étaient associés à une meilleure survie des receveurs de CSP, en lien avec une diminution de la TRM, due à la GvHD et aux infections (51). Dans une autre étude prospective (n=157), des taux bas de LT CD4+ totaux (<8,9/ μ L) et de LT CD4+ naïfs (<1,3/ μ L) à J28 post-greffe étaient associés en analyse multivariée à un risque accru d'infections et de GvHD chronique au cours de la première année post-greffe, ainsi que de TRM à J100 (106).

Plusieurs études, rétrospectives, ont permis d'identifier la valeur seuil de LT CD4+ \geq 50/ μ L à J100 comme étant un facteur prédictif indépendant du pronostic après allo-CSH, qu'il s'agisse de la survie globale, de la mortalité hors rechute, du risque de rechute et du risque d'infections,

notamment de réactivations virales (107–110). La même équipe a rapporté que la reconstitution des LT CD4+ pouvait être prédite à partir de la reconstitution précoce des cellules de l'immunité innée (PNN, monocytes, cellules NK) (111). Bartelink et al. avaient précédemment montré dans leur étude (n=103) que l'aire sous la courbe de la numération des LT CD4+ au cours des 90 premiers jours post-greffe était prédictive de la mortalité précoce après allo-CSH (33).

D'autres équipes ont souligné l'impact pronostique associé à la reconstitution d'autres contingents lymphocytaires, en particulier les cellules NK.

Ando et al., dans leur étude rétrospective récente (n=358), font le lien entre la source cellulaire, la reconstitution de certains sous-types cellulaires et le pronostic après allo-CSH : à J100 post-greffe, les taux de cellules NK (CD16+CD57-) d'un côté et de LB (CD20+) et de LT cytotoxiques (CD8+CD11b-) de l'autre étaient identifiés en analyse multivariée comme étant des facteurs indépendants associés respectivement au risque de rechute, de mortalité hors rechute et au total à la survie globale (34). Une autre équipe a montré qu'un nombre réduit de cellules NK détectées dans le sang médullaire à J21 était associé à un risque accru d'infections et de mortalité (112).

d. Outils de mesure de la reconstitution immunitaire

Eu égard à l'impact de la reconstitution immunitaire sur le pronostic après allo-CSH, le monitoring régulier de différents paramètres de la reconstitution immunitaire apparaît particulièrement pertinent pour prédire les événements post-greffe (105). Cependant, la fréquence et le contenu de cet immunomonitoring post-greffe ne sont pas codifiés (104).

En pratique clinique courante, l'évaluation de la reconstitution immunitaire se limite actuellement à des mesures statiques de la *quantité d'effecteurs* :

- au niveau cellulaire : numération des lymphocytes totaux, des LT, LB et cellules NK et dans le meilleur des cas, des différentes sous-populations lymphocytaires T et B (naïves et mémoire) par technique de cytométrie en flux basée sur le repérage de marqueurs de surface ;
- au niveau humoral : dosage pondéral des Ig G, A et M.

La *spécificité* de ces effecteurs peut être précisée par la quantification de LT spécifiques d'un antigène grâce à la technologie des tétramères (non disponible en routine) ou le dosage des Ig spécifiques d'un antigène, technique aisée qui rend compte de l'efficacité de la réponse immunitaire anti-infectieuse ou post-vaccinale au niveau humoral, mais peut être prise en

défaut par le transfert passif d'Ig à l'occasion de transfusions ou de perfusions d'immunoglobulines polyvalentes.

L'analyse quantitative de la reconstitution immunitaire peut enfin être approfondie par d'autres outils, moins accessibles :

- l'activité de thymopoïèse post-greffe, surestimée par la numération de LT naïfs (qui peuvent être issus de l'HPE), peut être quantifiée précisément grâce à la mesure par PCR des TRECs, petits fragments d'ADN circulaires cytoplasmiques, excisés lors des réarrangements géniques du TCR. Il est recommandé d'exprimer le résultat en sjTREC/mL de sang périphérique et de le normaliser par rapport à la numération lymphocytaire T CD3+ (sjTREC/CD3+) (42,113) ;
- de la même manière, la production *de novo* de LB par la moelle osseuse peut être estimée à partir de la quantification des KRECs (pour *kappa-deleting recombination excision circles*), fragments d'ADN circulaires générés à l'occasion du réarrangement des gènes codant la chaîne légère κ du BCR (59,95) ;
- la diversité du répertoire des TCR et/ou BCR peut être mesurée par spectratypage ou séquençage.

Ces mesures évaluent mal la *fonctionnalité* immunitaire, c'est-à-dire la qualité de ces effecteurs et de leurs interactions réciproques, permettant d'aboutir à une réponse immunitaire efficace. Evaluer la reconstitution immunitaire fonctionnelle après allo-CSH jouit d'un intérêt croissant (104,114–116).

Pour approcher l'aspect fonctionnel de la reconstitution immunitaire, certaines équipes suggèrent d'inclure le dosage régulier de cytokines sanguines (32,104).

Les tests de fonctionnalité immunitaire (ou IFA, acronyme anglophone pour *immune functional assay*) permettent d'apprécier *in vitro* la capacité de réponse du système immunitaire à un stimulus antigénique (spécifique) ou à un mitogène (non spécifique : phytohématagglutinine [PHA], autres) (117,118). Ces tests peuvent être réalisés sur la fraction leucocytaire du sang, nécessitant l'isolement préalable des cellules mononucléées du sang (PBMC, pour *peripheral blood mononuclear cells*), ou sur sang total. Il peut s'agir de tests quantifiant :

- la sécrétion de cytokines (interféron- γ [IFN- γ], dans le cadre des IGRA, pour *Interferon-Gamma Release Assay*, IL-4 etc.) par technique immunoenzymatique ;
- le nombre de cellules sécrétrices d'une cytokine donnée ou d'anticorps spécifiques d'un antigène dans le cadre des tests ELISpot (pour *enzyme-linked immunospot*) ;
- ou la prolifération lymphocytaire par cytométrie en flux, pouvant être combinée à la détection de cytokines intracellulaires (ICS, pour *intracellular cytokine staining*).

Ces techniques sont utilisées pour évaluer le risque d'infections virales (CMV etc.), champ d'application où elles commencent à s'implanter en routine (119). Elles sont également utilisées dans l'évaluation de la réponse immunitaire cellulaire aux vaccins.

A l'avenir, l'analyse des différents sous-types de cellules immunitaires, innées et adaptatives, pourrait être avantageusement approfondie grâce à la cytométrie de masse, combinant à la numération de cellules l'évaluation de marqueurs de fonctionnalité immunitaire, protéines de surface et diverses cibles intracellulaires (120).

1.5. Le risque infectieux après allogreffe de CSH

a. Données épidémiologiques concernant les infections après allogreffe de CSH

Les infections constituent une cause majeure de morbi-mortalité post-greffe. Ainsi, les infections demeurent, avec la rechute précoce et les défaillances d'organe, une des principales causes de décès de l'adulte receveur d'allo-CSH, en particulier au cours des 100 premiers jours post-greffe.

On trouve parmi les facteurs influençant la vitesse de reconstitution immunitaire les principaux déterminants du risque infectieux après allo-CSH : GvHD chronique, type de donneur et de source cellulaire, type de conditionnement, sérostatuts D/R et âge du receveur (121–124).

De nombreuses études rapportent des données chiffrées permettant d'estimer le poids des complications infectieuses après allo-CSH (incidence, type d'infection, hospitalisation pour infection ou décès de cause infectieuse).

En ce qui concerne l'incidence et la morbidité infectieuse, dans une étude polonaise multicentrique rétrospective ayant inclus 308 enfants receveurs de greffe de CSH (dont 232 allo-CSH) suivis pendant 2 ans (2012-2013), l'incidence cumulée d'infections virales, bactériennes et fongiques était respectivement de $49,1 \pm 3,3\%$, $35,3 \pm 3,1\%$ et $26,8 \pm 2,9\%$ (125). Chez des adultes receveurs d'allo-CSH greffés à partir de donneurs alternatifs (n=66), l'incidence cumulée à 18 mois d'infections survenues après 3 mois post-greffe était de 57% après greffe d'USP et 72% après allo-CSH à partir d'un donneur non apparenté avec disparité HLA (« mismatch »), avec une prédominance d'infections bactériennes et virales (environ 40% respectivement) (122). Après allo-CSH haplo-identique, 93% des patients de la cohorte

rapportée par Esquirol et al. (n=236, suivi médian 37 mois) ont présenté au moins un épisode infectieux ayant nécessité un traitement anti-infectieux spécifique et/ou imposé une hospitalisation (126).

Même à distance de la greffe, l'incidence des infections reste élevée, en particulier chez les patients présentant une GvHD chronique : parmi les 346 receveurs d'allo-CSH en vie à 1 an post-greffe analysés par Sy et al., l'incidence cumulée d'infections à 5 ans s'élevait à 45,4%, voire 58,5% en cas de GvHD modérée à sévère (123). Des données similaires ont été rapportées par l'équipe du Fred Hutchinson Cancer Research Center, qui notait parmi les receveurs de greffe de CSH en vie à 2 ans post-greffe (n=1792, dont 925 allo-CSH) un taux d'incidence d'épisodes infectieux à 65,4/1000 patients-années, 9 fois plus élevé qu'en population générale, et une incidence cumulée à 10 ans d'hospitalisation pour infection de 30,6% (127,128).

En ce qui concerne la mortalité de cause infectieuse, celle-ci a sensiblement diminué au cours des dernières décennies, grâce à une meilleure prévention et grâce aux progrès thérapeutiques dans le domaine des maladies infectieuses (129,130).

D'après les données du CIBMTR concernant la période 2018-2019, la proportion relative de décès de cause infectieuse au cours des 100 premiers jours post-greffe variait en fonction du type de donneur et de la source cellulaire entre 16% (donneur apparenté géno-identique) et 26% (donneur apparenté haplo-identique), voire 28% (greffe d'USP). Dans ces deux derniers types de greffe, les infections représentaient respectivement la deuxième voire première cause de décès (21). Au-delà du 100^{ème} jour post-greffe, le poids relatif des infections en tant que cause de décès diminuait à 13-16%, derrière la rechute de l'hémopathie (première cause de décès) et les défaillances d'organe, mais toujours devant la GvHD (21).

La proportion relative des infections en tant que cause de décès tardif continue ensuite de diminuer, au fur et à mesure que progresse la reconstitution immunitaire, de 11-15% entre 2 et 4 ans post-greffe à 8-16% entre 5 et 9 ans post-greffe puis 0-5% au-delà de la dixième année post-greffe, en fonction du type d'hémopathie maligne sous-jacente (22). Les infections constituaient la troisième cause de surmortalité chez les receveurs d'allo-CSH sans rechute à 5 ans post-greffe (131).

D'après une autre étude, rétrospective, portant sur une cohorte de receveurs d'allo-CSH en vie à 2 ans post-greffe (n=4741), le risque de mortalité hors rechute à 30 ans post-greffe était de 22,3%, avec une surmortalité de cause infectieuse nette par rapport à la population générale (indice standardisé de mortalité à 52) (24).

b. Chronologie du risque infectieux après allogreffe de CSH

Le risque et la nature des complications infectieuses évoluent tout au long de la période post-greffe, reflétant l'avancée de la reconstitution immunitaire et la présence éventuelle d'une immunosuppression pharmacologique. Les deux principaux déterminants du risque infectieux sont le délai écoulé depuis l'allo-CSH et la présence ou non d'une GvHD, imposant un traitement immunosuppresseur systémique (81,132). Le risque infectieux est par ailleurs modulé par la présence de prophylaxies anti-infectieuses.

Trois phases du risque infectieux sont communément distinguées, rendant compte de la cinétique habituelle de reconstitution immunitaire après une allo-CSH après conditionnement myélo-ablatif (81,132–134) :

- la phase précoce précédant la prise de greffe (avant J30),
- la phase précoce après la prise de greffe (J30-J100),
- et la phase tardive, après le troisième mois.

Ces trois phases sont associées à des infections bien distinctes, tel que représenté figure 7.

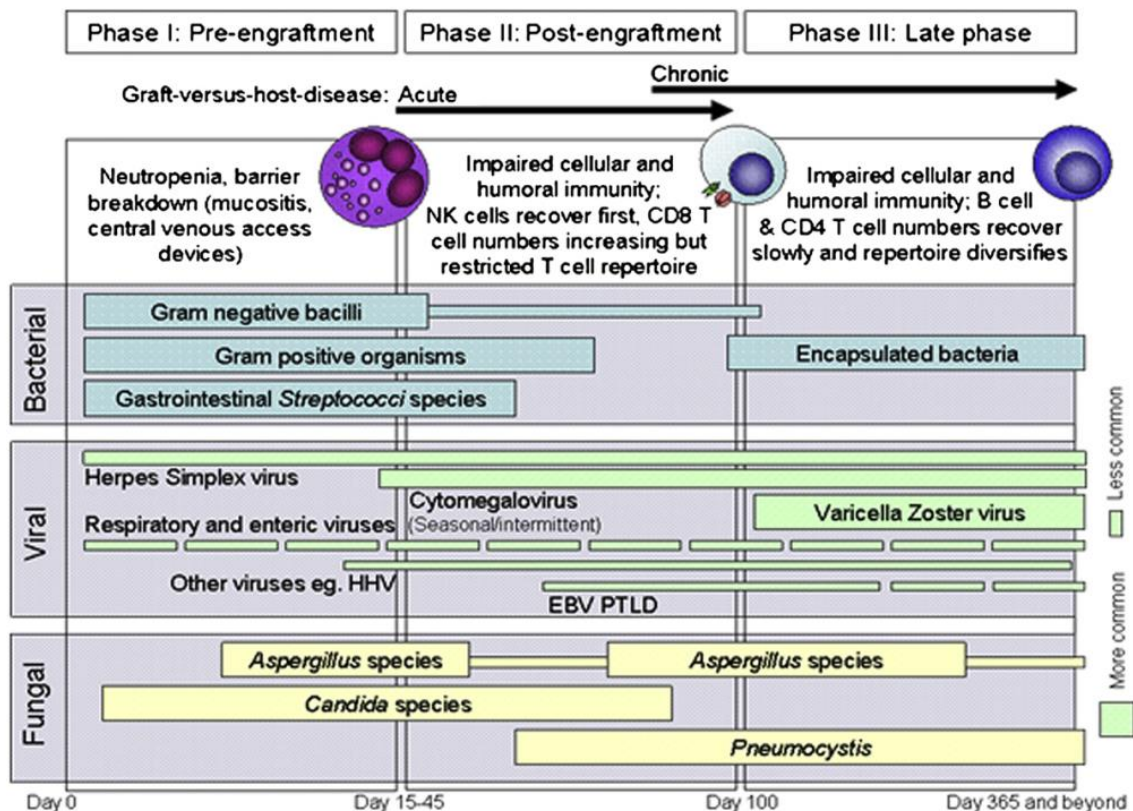


Figure 7. Les trois phases du risque infectieux après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Abréviations : EBV, Epstein-Barr virus ; HHV, Human Herpesvirus ; NK, natural killer ; PTLD, Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder. D'après Tomblyn et al. (81).

Au cours de la phase précoce précédant la prise de greffe, le patient receveur d'une allo-CSH se trouve en état d'aplasie profonde, fréquemment équipé d'un accès veineux central et présentant une mucite plus ou moins marquée, responsables d'une altération des barrières cutanéomuqueuses. L'immunodéficience est alors maximale.

Les épisodes fébriles sont quasi-systématiques au cours de cette phase, d'origine infectieuse ou non, et fréquemment non documentés. L'étiologie de ces épisodes de « fièvre d'origine indéterminée » est présumée bactérienne, en lien avec des translocations à partir du tube digestif. Les principales infections documentées sont les bactériémies, à bacilles Gram négatif (BGN), évoquant un point de départ digestif, à cocci Gram positif (CGP) (staphylocoques ou streptocoques), évoquant un point de départ cutané, notamment à partir d'un cathéter veineux, ou les fongémies à *Candida*. La neutropénie prolongée augmente le risque d'infection angioinvasive à *Aspergillus*. Enfin, la mucite favorise les réactivations d'Herpès simplex virus (HSV).

Au cours de la deuxième phase, s'étendant de la sortie d'aplasie au troisième mois post-greffe environ, l'immunité innée est rétablie et le risque infectieux reflète alors le déficit de l'immunité adaptative, intrinsèque à l'allo-CSH et aggravé par l'immunosuppression pharmacologique, administrée pour la prévention ou le traitement de la GvHD.

Les principales infections rencontrées au cours de cette phase sont les réactivations d'infections virales latentes, en particulier à CMV, dont le risque dépend du sérostatut CMV du receveur et du donneur. La survenue d'une infection ou maladie à CMV avant J100 a un impact pronostique majeur pour le receveur d'allo-CSH, par ses effets directs et indirects sur la reconstitution immunitaire, augmentant le risque de mortalité hors rechute (135,136).

Les réactivations du virus Epstein-Barr (EBV) sont fréquentes et habituellement infracliniques, mais peuvent dans de rares cas déclencher des syndromes lymphoprolifératifs post-greffe (PTLD, pour *post-transplant lymphoproliferative disease*).

Les cystites à BK virus surviennent également dans ces délais.

Les infections fongiques survenant pendant cette phase reflètent le déficit de l'immunité cellulaire T, comme pour les infections à *Pneumocystis jirovecii*, et/ou le déficit fonctionnel des PNN au cours de la GvHD, comme pour les infections invasives à filamenteux. Les infections invasives à *Aspergillus* se rencontrent chez le receveur d'allo-CSH atteint de GvHD, et prennent la forme typiquement d'une aspergillose bronchoinvasive (137).

Au cours de la phase tardive, après le troisième mois post-greffe, la présence d'une GvHD chronique est le principal facteur de risque d'infection. Par ailleurs, les receveurs d'allo-CSH peuvent présenter un déficit fonctionnel de l'immunité humorale pendant de

longues années, en lien avec le défaut de LB mémoire « non commutés » (CD19+CD27+IgM+IgD+/-) et plus généralement l'hyposplénie fonctionnelle (59,61).

Ce déficit humoral les expose à un risque accru d'infections à bactéries encapsulées. L'incidence d'infections invasives à pneumocoque après allo-CSH a été estimée 50 à 166 fois plus importante parmi les receveurs d'allo-CSH qu'en population générale (79,138).

La GvHD chronique et le traitement immunosuppresseur qu'elle impose prolongent le risque de réactivations d'herpèsvirus, de pneumocystose et d'aspergillose. Les réactivations de virus varicelle zona (VZV) sont fréquentes, notamment après l'arrêt de la prophylaxie par valaciclovir, et touchent jusqu'à 50% des receveurs d'allo-CSH (139).

A long terme, les receveurs d'allo-CSH conservent une susceptibilité accrue aux infections, notamment aux infections virales respiratoires saisonnières (virus influenza, Virus Respiratoire Syncytial [VRS] etc.), potentiellement graves. Les infections virales respiratoires évoluent plus fréquemment que chez l'immunocompétent vers une atteinte des voies respiratoires inférieures (jusqu'à 30% des cas) et sont associées à un risque de survenue de bronchiolite oblitérante, une forme de GvHD bronchopulmonaire, et de mortalité accrue (140–143). Dans l'étude prospective de Foord et al. portant sur 1792 receveurs de greffe de CSH (dont 925 allo-CSH) à plus de 2 ans post-greffe, le taux d'incidence d'infections, en particulier bactériennes et fongiques, restait significativement supérieur à celui des patients soignés pour d'autres types de cancer et à celui de la population générale (65,4 vs 39,6 vs 7,2 épisodes infectieux/1000 patients-années) (127).

En ce qui concerne les infections à prévention vaccinale (*Haemophilus influenzae*, pneumocoques, méningocoques, influenza A/B, VZV ou hépatite B), le risque que des receveurs d'allo-CSH présentent une telle infection était 34,6 (IC95, 23-52,2) fois supérieur à celui de la population générale (127). Une immunoprophylaxie vaccinale efficace et bien suivie apparaît donc comme essentielle.

c. Prévention du risque infectieux après allogreffe de CSH

La prévention des infections après allo-CSH constitue un axe majeur de la prise en charge post-greffe et repose sur différentes mesures complémentaires qui contribuent ensemble à diminuer la morbidité et la mortalité infectieuse post-greffe. Nous ne détaillerons pas ici les recommandations concernant le monitoring proactif des infections virales, parasitaires et fongiques dans le cadre des stratégies de prise en charge *préemptive* des infections.

Les principales dispositions et interventions *prophylactiques*, dont le niveau de preuve scientifique est variable, sont résumées ci-dessous (81) :

- *diminution de l'exposition aux pathogènes* :

- prise en charge des receveurs d'allo-CSH en « **secteur stérile** » durant la période d'aplasie profonde précédant la prise de greffe : il s'agit de secteurs d'hospitalisation hautement spécialisés, géographiquement bien limités, caractérisés par une ventilation et une filtration continue de l'air à travers des filtres HEPA (pour *high efficiency particulate air*) et idéalement une pression positive ;
- **règles alimentaires** strictes : éviction des aliments réputés « à risque » de contamination par des bactéries (en particulier *Listeria monocytogenes*), des virus (norovirus, rotavirus etc.), des parasites (en particulier *Toxoplasma gondii*) ou des champignons filamenteux ;
- **règles comportementales** : hygiène des voies d'abord veineuses et des mains, port d'un appareil de protection respiratoire, éviction des situations d'exposition environnementale (travaux générant de la poussière etc.) en raison du risque fongique, mise en application des gestes barrière vis-à-vis de l'entourage ;

- *prophylaxies médicamenteuses anti-infectieuses* :

- antibactérienne (antibioprophylaxie) :
 - **lévofloxacine/ciprofloxacine** : recommandées par l'ECIL (pour *European Conference on Infection in Leukemia*) en 2005 durant la neutropénie initiale pour diminuer le risque de bactériémie notamment à *Pseudomonas aeruginosa*, mais de plus en plus controversées dans un contexte d'émergence mondiale de bactéries multirésistantes, tant l'efficacité en termes de réduction de mortalité est peu probable, alors que l'impact délétère sur le microbiote intestinal et l'écologie locale sont démontrés (144–146) ;
 - **pénicilline V** : au long cours, visant à diminuer le risque d'infections à bactéries encapsulées, en particulier chez les patients présentant une GvHD ou une hypogammaglobulinémie, bien que le niveau de preuve soit faible (133) ;
- antivirale :
 - **(val)acyclovir** : recommandé pendant la phase initiale d'aplasie en guise de prévention des réactivations d'HSV, poursuivi ensuite en prévention des réactivations de VZV pendant au moins 12 mois ou plus longtemps en cas d'immunosuppression prolongée, bien que la durée optimale de cette prophylaxie ne soit pas codifiée (147,148) ;

- **letermovir** : recommandé chez les receveurs séropositifs (R+) pour le CMV pendant les 100 premiers jours post-greffe, car il diminue de façon significative la survenue d'infections à CMV cliniquement significatives et est associé à un bénéfice de survie à 24 semaines (149,150) ;
- antifongique : stratégie prophylactique à adapter selon l'écologie locale
 - **fluconazole** : recommandé avant la prise de greffe, en prévention des candidoses invasives, chez les receveurs d'allo-CSH à faible risque d'infection fongique invasive (IFI) à champignon filamenteux (151) ;
 - **prophylaxie anti-filamenteuse (posaconazole en première intention)** : recommandé avant la prise de greffe chez les receveurs d'allo-CSH à haut risque d'IFI à filamenteux et après la prise de greffe en cas de GvHD associée à d'autres facteurs de risque d'IFI à filamenteux (GvHD sévère et/ou cortico-résistante, donneur alternatif) (151) ;
 - **triméthoprime-sulfaméthoxazole** : recommandé chez tous les receveurs en première intention pour prévention de la pneumocystose, bien que la durée de cette prophylaxie ne soit pas codifiée (152) ;
- antiparasitaire :
 - **triméthoprime-sulfaméthoxazole** : recommandé chez tous les receveurs (et en particulier ceux qui sont séropositifs) en prévention de la toxoplasmose, bien que la durée optimale de cette prophylaxie ne soit pas codifiée (153) ;

- *immunoprophylaxies* :

- passive :
 - **immunoglobulines intraveineuses (IgIV) polyvalentes** : ne sont pas recommandées à titre systématique car sans bénéfice cliniquement pertinent sur la survenue d'infections bactériennes et associées à la survenue d'effets indésirables (154,155). Leur utilisation chez des receveurs d'allo-CSH au-delà du 3^{ème} mois post-greffe pourrait même altérer la reconstitution immunitaire humorale (154). Les IgIV polyvalentes peuvent être envisagées en cas d'hypogammaglobulinémie profonde (IgG <4 g/L) et persistante, mais avec un bénéfice clinique incertain sur la prévention des infections bactériennes et virales (81,133,156,157) ;
 - **immunoglobulines spécifiques** : les préparations d'Ig hyperimmunes spécifiques ciblant le CMV ne sont pas recommandées à visée prophylactique. Les préparations d'Ig spécifiques ciblant le VZV (Varitect®) sont indiquées en

prophylaxie post-exposition, dans les 96 heures après un contage VZV. Concernant les viroses respiratoires, le palivizumab (anticorps monoclonal anti-VRS) et les cocktails d'anticorps monoclonaux contre le SARS-CoV-2 (pour *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) sont proposés respectivement chez les jeunes enfants allogreffés à risque durant la période hivernale et les receveurs d'allo-CSH âgés de 12 ans ou plus, non-répondeurs à la vaccination, avec un bénéfice clinique qui reste à démontrer (81,158,159) ;

- active : reposant sur la **vaccination** du receveur d'allo-CSH et de son entourage.

2. Vaccination après allogreffe de CSH

L'amélioration continue du pronostic à long terme des receveurs d'allo-CSH s'accompagne d'enjeux de santé bien spécifiques concernant la prévention et la prise en charge des complications liées aux procédures d'allo-CSH (160). L'optimisation de la (ré)immunisation des receveurs d'allo-CSH contre les maladies à prévention vaccinale en fait partie (161).

Les objectifs de la revaccination des receveurs d'allo-CSH peuvent être résumés ainsi :

- diminuer l'incidence et la morbi-mortalité associée aux maladies infectieuses. Cela concerne en particulier la grippe saisonnière, la COVID-19 (pour *coronavirus disease 2019*), le zona, les infections (invasives) à pneumocoque, à *Haemophilus influenzae* et à méningocoques, l'hépatite B, la rougeole et la varicelle, qui sont des infections plus fréquentes et/ou présentant une gravité particulière chez les receveurs d'allo-CSH ;
- restaurer la couverture vaccinale des receveurs d'allo-CSH contre les autres valences du calendrier vaccinal de la population générale, telles que tétanos, diphtérie, poliomyélite, coqueluche, et, si besoin, contre les valences recommandées aux voyageurs ;
- favoriser la reconstitution des LB et la régénération du pool de LB mémoire, processus qui dépendent de la stimulation antigénique, et, par extension, réinstruire et consolider le répertoire des LT.

2.1. Les grands principes de la vaccination après allogreffe de CSH

La revaccination des receveurs d'allo-CSH vise à **réinduire une mémoire immunitaire chez les receveurs d'allo-CSH**, sous forme de lymphocytes mémoire et de plasmocytes longue vie sécrétant d'anticorps. En effet, la perte de l'immunité notamment humorale contre les agents pathogènes rencontrés avant la greffe, acquise à l'occasion d'une infection ou d'une vaccination passées, est bien établie après allo-CSH (162–167). Elle intervient dans des délais variables, dépendant de l'antigène en question, du mode d'immunisation initial (infection naturelle vs vaccination), des caractéristiques hématologiques et des complications de l'allo-CSH, en particulier de la survenue d'une GvHD, qui accélère la perte de l'immunité antérieure (69).

Les recommandations de revaccination des receveurs d'allo-CSH **suivent les recommandations de vaccination du nourrisson** en ce qui concerne les cibles vaccinales : pneumocoques, diphtérie, tétanos, poliomyélite, coqueluche, *Haemophilus influenzae* de type b (Hib), hépatite B, méningocoques B et C, rougeole-oreillons-rubéole (ROR). Elles intègrent en plus les vaccins contre les méningocoques A, Y, W135, les papillomavirus humains (HPV), la varicelle et les infections respiratoires à virus influenza et SARS-CoV-2, en raison de la susceptibilité des receveurs d'allo-CSH à ces infections.

Les receveurs d'allo-CSH sont à considérer comme naïfs vis-à-vis des cibles vaccinales et les schémas vaccinaux recommandés correspondent ainsi à des **schémas de primovaccination**, comportant plusieurs doses vaccinales **à partir de 3-6 mois post-greffe**, suivies de l'administration d'une dose de rappel. Comme chez le nourrisson, ne sont utilisés au cours de la première année post-greffe que **les vaccins protéiques, les vaccins entiers inactivés et les vaccins polysaccharidiques conjugués**, en raison du défaut de réponse immunitaire T-indépendante aux antigènes polysaccharidiques. Les vaccins polysaccharidiques non conjugués tel que le vaccin antipneumococcique à 23 valences (VPP-23) sont recommandés à partir de 12 mois post-greffe. Les **vaccins vivants atténués sont contre-indiqués pendant les 24 premiers mois post-greffe et au-delà en cas de GvHD chronique et/ou de traitement immunosuppresseur en cours ou suspendu depuis moins de 3 mois**, tant que l'immunité cellulaire est jugée insuffisante. Par ailleurs, il est recommandé d'utiliser les vaccins contenant les valences D, T et Ca fortement dosées, soit en pratique les **formulations pédiatriques** des vaccins, y compris chez l'adulte (utilisation hors autorisation de mise sur le marché, AMM).

Certaines sociétés savantes ou autorités sanitaires (ECIL, American Society for Transplantation and Cellular Therapy) suggèrent de vérifier l'efficacité vaccinale par des **sérologies post-vaccinales**, notamment pour l'hépatite B, le SARS-CoV-2, la rougeole et la varicelle et éventuellement d'autres valences vaccinales, en cas de GvHD (81,159,168,169). Cependant, l'intérêt des sérologies post-vaccinales est controversé : il n'existe pas de corrélats de protection définis chez les receveurs d'allo-CSH immunodéprimés ; les sérologies peuvent être prises en défaut par le transfert passif d'anticorps à l'occasion de transfusions ou de perfusions d'IgIV et il n'existe pas de recommandations concernant la conduite à tenir en cas de titres d'anticorps jugés trop faibles (doses de rappel supplémentaires ?).

En plus de la vaccination individuelle des receveurs d'allo-CSH, il est recommandé de **vacciner l'entourage immédiat** (a priori immunocompétent), y compris les enfants, et les professionnels de santé contre la grippe saisonnière, la varicelle (si séronégatif) et le rotavirus (chez le nourrisson) (170). Il est également recommandé de veiller à la mise à jour du calendrier vaccinal, en particulier en ce qui concerne les vaccins vivants atténués, dans le cadre d'une stratégie dite de « cocooning » (168).

Enfin, la **vaccination du donneur de CSH pour le seul bénéficiaire du receveur n'est pas recommandée**, pour des raisons éthiques et pratiques et en raison d'un niveau de preuve insuffisant (168,170–172). Plusieurs études ont pu suggérer une séroprotection initiale du receveur et/ou une meilleure réponse vaccinale post-greffe du receveur en cas de vaccination du donneur de CSH avant le don, associée dans certaines études à une vaccination pré-greffe du receveur. Un tel bénéfice pour le receveur de la vaccination du donneur a été rapporté pour les vaccinations contre le tétanos, la diphtérie, Hib, l'hépatite B, par le vaccin antipneumococcique conjugué à 7 valences (VPC-7) ou dernièrement le vaccin à ARNm contre le SARS-CoV-2 BNT162b2 (173–179).

Ces observations appuient l'hypothèse d'un transfert adoptif d'immunité à partir du donneur, au moins transitoire. En prévision du don de CSH, et dans un contexte d'augmentation notable des allo-CSH haplo-identiques intra-familiales, il semble utile d'anticiper et de mettre à jour les vaccinations du donneur conformément aux recommandations en vigueur, et notamment la vaccination contre la grippe et le SARS-CoV-2, en évitant par ailleurs les vaccins vivants atténués au cours des 4 semaines précédant le don (180).

2.2. Recommandations nationales et internationales de revaccination

Les vaccinations après greffe de CSH sont régies par des recommandations internationales et nationales, basées essentiellement sur des avis d'expert. En France, les receveurs de greffe de CSH sont vaccinés selon les préconisations du Haut Conseil de Santé Publique, émises en 2012 et actualisées pour la dernière fois en 2014 (170). Ce calendrier vaccinal spécifique est illustré figure 8. Soulignons en particulier la recommandation d'utiliser le vaccin combiné pédiatrique penta- ou hexavalent DTPCa-Hib±HBV (diphtérique (D), tétanique (T), coquelucheux (acellulaire, multicomposé) (Ca), de l'hépatite B (ADNr) (HBV), poliomyélitique inactivé (P) et d'Hib conjugué), y compris chez l'adulte, contenant les valences fortement dosées D et Ca mais seulement 10 µg d'antigène HBs.

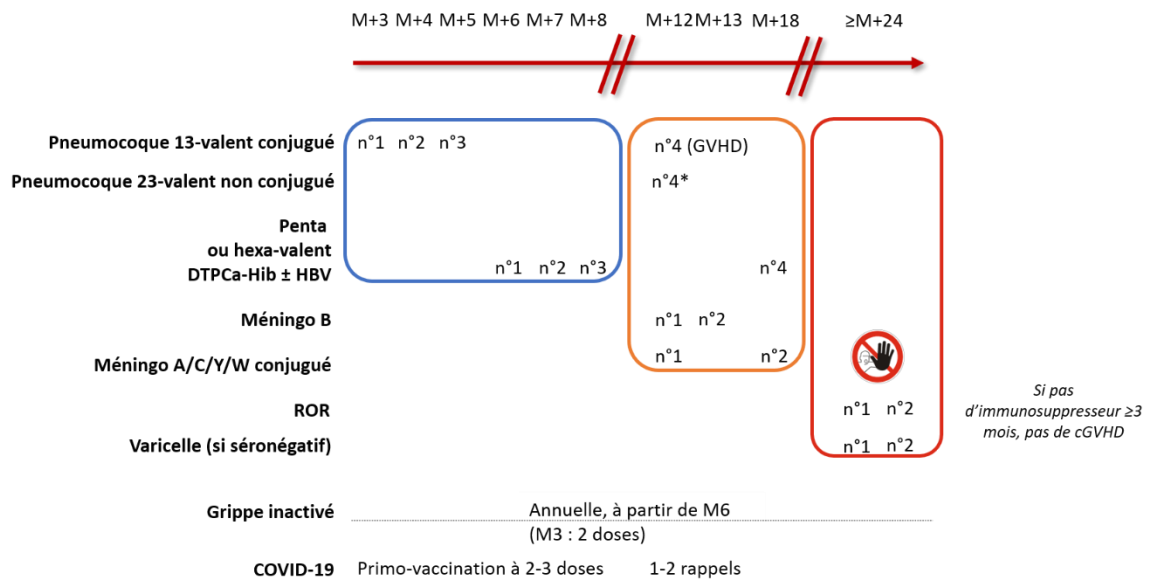


Figure 8. Calendrier vaccinal après greffe de cellules souches hématopoïétiques, en vigueur en France, conformément aux recommandations du Haut Conseil de Santé Publique (170) et du Conseil d'Orientation de la Stratégie Vaccinale (159). Abréviations : cGVHD, chronic graft-versus-host disease ; DTPCa-Hib±HBV, vaccin pédiatrique penta-/hexavalent diphtérie-tétanos-polio-coqueluche acellulaire-Haemophilus influenzae de type b ± hépatite B ; ROR, rougeole-oreillons-rubéole

A l'issue des séries de revaccination, le receveur d'allo-CSH bénéficie de vaccinations supplémentaires conformément au calendrier vaccinal de la population générale, hormis les rappels d'TP±Ca qui restent recommandés tous les 10 ans, la vaccination antigrippale annuelle et un rappel VPP-23 à 5 ans de la précédente injection.

Des recommandations similaires ont été émises par les sociétés savantes, conférences d'expert ou autorités sanitaires d'autres pays. Elles sont résumées dans le tableau 1.

Le premier article ci-dessous passe en revue ces recommandations, ainsi que les principales données d'efficacité et de tolérance concernant la vaccination après allo-CSH disponibles dans la littérature (181).

Tableau 1. Recommandations nationales et internationales de revaccination des adolescents et adultes receveurs d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Les différences substantielles entre les différentes recommandations sont signalées en gras. *Si maladie du greffon contre l'hôte, faire à la place une dose supplémentaire de vaccin antipneumococcique conjugué. †Dose d'antigène HBs indiquée quand précisée. ††En l'absence d'immunodépression persistante (maladie du greffon contre l'hôte, traitement immunosuppresseur) et minimum 3-8 mois après la dernière perfusion d'immunoglobulines intraveineuses. ¶Si par ailleurs lymphocytes T CD4+ >200/µL. §Selon l'âge, jusqu'à 19-26 ans. ||Quel que soit l'âge. #Deux doses si vaccination avant 6 mois post-greffe, maladie du greffon contre l'hôte et/ou lymphopénie. **Deux doses la première année post-greffe. Abréviations : DTPCa, formulation pédiatrique vaccin diphtérie-tétanos-polio-coqueluche acellulaire ; Hib, Haemophilus influenzae de type b ; HPV, papillomavirus humains ; ROR, rougeole-oreillons-rubéole.

	 France (170)	 ECIL 7 (168)	 Etats-Unis (171)	 Canada (182)	 Royaume-Uni (183)	 Australie (184)	 Allemagne (185)	 Suisse (186)	 Pays-Bas (187)
Pneumocoque conjugué	3 doses 3-4-5 mois	3 doses 3-4-5 mois	3 doses dès 3-6 mois	3 doses dès 3-6 mois	3 doses dès 6-12 mois	3 doses 6-8-12 mois	3+1 doses 6-7-8-18 mois	3 doses 3-4-5 mois	3+1 doses 4-5-6-12 mois
Pneumocoque non conjugué	1 dose 12 mois*	1 dose 12 mois*	1 dose 12 mois*	1 dose 12-18 mois*	1 dose 14-20 mois*	1 dose 24 mois	1 dose 24 mois	1 dose 12-24 mois*	1 dose 14 mois
DTPCa	3+1 doses 6-7-8-18 mois	3 doses 6-7-8 mois	3 doses 6-7-8 mois	3 doses dès 6-12 mois	3+1 doses dès 6-12 mois	3 doses dTPCa 6-8-12 mois	3+1 doses 6-7-8-18 mois	2+1 doses 6-7-14 mois	3 doses 12-13-14 mois
Hib	3+1 doses 6-7-8-18 mois	3 doses dès 3-6 mois	3 doses <i>dès 6-12 mois</i>	3 doses <i>dès 6-12 mois</i>	3+1 doses <i>dès 6-12 mois</i>	3 doses 6-8-12 mois	3+1 doses 6-7-8-18 mois	2+1 doses 6-7-14 mois	3 doses 12-13-14 mois
Hépatite B†	3+1 doses (10 µg) 6-7-8-18 mois	3 doses <i>dès 6-12 mois</i>	3 doses <i>dès 6-12 mois</i>	3-4 double doses (40 µg) dès 6-12 mois	3 double doses (40 µg) dès 6-12 mois	3 double doses (40 µg) 6-8-12 mois	3+1 doses (10 µg) 6-7-8-18 mois	3 doses <i>dès 6-12 mois</i>	3 doses (10 µg) 12-13-14 mois
Méningocoques ACYW135	2 doses 12-18 mois	<i>selon reco nationale</i> dès 6 mois	2+1 doses chez l'adolescent dès 6-12 mois	1 dose dès 6 mois	2 doses dès 6-12 mois	2 doses 6-8 mois	3 doses 12-14-20 mois	2 doses selon l'âge dès 6-12 mois	2 doses 13-16 mois
Méningocoque B	2 doses <i>dès 12 mois</i>	<i>selon reco nationale</i> dès 6 mois	–	2 doses dès 6 mois	–	2 doses 6-8 mois	3 doses 12-14-20 mois	–	2 doses 13-16 mois
ROR++	2 doses <i>dès 24 mois</i>	1 dose si séronégatif <i>dès 24 mois</i>	2 doses si séronégatif <i>dès 24 mois</i>	2 doses <i>dès 24 mois</i>	2 doses <i>dès 24 mois</i>	1-2 doses <i>dès 24 mois</i>	2 doses <i>dès 24 mois</i>	2 doses <i>dès 24 mois</i>	2 doses si séronégatif <i>dès 24 mois</i> [¶]
Varicelle++	2 doses si séronégatif <i>dès 24 mois</i>	1-2 doses si séronégatif <i>dès 24 mois</i>	2 doses si séronégatif <i>dès 24 mois</i>	2 doses <i>dès 24 mois</i>	1 dose si séronégatif <i>dès 24 mois</i>	2 doses si séronégatif <i>dès 24 mois</i>	2 doses <i>dès 24 mois</i>	2 doses si séronégatif <i>dès 24 mois</i>	–
Zona (sous-unitaire, recombinant)	<i>non disponible</i>	<i>non disponible</i>	2 doses à partir de 19 ans	2 doses à partir de 50 ans	–	–	à discuter	–	2 doses 12-14 mois
HPV [§]	3 doses <i>dès 6 mois</i>	<i>selon reco nationale</i> dès 6-12 mois	3 doses <i>dès 6-12 mois</i>	3 doses <i>dès 6-12 mois</i>	3 doses <i>dès 6-12 mois</i>	3 doses <i>dès 8 mois</i>	3 doses 12-14-20 mois	3 doses <i>dès 6-12 mois</i>	–
Grippe (inactivé)	1-2 [#] doses <i>dès 3-6 mois</i>	1-2 [#] doses <i>dès 3-6 mois</i>	1 dose <i>dès 4-6 mois</i>	1 dose <i>dès 4-6 mois</i>	1-2 [#] doses <i>dès 4-6 mois</i>	1-2 ^{**} doses <i>dès 4-6 mois</i>	1-2 ^{**} doses <i>dès 3-6 mois</i>	1-2 [#] doses <i>dès 3-6 mois</i>	1 dose dès la greffe

2.3. Couverture vaccinale après allogreffe de CSH

Les maladies à prévention vaccinale sont responsables d'une morbidité significative parmi les receveurs d'allo-CSH.

Foord et al. ont rapporté que les maladies à prévention vaccinale (*Haemophilus influenzae*, pneumocoques, méningocoques, influenza A/B, VZV ou hépatite B) étaient plus de 30 fois plus fréquentes dans la cohorte de receveurs de greffe de CSH (n=1792, dont 925 allo-CSH, >80% d'adultes) de l'état de Washington/Etats-Unis qu'en population générale (127). Parmi 441 adultes receveurs d'allo-CSH en Australie interrogés en médiane 5 ans après leur allogreffe, 41,7% indiquaient avoir présenté au moins une maladie à prévention vaccinale (syndromes grippaux, 38,4% ; zona, 27,9% ; lésions cervico-vaginales dues aux HPV, 9,8% ; infection à pneumocoque, 5,1% et varicelle, 4,6%) (188).

Dans une autre étude australienne, 19,7% des enfants allogreffés avaient présenté au moins une maladie à prévention vaccinale, les plus fréquentes étant là-aussi la grippe et le zona (189). Aux Etats-Unis, 7,1% des enfants receveurs de greffe de CSH suivis dans une grande cohorte (n=9591) ont dû être hospitalisés au cours des 5 premières années post-greffe en raison d'une maladie à prévention vaccinale, principalement la grippe, la varicelle ou une infection invasive à pneumocoque (190).

Le poids des maladies à prévention vaccinale est donc bien réel. Peu d'études se sont spécifiquement intéressées à la couverture vaccinale des receveurs d'allo-CSH.

Dans leur enquête par sondage, Dyer et al. ont trouvé que seulement 31,8% des receveurs d'allo-CSH avaient reçu l'ensemble des vaccinations recommandées après allo-CSH (188). Au Brésil, une étude parmi 63 patients à minimum 3 ans de leur greffe de CSH (dont 34 allo-CSH) a recensé, après revue des carnets de vaccination, des taux de revaccination entre 63,5% et 86,8% pour les vaccins inactivés, et entre 7,9% et 17,5% pour les vaccins vivants atténués (191). Des proportions similaires avaient été retrouvées pour les vaccins inactivés par Lerchenfeldt et al. (192). En France, les données préliminaires de l'étude COVARISQ, estimant la couverture vaccinale des adultes « à risque » à partir des données de remboursement des vaccins, indiquaient une couverture vaccinale de 41,8% pour la vaccination antigrippale et 12,2% pour la vaccination antipneumococcique parmi les receveurs de greffe de CSH (193).

Ces données suggèrent que les recommandations vaccinales spécifiques aux receveurs d'allo-CSH sont mal appliquées, se traduisant par une vaccination insuffisante de la population des receveurs d'allo-CSH.

Plusieurs hypothèses pour expliquer cette couverture vaccinale insuffisante peuvent être avancées et des pistes d'amélioration proposées :

- Du côté médical, les recommandations peuvent être perçues comme inadaptées à certaines situations particulières (notamment chez les receveurs d'allo-CSH présentant une GvHD active) ou insuffisamment documentées en termes d'efficacité vaccinale et de tolérance. Ceci peut conduire à retarder ou modifier la mise en application du calendrier vaccinal recommandé, par crainte d'une moins bonne efficacité et/ou d'effets secondaires (194). L'observation faite par Ariza-Heredia et al. que les spécialistes hématologues sont généralement familiers des recommandations de revaccination mais ne les appliquent pas systématiquement appuie également cette hypothèse (195).
- Certains spécialistes peuvent en effet ne pas être à l'aise avec ces recommandations de revaccination « universelles », dont la mise en œuvre n'est basée que sur des considérations de délai écoulé depuis l'allo-CSH, sans prendre en compte les paramètres individuels de reconstitution immunitaire adaptative qui pourtant intuitivement déterminent l'immunogénicité vaccinale (196).
- La couverture vaccinale semble particulièrement faible pour les vaccins vivants atténués recommandés, ce qui peut découler du risque, réel ou perçu, de maladie vaccinale, d'un manque de données robustes d'efficacité et de sécurité d'emploi et de recommandations hétérogènes (voir tableau 1).
- Selon les pays et l'organisation de la revaccination des receveurs d'allo-CSH concernant la responsabilité de la mise en application du calendrier de revaccination, la simple méconnaissance (notamment par les médecins généralistes) de l'existence de recommandations spécifiques, relevant du domaine de l'hyperspécialisation, peut être en cause, et ce bien que les recommandations soient disponibles sur internet. Plusieurs auteurs ont souligné dans ce contexte l'intérêt d'une coordination centralisée de la revaccination des receveurs d'allo-CSH, par une équipe médicale dédiée et/ou des infirmiers spécialisés (191,197).
- Enfin, comme en population générale, les receveurs d'allo-CSH peuvent être réticents à se faire vacciner, manquant d'informations ou doutant de l'intérêt de la revaccination après allo-CSH. Dans notre expérience, cette situation est très rare. Le rôle du médecin/professionnel de santé est alors crucial pour conseiller ces patients « hésitants ». Pour la vaccination antigrippale, une étude a souligné que les receveurs de greffe de CSH qui n'avaient pas l'intention de recevoir cette vaccination (23,7%) envisageaient de changer d'avis si leur hématologue leur recommandait personnellement la vaccination (198).

2.4. Optimisation de la revaccination après allogreffe de CSH

Au-delà des efforts pour améliorer la couverture vaccinale, de nombreux auteurs et groupes d'expert ont souligné la nécessité de conduire des études prospectives, multicentriques, pour pallier le manque de données d'immunogénicité et d'efficacité vaccinale à long terme, et, pour les vaccins vivants, de sécurité d'emploi (161,199–201).

Les recommandations de revaccination actuelles ne prennent en compte que le délai écoulé depuis la greffe pour initier une vaccination donnée. Ainsi, la vaccination antipneumococcique par le vaccin conjugué et la vaccination antigrippale en période épidémique sont préconisées dès 3 mois post-greffe, délai dans lequel sont habituellement détectables les premiers LB mémoire « commutés » et coïncidant avec la reprise de la thymopoïèse après allo-CSH (25,59,95,202).

La reconstitution immunitaire progressant continuellement, le temps écoulé depuis l'allo-CSH est un facteur déterminant de l'immunogénicité vaccinale (201). Par exemple, il a été montré que les receveurs d'allo-CSH vaccinés contre le pneumocoque par le VPC dès 3 mois post-greffe, bien qu'obtenant des réponses sérologiques à court terme non-inférieures à celles observées chez des receveurs d'allo-CSH vaccinés à partir de 9 mois post-greffe, avaient des réponses sérologiques moins durables et profitaient moins de l'effet « boost » d'une dose ultérieure de VPP-23 que les patients vaccinés plus tardivement (203,204).

La capacité de répondre à une vaccination et d'établir une mémoire immunitaire spécifique requiert implicitement un niveau minimal de reconstitution de l'immunité adaptative. Or, la progression de la reconstitution immunitaire à un moment donné est extrêmement variable d'un receveur d'allo-CSH à un autre.

Le but est ainsi de trouver, pour un individu receveur d'allo-CSH donné, le moment idéal pour une vaccination donnée, diminuant la période durant laquelle le receveur d'allo-CSH n'est pas protégé tout en assurant une réponse vaccinale suffisante à court et long terme et une bonne tolérance vaccinale. Partant du postulat que le processus de reconstitution immunitaire est individuel et complexe, dépendant de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques au receveur, il semble peu probable qu'une approche de revaccination « universelle », identique pour tous, permette d'obtenir les meilleurs résultats. Il apparaît au contraire comme intéressant de pratiquer une médecine personnalisée en modulant le calendrier vaccinal selon les paramètres de reconstitution immunitaire individuels.

Certains experts ont proposé de baser la décision d'initier les revaccinations post-greffe sur des critères quantitatifs et qualitatifs de reconstitution immunitaire. Parmi les critères suggérés figurent, outre des critères cliniques tels que la présence d'une GvHD sévère ou un traitement par anti-CD20 (rituximab), le taux de LT CD4+ >200/ μ L (mais cette étape peut n'être franchie que tardivement, notamment chez les receveurs d'allo-CSH plus âgés), le taux de LB CD19+ >20/ μ L voire 50/ μ L, un taux normal d'IgG, la présence d'IgA voire une normalisation de la capacité de prolifération lymphocytaire en réponse à la PHA (95,168,205–207). Les IgA sont un marqueur de fonctionnalité lymphocytaire B, dans la mesure où leur présence témoigne de la capacité retrouvée de commutation isotypique et n'est pas influencée par d'éventuelles perfusions d'IgIV (qui n'en contiennent quasiment pas).

Une proposition d'algorithme guidant l'initiation des revaccinations post-greffe par les vaccins polysaccharidiques conjugués et le vaccin antigrippal à partir de 6 mois post-greffe est indiquée figure 9. La supériorité, en termes de réponse vaccinale à court et long terme, d'une approche de revaccination individualisée (guidée par des marqueurs de reconstitution immunitaire) par rapport à une approche universelle (débutant les revaccinations en fonction du temps écoulé depuis la greffe) reste cependant à démontrer.

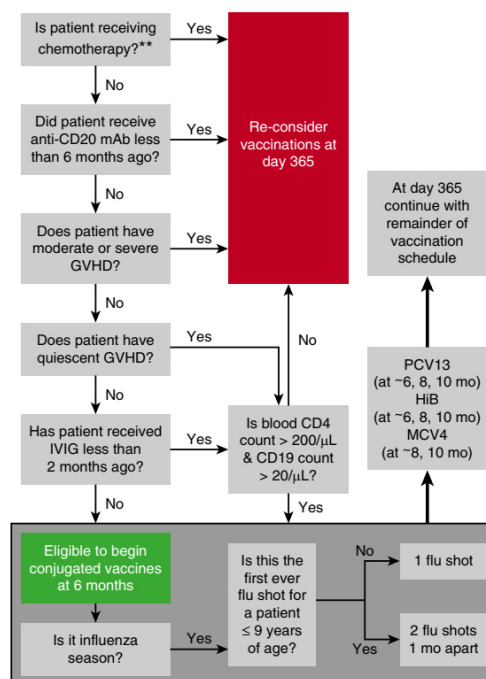


Figure 9. Algorithme proposé par Carpenter & Englund pour décider de l'opportunité d'une revaccination précoce, avant 1 an post-greffe, chez le receveur d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. D'après Carpenter & Englund (205). Abréviations : GVHD, graft-versus-host disease ; HiB, Haemophilus influenzae de type b ; IVIG, immunoglobulines intraveineuses polyvalentes ; mAB, anticorps monoclonal ; MCV4, vaccin antiméningococcique conjugué à 4 valences ; PCV13, vaccin antipneumococcique conjugué à 13 valences.

II. Problématique, hypothèses et objectifs du travail de thèse

Problématique. Assurer une revaccination efficace est un enjeu majeur après allo-CSH pour diminuer la morbi-mortalité liée aux maladies à prévention vaccinale des receveurs d'allo-CSH. Or, peu de données d'immunogénicité et de tolérance des vaccins après greffe de CSH sont disponibles, et les recommandations existantes sont basées en grande partie sur des avis d'expert. L'impact des déterminants de la reconstitution immunitaire adaptative sur la réponse vaccinale est peu documenté et une stratégie de revaccination universelle, basée seulement sur des critères de temps, ne rend pas compte de la complexité et de la singularité du processus de reconstitution immunitaire.

Des études prospectives de la réponse vaccinale et de la reconstitution immunitaire après greffe de CSH sont donc nécessaires, comme souligné en 2017 par le « *National Institutes of Health Hematopoietic Cell Transplantation Late Effects Initiative: The Immune Dysregulation and Pathobiology Working Group Report* » (199).

Enfin, pour répondre à un vaccin ou se défendre contre une infection, un système immunitaire fonctionnel est essentiel, et des outils d'immunologie de précision mesurant la fonctionnalité immunitaire sont nécessaires pour optimiser la prise en charge des patients immunodéprimés.

Les **hypothèses** à l'origine de ce travail étaient les suivantes :

- la réponse vaccinale des receveurs de greffe de CSH, vaccinés en application des recommandations, n'est pas optimale ;
- les caractéristiques de la greffe et les complications post-greffe de CSH (GvHD, infections etc.), déterminants majeurs de la reconstitution immunitaire, influencent la réponse vaccinale ;
- la réponse vaccinale après greffe de CSH est liée aux paramètres de reconstitution immunitaire, tant quantitative que fonctionnelle ;
- la phase de reconstitution immunitaire post-greffe constitue un modèle d'étude pour la mise au point de stratégies d'évaluation de la réponse immunitaire fonctionnelle ;
- le développement de méthodes d'immunomonitoring, évaluant la réponse immunitaire fonctionnelle, constituerait un apport majeur pour la gestion individuelle optimisée de la stratégie de revaccination et du risque infectieux en général des receveurs de greffe de CSH.

Contexte de mise en œuvre de ce travail :

L'actualisation en 2014 des recommandations françaises de « Vaccination des personnes immunodéprimées ou aspléniques », émises par le Haut Conseil de Santé Publique (HCSP), a été l'opportunité de mettre en place, au sein du Service des Maladies Infectieuses et Tropicales des Hospices Civils de Lyon (HCL), une consultation de vaccinologie dédiée aux adultes receveurs d'allo-CSH pour la mise en application du calendrier de revaccination

recommandé. Une première étude de cohorte « VaccHemInf », ayant pour objectif le suivi prospectif de la réponse vaccinale chez les receveurs d'allo-CSH qui nous étaient adressés en consultation par leur hématologue référent (délai depuis la greffe non contrôlé), a été mise en place à cette occasion.

Sur la base des premières données générées par l'étude VaccHemInf, nous avons à partir de 2018 voulu affiner notre approche de la réponse vaccinale et de la reconstitution immunitaire après greffe de CSH, et avons imaginé l'étude translationnelle « VaccHemInf-FIGHT » (pour *Fonctionnalité Immunitaire après Greffe de cellules souches Hématopoïétiques*) : l'étude prospective de la réponse vaccinale y est conduite au plus proche des recommandations (début des revaccinations à environ 6 mois post-greffe), étendue aux receveurs d'autogreffe de CSH (auto-CSH) et avantageusement couplée à une évaluation dynamique de la reconstitution immunitaire, associant des méthodes de mesure quantitative et fonctionnelle.

Objectifs de ce travail :

Dans le cadre de cette thèse ne seront présentées en détail que les données concernant les receveurs d'allo-CSH.

- L'objectif de la première partie de ce travail était de dresser un état des lieux des recommandations et des données d'immunogénicité et de tolérance vaccinale après allogreffe de CSH disponibles au début de cette thèse, à travers une revue narrative.
- L'objectif de la deuxième partie de ce travail était de décrire la réponse et la tolérance au vaccin combiné pédiatrique penta- ou hexavalent DTPCa-Hib±HBV dans la cohorte VaccHemInf (adultes receveurs d'allo-CSH).
- La troisième partie de ce travail portait sur la méthodologie détaillée de l'étude VaccHemInf-FIGHT, dont découlent les travaux de recherche présentés par la suite.
- L'objectif de la quatrième partie de ce travail était d'étudier la reconstitution de l'immunité cellulaire spécifique du VZV par un panel de trois tests de fonctionnalité immunitaire, dont un test innovant basé sur la quantification par RT-PCR de l'ARNm de l'*interféron-γ* (*ifn-γ*).

III. Publications et travaux personnels

1. Premier article : état des lieux de la vaccination après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Titre : Vaccination post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: what is feasible?

Auteurs : Anne Conrad, Vincent Alcazer, Florent Valour and Florence Ader, on behalf of the Lyon HemInf Study Group

Revue : Expert Review of Vaccines

IF/rang : 4,531/C

Référence : Expert Rev Vaccines. 2018 Apr;17(4):299-309

doi : 10.1080/14760584.2018.1449649

Avant-propos :

Les objectifs de cette revue narrative étaient de résumer les recommandations vaccinales après allo-CSH et les données disponibles concernant l'efficacité, l'immunogénicité et la tolérance vaccinale les sous-tendant, ainsi que d'esquisser les principaux enjeux dans le domaine de la vaccination après allo-CSH. Cette revue reprend des concepts développés *in extenso* ci-dessus dans l'introduction.

Nous formulons également dans ce travail les hypothèses à l'origine des études VaccHemInf et VaccHemInf-FIGHT, à savoir l'intérêt d'identifier les caractéristiques cliniques et les paramètres de reconstitution immunitaire quantitative et fonctionnelle associés à l'immunogénicité vaccinale, afin d'optimiser la stratégie de revaccination.

Discussion :

Cette revue narrative reflète l'état de l'art début 2018, au commencement de cette thèse. N'ayant pas été menée selon les règles méthodologiques d'une « revue systématique », elle ne se veut pas exhaustive, et ne reprend pas l'ensemble des données disponibles concernant la vaccination après allo-CSH. Une telle revue systématique a été publiée récemment par Janssen et al. (201).

Depuis la publication de notre revue, d'importantes études ont été publiées dans le domaine de la vaccination après allo-CSH et sont venues compléter les données résumées dans cette revue. Il s'agit principalement d'études concernant la vaccination contre les maladies à prévention vaccinale les plus fréquentes et/ou responsables d'une morbidité importante après allo-CSH. Nous allons présenter ces études ci-dessous afin de compléter le panorama dressé dans la revue narrative.

Concernant la vaccination contre le pneumocoque après allo-CSH, deux publications ont rapporté les résultats d'immunogénicité à long terme de la vaccination antipneumococcique. Les auteurs autour de Langedijk et al. de l'hôpital universitaire d'Amsterdam/Pays-Bas, où la vaccination antipneumococcique par 3 doses de VPC suivies d'une dose de VPP-23 était initiée à 12 mois post-greffe, ont rapporté leur expérience portant sur 103 receveurs d'allo-CSH (dont 68% avec une GvHD chronique), documentant à l'issue du schéma de revaccination 85% de séroprotection (anticorps spécifiques $\geq 0,35$ $\mu\text{g/mL}$) pour les sérotypes du VPC-13 et 62% de séroprotection pour les sérotypes contenus seulement dans le VPP-23 (208).

Le groupe autour de C. Cordonnier a publié ses données de réponse vaccinale à long terme (délai médian 8 ans) après vaccination antipneumococcique selon un schéma comportant au moins une dose de VPC (n=100), rapportant des taux de séroprotection $\geq 50\%$ pour les sérotypes du VPC-7, l'absence de séroprotection étant corrélée entre autres à la présence d'une GvHD chronique (209).

Enfin, une étude australienne a publié pour la première fois des données d'efficacité en vie réelle de la vaccination antipneumococcique après allo-CSH, documentant depuis l'introduction du VPC dans le programme vaccinal post-allo-CSH une diminution significative de l'incidence des infections invasives à pneumocoque (5,6 épisodes / 1000 procédures d'allo-CSH vs 58,3/1000, $p=0,011$) (197).

Dans le domaine de la vaccination antigrippale, Piñana et al. ont analysé des données d'efficacité en vie réelle du vaccin antigrippal inactivé trivalent (IIV3) chez 136 receveurs d'allo-CSH, rapportant des épisodes de grippe saisonnière moins nombreux et moins sévères chez les vaccinés comparativement aux non-vaccinés (210).

Peu d'études ont évalué des stratégies destinées à augmenter l'immunogénicité de la vaccination antigrippale après allo-CSH. Ces études n'ont pas rapporté de bénéfice concluant ni des schémas vaccinaux à 2 doses, ni du vaccin IIV3 adjuvanté, et une seule étude a suggéré de meilleurs taux de séroprotection et des titres d'anticorps plus élevés pour le sous-type A(H3N2) avec le vaccin « high-dose » (60 μg d'hémagglutinine/souche) vs le vaccin standard (211–214).

En ce qui concerne la vaccination contre le VZV, des données ont entre-temps été publiées concernant les vaccins contre le zona après greffe de CSH, qu'il s'agisse du vaccin vivant atténué (Zostavax®, Merck) ou du vaccin inactivé sous-unitaire recombinant adjuvanté (Shingrix®, GSK, indisponible en France).

Un groupe sud-coréen a rapporté une bonne immunogénicité humorale et cellulaire (mesurée par ELISpot) ainsi qu'une bonne tolérance du vaccin vivant contre le zona chez 41 receveurs de greffe de CSH depuis ≥ 2 ans (dont 29 allo-CSH) (215).

Le vaccin inactivé sous-unitaire recombinant a quant à lui montré des performances encourageantes après auto-CSH (efficacité vaccinale de 68,2% en prévention des épisodes de zona) (216). Après allo-CSH, seule une étude a à ce jour rapporté des données de tolérance de ce vaccin, qui est désormais recommandé chez tous les adultes immunodéprimés aux Etats-Unis depuis fin 2021 (217,218).

Par ailleurs, la pandémie de la COVID-19 a donné un coup d'accélérateur majeur à la recherche en vaccinologie, y compris dans les populations particulières et notamment chez les receveurs d'allo-CSH, ayant permis d'accumuler de nombreuses données d'immunogénicité humorale et cellulaire et d'avoir une meilleure compréhension de la réponse vaccinale au niveau mécanistique, quasiment « en temps réel ». Plusieurs équipes ont étudié les vaccins contre le SARS-CoV-2 chez les receveurs d'allo-CSH et ont globalement montré une bonne réponse vaccinale dans cette population (contrairement à d'autres patients immunodéprimés). Le taux de séroconversion après deux doses de vaccins contre le SARS-CoV-2 était de près de 80% et était étroitement lié au délai écoulé depuis l'allo-CSH, augmentant avec le temps (207,219–224).

De façon intrigante, plusieurs groupes ont rapporté des cas de GvHD incidente ou aggravée dans les jours et semaines suivant la vaccination contre le SARS-CoV-2, notamment par les vaccins à ARNm, réputés très immunogènes, ce qui n'avait pas jusqu'alors été rapporté avec d'autres types de vaccin (219,222,223,225,226).

Enfin, nous soulignons dans notre revue l'impact sur la réponse vaccinale de la GvHD, complication dont la temporalité se superpose à celle du calendrier de revaccination. Au-delà d'être intrinsèquement associée à une moins bonne reconstitution lymphocytaire T et B et à un déficit immunitaire humoral fonctionnel, la GvHD implique fréquemment la poursuite d'un traitement immunosuppresseur. Pris ensemble, ces facteurs sont susceptibles de concourir à une moindre immunogénicité vaccinale.

L'effet négatif de la GvHD chronique sur le taux de séroprotection obtenu après administration du VPC-7 et du VPP-23 et le maintien de la réponse vaccinale antipneumococcique à long terme a été rapporté par l'équipe de C. Cordonnier (203,204,209,227). En ce qui concerne la vaccination antigrippale, les données sont plus hétérogènes, certaines études ayant rapporté une diminution de l'immunogénicité du vaccin antigrippal en cas de GvHD chronique et d'autres n'ayant pas retrouvé de telle association, en sachant que la présence d'une GvHD chronique se confond au moins en partie avec d'autres caractéristiques de l'allo-CSH (telles

que la compatibilité HLA, la présence d'un traitement immunosuppresseur), pouvant expliquer ces observations discordantes (211,228–233). Plus récemment, la présence d'une GvHD chronique a également été associée à une moindre probabilité de séroconversion et/ou un niveau d'anticorps plus bas après vaccination anti-SARS-CoV-2 (221,223,224).

L'autre facteur majeur connu pour influencer l'immunogénicité vaccinale est le délai écoulé depuis l'allo-CSH, marqueur de substitution de la progression de la reconstitution immunitaire. L'impact du délai a été documenté concernant la réponse à long terme (mais pas à court terme) à la vaccination antipneumococcique (203,204). Cet effet significatif du délai depuis l'allo-CSH sur la réponse vaccinale a également été rapporté pour les vaccinations antigrippale et anti-SARS-CoV-2, lorsqu'elles sont effectuées au cours de la première année post-greffe (207,222–224,228,229,234,235).

En conclusion, peu d'études ont évalué la réponse et la tolérance des principales revaccinations recommandées après allo-CSH. La GvHD chronique et le délai écoulé depuis la greffe semblent être des facteurs associés à la réponse vaccinale, mais dans quelle mesure d'autres caractéristiques liées à la greffe et les paramètres de reconstitution immunitaire modulent la réponse vaccinale a été peu décrit. La campagne de vaccination contre le SARS-CoV-2 a permis d'apporter des éléments de réponse intéressants. Par ailleurs, la durabilité de la réponse vaccinale après allo-CSH et la nécessité d'envisager des rappels vaccinaux n'est pas connue. Des études prospectives à large échelle de la réponse aux différentes valences vaccinales sont donc requises.

REVIEW



Vaccination post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: what is feasible?

Anne Conrad^{a,b,c}, Vincent Alcazer^{c,d}, Florent Valour^{a,b,c} and Florence Ader on behalf of the Lyon HEMINF Study Group*

^aDépartement de Maladies infectieuses et tropicales, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; ^bCentre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Inserm U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, F-69007, Lyon, France; ^cUniversité Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France; ^dDépartement d'Hématologie clinique, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

ABSTRACT

Introduction: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a major curative treatment option for malignant and non-malignant hematological diseases, but is associated with an increased risk for infections, of which some are preventable by vaccination. Vaccination guidelines recommend repeated doses of most inactivated vaccines to achieve long-lasting immune responses. However, the efficacy of immunization is often hampered by graft-versus-host disease or severe opportunistic infections.

Areas covered: This review summarizes the vaccine recommendations for adult allogeneic HSCT recipients and discusses the challenges and future directions regarding vaccine immunization in these patients.

Expert commentary: Vaccination is a well-tolerated therapeutic intervention to prevent infections after allogeneic HSCT. Allogeneic HSCT recipients could benefit from experience regarding vaccine efficacy capitalized through specific data registries. An individualized immunization approach, modulating inception and intensity of vaccination schedule according to transplant characteristics, transplant-related complications and immune recovery status, might help to improve vaccine efficacy in this specific population. Identification of surrogate markers of the immune status and of vaccine efficacy, beyond antibody testing, as well as development of new vaccines are exciting fields of future research.

ARTICLE HISTORY

Received 17 December 2017
Accepted 5 March 2018

KEYWORDS

Vaccination; hematopoietic stem cell transplantation; immune response; immune reconstitution; Influenza; *Pneumococcus*; vaccine-preventable infection; hyposplenism; chronic graft-versus-host disease

1. Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is currently a widely used form of cellular therapy. It is the only known cure for some malignant and non-malignant hematological diseases such as acute leukemia or thalassemia major that are otherwise refractory to treatment [1–3]. Infections are the most frequent complications after allogeneic HSCT and key players for the overall outcome of recipients [2]. Patients lose protective immunity to vaccine-preventable diseases after allogeneic HSCT. Therefore, revaccination of allogeneic HSCT recipients represents an important strategy for reducing morbidity and mortality associated with these vaccine-preventable infections [4].



However, many issues to vaccinations in the allogeneic HSCT setting remain to be addressed. There are few or no data on some current or future vaccines regarding immunogenicity and safety. The durability of the protective effect is poorly documented for some vaccines, requiring long-term investigations for establishing life-long vaccination strategy. The efficacy of biomarkers conventionally used to measure a protective effect in healthy individuals may not be fully clinically relevant in this immune-altered subset of patients. The impact of transplant-related complications on vaccine efficacy is mostly unknown.

Among them, graft-versus-host disease (GVHD) is of particular interest since its development is contemporaneous to the timetable of vaccinations. Finally, allogeneic HSCT is an evolving cellular therapy with constant changes. Improvements to seek the best outcome possible for recipients require revisiting regularly the practices regarding vaccinations.

We review here the major studies that support vaccine recommendations for adult allogeneic HSCT recipients. We will discuss, according to the current knowledge and our own daily-based experience obtained from a vaccination center dedicated to HSCT recipients, the challenges and future directions that require to be addressed to optimize in the most pertinent manner the benefit of vaccine prophylaxis in allogeneic HSCT recipients.

2. Basic principles of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Allogeneic HSCT is a cellular therapy consisting in the transfer of an immune system from a donor to a recipient through replacement of hematopoietic stem cells. Previously, recipients receive the conditioning regimen consisting of irradiation and/or chemotherapy, which

CONTACT Florence Ader  florence.ader@chu-lyon.fr  Département de Maladies infectieuses et tropicales, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Lyon HEMINF study group members: F. Ader, V. Alcazer, E. Bachy, M. Balsat, F. Barraco, N. Benech, G. Billaud, C. Chidiac, A. Conrad, S. Ducastelle-Leprêtre, O. Dumitrescu, D. Dupont, V. Escuret, T. Ferry, E. Frobert, S. Goutelle, M. Heiblig, H. Labussière-Wallet, M.-V. Larcher, F. Laurent, B. Lina, G. Lina, J. Menotti, P. Miaillhes, G. Monneret, F. Morfin-Sherpa, E. Paubelle, T. Perpoint, M. Rabodonirina, C. Roure-Sobas, G. Salles, C. Sarkozy, A. Sénéchal, X. Thomas, A.T Tovar Sanchez, S. Trouillet-Assant, F. Valour, F. Wallet, M. Wallon, E. Wattel.

purpose is to provide adequate immunosuppression to prevent rejection of the transplanted graft and to eradicate the residual disease. Then, cells containing hematopoietic stem and progenitor cells with or without immune cells (including T, B and natural killer [NK] cells) are infused [1,2]. These hematopoietic cells can be obtained from bone marrow, cytokine-mobilized peripheral blood or umbilical cord blood (UCB). Allogeneic transplants are transplants between individuals of the same species matched on specific HLA alleles. HLA-matched siblings, when available, are usually the first-choice donors for allogeneic HSCT. When such a donor is not available, alternative donors are sought. Different options currently exist among HLA-matched or HLA-mismatched unrelated donors, HLA haplo-identical-related donors, or UCB and are chosen on a case-by-case basis depending on the disease and the graft availability.

While the replacement of hematopoietic stem cells is the primary researched effect in non-malignant diseases (such as thalassemia major, sickle cell disease, or aplastic anemia), the effectiveness of allogeneic HSCT in hematologic malignancies such as leukemia is primarily due to immunologic recognition and elimination of recipient leukemia cells by donor T cells, the so-called graft versus leukemia effect [1,2]. The downside of this mechanism is that donor–recipient contacts of mismatched major histocompatibility complex or minor histocompatibility antigens (immunogenic peptides derived from polymorphic self-proteins) can elicit an immune response that causes either graft rejection or GVHD. GVHD is a multi-organ disease of recipients, mediated by host alloantigen-activated donor T cells attacking the recipient normal tissues (mainly skin, gut, and liver) [2,5,6]. Acute GVHD conventionally occurs before day 100 and engages inflammatory components depending on Th1/th17 lymphocytes. Chronic GVHD occurs after day 100 and is mostly driven by a th2/th17 process (Figure 1). It shares features with autoimmune diseases such as scleroderma, Sjogren’s syndrome, primary biliary cirrhosis, or bronchiolitis obliterans and is associated with functional hyposplenism [7].

3. Immune recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Allogeneic HSCT can be associated with prolonged immunodeficiency post-transplantation, especially after extensive treatment for underlying malignancies and the use of T-cell-depleted grafts. Immune recovery is a highly dynamic process, recently extensively reviewed by Bosch and colleagues [8].

In the absence of GVHD, natural epithelial barriers of the skin, digestive, respiratory, and urinary tracts often recover rapidly after HSCT. If innate immunity cell counts, including neutrophils, monocytes, and NK cells, usually normalize in a few weeks after transplantation, recovery of a normal function of cellular innate immunity requires about 2 months. Considerable time is necessary to reverse functional hyposplenism, as well as complete regeneration of the T- and B-cell compartments, especially when thymopoiesis is blunted owing to age and/or prior therapies [8]. B-cell complete recovery usually takes 12–24 months, especially if a diversified repertoire is expected. Complete reconstitution of the CD4 + T-cell compartment (at least one year) is longer than for CD8 + T cells (6 months).

Immune recovery may be influenced by several factors [8]. Underlying disease, host age, and nutritional status constitute baseline predictors of posttransplant immune reconstitution. The characteristics of transplantation process also greatly impact immune recovery, including the myeloablative degree of the conditioning regimen (dose of chemotherapy, use of total body irradiation and/or anti-lymphocyte antibodies, etc.), the stem cell source (UCB being associated with a greatly impaired immune reconstitution), and HLA matching. Among posttransplant factors, chronic GVHD is one of the major determinants of immune reconstitution of B cells, CD4+ and CD8+ T cells. It also impairs natural immunity through disruption of epithelial barriers. Immunosuppressive agents used for prevention and/or treatment of GVHD participate in delaying immune reconstitution. During this time, patients are subject to opportunistic infections, which may add to immune

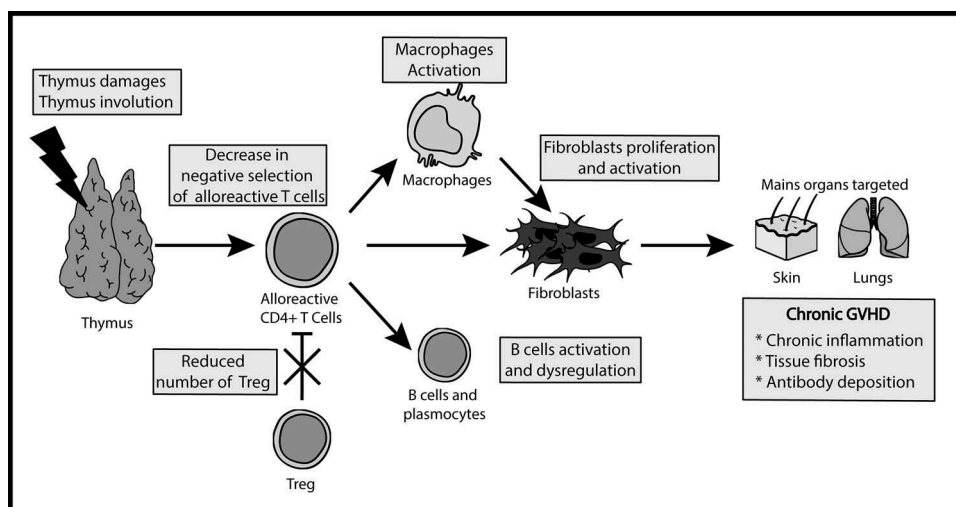


Figure 1. Pathophysiology of chronic GVHD after allogeneic HSCT, adapted from [77].

exhaustion [2,4]. For example, if CMV reactivation is responsible for a clonal expansion of virus-specific cells, it has been associated with an overall dysfunctional immune reconstitution [9].

4. Measurement of vaccine immunogenicity in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients

It is universally accepted that a significant response to vaccination consists in at least a four-fold increase in antibody titers or in achieving a rise in antibody titers that equal or exceed a known protection level [10,11]. These definitions implicitly suppose minimum recovery of B- and T-cell-mediated immunity. Passive transfer of donor immunity to transplant recipients is usually transient. As the concept of vaccination is rooted in immunological memory translating into durable protective immunity, there is no current alternative method that would enable the measurement at the cellular level of functional immune response against immunogenic vaccine antigens. Consequently, routine standardized approaches that would allow testing the vaccine-related differentiation and maintenance of memory T and B cells are not yet available.

5. Vaccination uptake in the setting of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Although difficult to put into routine practice, pre-transplant vaccine-induced immune stimulation of stem cell donors may

participate in improving immune status of allogeneic HSCT recipients. Donor vaccination has been studied for different vaccines and has been recently reviewed by Harris et al. [12]. Further studies are needed before translating such a strategy in routine clinical practice.

There are very few data regarding vaccine uptake after allogeneic HSCT. Due to the complexity of the posttransplantation period, it can be postulated that adherence to existing schedules may be suboptimal. A single-center retrospective survey conducted among allogeneic HSCT recipients between 2010 and 2013 has assessed the percentages of vaccinated recipients during the first year after transplantation. Thirty-eight percent and 60% of recipients received the first series of vaccinations by the recommended 6-month and 12-month posttransplantation, respectively [13]. Withholding vaccinations was mostly related to relapsed disease after transplant, the receipt of anti-CD20 monoclonal antibody in previous 6 months or intravenous immunoglobulin infusions, the occurrence of GVHD (whether acute or chronic), while in 25% of cases no reason was identified. Another study has evaluated the impact of vaccination cards and telephone outreach reminder calls on vaccination adherence of 38 allogeneic HSCT recipients [14]. Vaccination errors were not uncommon, despite telephone calls and vaccination cards. A delayed vaccine beyond due-date and a missed vaccination appointment occurred for 11 (29%) and 12 (31.5%) recipients, respectively. A trend was seen for missing vaccinations as months increased posttransplant. There are currently no data on vaccine hesitancy in HSCT recipients as recently described elsewhere in

Table 1. Recommendations for current vaccinations in allogeneic HSCT adult recipients, adapted from [16–20].

Immunization target	Vaccination schedule
<i>Inactivated vaccines</i>	
<i>S. pneumoniae</i>	– Three doses of PCV13 in monthly intervals, starting 3–6 months post-HSCT – Fourth-dose boost injection with PPSV23 12–18 months post-HSCT, substituted by PCV13 in recipients with chronic GVHD
DTaPP	– Three doses of the pediatric vaccine (DTaPP) in monthly intervals starting 6–12 months post-HSCT – Boost injection with DTaPP 18 months post-HSCT – Lifelong revaccination with dTapP every 10 years – Live attenuated polio vaccine is contraindicated in HSCT recipients
<i>H. influenzae</i> type b	– Three doses of the conjugated Hib vaccine in monthly intervals starting 6–12 months post-HSCT – Boost injection 18 months post-HSCT
Influenza	– One dose of the inactivated trivalent vaccine starting 6 months post-HSCT – In case of ongoing outbreak, reduce the delay between HSCT and vaccination to 3–4 months (in that case, a second dose 4 weeks apart can be proposed) – Lifelong annual vaccination by one dose of the inactivated trivalent vaccine – Vaccination of relatives and health-care workers caring the patient is highly recommended – Live attenuated influenza vaccine is contraindicated in HSCT recipients
Hepatitis B	Vaccination schedules vary according to the country. <i>Option 1:</i> four double-dose (20 µg) injections at 6, 7, 8, and 18 months posttransplantation <i>Option 2:</i> three double-dose (20 µg) injections between 6 and 12 months post-HSCT, followed by three additional injections (with 20 µg standard dose or 40 µg high dose) if the targeted anti-HBs' concentration of ≥10 mUI/mL has not been reached
Hepatitis A	Two doses of the monovalent HAV vaccine 6–12 months apart starting 6–12 months post-HSCT
<i>N. meningitidis</i>	– Two doses of MC4V 6 months apart, starting 6–12 months post-HSCT – Two doses of 4CMenB 1 month apart, starting 12 months post-HSCT
<i>Live attenuated vaccines</i>	
<i>Live attenuated vaccines might be administered after an interval of at least two years after HSCT in patients imperatively fulfilling the condition that neither chronic GVHD nor immunosuppression are ongoing, with immunosuppressive drugs being stopped for at least 3 months</i>	
VZV	– Varicella vaccine: two doses 2 months apart can be proposed in selected seronegative patients – Zoster vaccine is not recommended in HSCT recipients
MMR	One dose can be proposed in selected seronegative patients Some experts recommend a two-dose schedule administered at least 1 month apart
BCG	Tuberculosis vaccine is contraindicated after HSCT

4CMenB, 4-component meningococcal B vaccine; BCG, Bacilli Calmette-Guérin; DTaPP, diphtheria, tetanus, acellular pertussis and poliovirus (with full-dose of diphtheria and acellular pertussis toxoids); dTapP, diphtheria, tetanus, acellular pertussis and poliovirus (with reduced-dose of diphtheria and acellular pertussis toxoids); HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; MC4V, tetravalent meningococcal conjugated vaccine; MMR, measles, mumps and rubella; PCV, pneumococcal conjugated vaccine; PPSV, pneumococcal polysaccharide vaccine; VZV, varicella zoster virus.

the general population [15]. So far, in our experience, among an ongoing cohort of 160 allogeneic HSCT recipients, none has refused to undergo the series of vaccinations, to the exception of four (2.5%) recipients that have namely refused the hepatitis B vaccine [Personal comm, F. Ader].

6. Vaccines after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: efficacy, safety, and tolerability

Vaccination schedules had been proposed by various expert committees (Table 1), based on the limited data available in the specific populations of HSCT recipients regarding epidemiology of vaccine-preventable diseases, as well as efficacy, effectiveness, and safety of vaccines [16–20]. As discussed earlier, immune status of allogeneic HSCT recipients is highly heterogeneous at a given time-point following transplantation, due to wide variations regarding engraftment, chronic GVHD, and the use of immunosuppressive or modulating drugs and/or intravenous substitutive immunoglobulin therapy. Consequently, prediction of individual magnitude and persistence of immunization response is challenging, as well as the elaboration of universal vaccination schedules. Allogeneic HSCT recipients mirror young children in that they respond poorly to pure polysaccharide antigens (e.g. 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine) in comparison with protein antigens (e.g. diphtheria toxoid) or polysaccharide-protein conjugates (e.g. *Haemophilus influenzae* b capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein). Moreover, allogeneic HSCT recipients receiving anti-CD20 monoclonal antibody should have their vaccine program delayed at least 6 months after the last dose [20], as such treatment greatly reduces the vaccine response [21,22].

The few available studies regarding vaccine tolerance in immunocompromised hosts suggest that inactivated vaccines usually have the same tolerance profile than in immunocompetent individuals [23]. In particular, there is no evidence that vaccination triggers or worsens GVHD [24]. On the contrary, live-attenuated vaccines are contraindicated in immunosuppressed patients due to their potential for causing severe vaccine-induced diseases. Generally speaking, such vaccines might be administered after an interval of at least two years after HSCT in patients imperatively fulfilling the condition that neither chronic GVHD nor immunosuppression are ongoing, with immunosuppressive drugs being stopped for at least 3 months [16–20].

6.1. Pneumococcal vaccines

Allogeneic HSCT recipients are at risk for developing invasive pneumococcal infections due to functional hyposplenism and difficulty to produce *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*)-specific opsonizing antibodies, as a result of combined effects of pre-transplant conditioning, incomplete immune reconstitution, and/or chronic GVHD [25–28]. The estimated incidence of pneumococcal invasive diseases in HSCT recipients exceeds 300 cases per 100,000 persons per year, corresponding to a 30-fold higher risk compared to the general population [26]. Thus, following the year posttransplantation, pneumococcal invasive diseases highly contribute to mortality

of infectious origin in the HSCT setting [27]. Beyond the risk of acute pneumonia, *S. pneumoniae* represents one of the most important causes of bloodstream infections in the post-engraftment period [29], and is the primary etiologic agent of bacterial meningitis after HSCT [30]. Of note, most of the pneumococcal serogroups responsible for invasive disease in a French cohort of HSCT recipients were included in the current available vaccines [31].

The T-cell-independent 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23) alone is usually ineffective during the first year following transplantation, especially in case of chronic GVHD [32]. The more recently developed pneumococcal conjugate vaccines (PCV), which are T-cell-dependent, provide a stronger immune response in HSCT recipients, even in case of incomplete immune reconstitution [23,33,34]. A three-injection series of the 7-valent PCV had shown to be immunogenic, with a response rate ranging from 54% to 98% whether the immunization is started early (3 months) or late (9 months) after transplantation [33]. Furthermore, a subsequent additional dose of PPSV23 results in a booster effect regarding the serotypes included in the PCV and broadens the coverage to supplementary serotypes [33,35]. Moreover, this prime-boost strategy balanced the shorter protection duration observed in patients vaccinated early (3 months) after transplantation [33]. As patients with chronic GVHD are less likely to respond to PPSV23, a fourth dose of PCV can replace the PPSV23 boost injection [36]. More limited data are available regarding the 13-valent PCV (PCV13) in the specific population of HSCT recipients. In an uncontrolled trial, a four-dose PCV13 series showed to be highly immunogenic [37]. Consequently, expert committees recommended that PCV13 could replace the heptavalent vaccine in current vaccination schedules.

In summary, and according to current guidelines, all HSCT recipients should be vaccinated against invasive pneumococcal diseases starting 3–6 months posttransplantation with three doses of PCV13 in monthly intervals, followed by an injection of PPSV23 given 12–18 months after HSCT [16–20]. In patients with chronic GVHD, the last PPSV23 injection should be replaced by a fourth dose of PCV13 according to their anticipated lack of response to non-conjugated vaccines. No large data support recommendations after this initial schedule, but may be guided by the monitoring of antibody titers to the main pneumococcal serotypes [20].

6.2. Influenza vaccine

The specific threat of influenza among HSCT patients has been well documented during the 2009 influenza A/H1N1 pandemic, as well as during consecutive seasonal influenza epidemics. It showed an increased risk of subsequent bacterial pneumonia, hospital admission, mechanical ventilation requirement, and mortality [38,39]. The effectiveness of a standard single-dose regimen of trivalent influenza inactivated vaccine has been demonstrated, reducing the risk of proven influenza when given at least 6 months after HSCT [39,40]. Several predictors of poor immune response to influenza-inactivated vaccine had been highlighted, including shorter time between transplantation and vaccination [21,41], a low lymphocyte count and/or immunoglobulin level at vaccination

[42], chronic GVHD, and the use of immunosuppressive/modulating drugs including calcineurin inhibitors or anti-CD20 monoclonal antibody in the past 12 months [21,41,42].

The need of a second dose is still debated [43,44], partly due to an insufficient correlation of serological response with effectiveness, as protective T-cell response can be observed even in serological non-responders [40]. The second dose may be interesting in early-vaccinated recipients prior to 6 months posttransplantation [43,44]. The use of high-dose trivalent inactivated influenza vaccine has been proposed as a safe and effective strategy to improve influenza vaccine response of HSCT [45], but is currently not recommended. Adjuvanted vaccines had been poorly evaluated in the specific population of HSCT recipients but may also enhance immune response [46]. Finally, live attenuated influenza vaccine should not be administered because of its potential risk in such immunocompromised hosts.

Thus, lifelong annual vaccination of all HSCT recipients with a single dose of the trivalent influenza inactivated vaccine is recommended, ideally starting 6 months after HSCT [16–20]. In case of ongoing outbreak, the interval for the vaccine injection can be shortened to 3–4 months after transplantation. In this last case, a second dose can be proposed 4 weeks after the initial one [16,18,20]. Importantly, vaccination of relatives and health-care workers caring HSCT recipients is highly recommended.

6.3. *Haemophilus influenzae type b (Hib) vaccine*

Although the risk of Hib invasive infections after HSCT has not been evaluated, it may be increased as for other encapsulated bacteria. Moreover, Parkkali et al. showed that HSCT recipients immunized before transplantation lose protective immunity to Hib within the semester following transplantation [47]. On the other hand, conjugate Hib vaccine has shown to be safe and to elicit protective immunity as early as 6 months post-HSCT [32,48]. Immunization response does not seem to be impacted by GVHD, the use of immunosuppressive drugs or time to vaccination between 4 and 18 months post-HSCT [48]. Consequently, current guidelines recommend the administration of three doses in monthly intervals starting at 3–12 months posttransplantation [16–20]. In order to decrease the overall number of vaccine doses, three doses of the DTPaP-Hib combined vaccine can be recommended from 6 months after transplant. Some experts recommend re-vaccination at 18 months after HSCT [16,17], which can be usefully guided by the assessment of specific antibody titers [20].

6.4. *Tetanus, diphtheria, and pertussis vaccines*

The increased incidence of pertussis in the general population due to insufficient vaccination coverage may expose HSCT recipients to the disease [49]. No specific investigation regarding pertussis after HSCT exist, so it is unknown whether and during which phase *B. pertussis* infection may occur in recipients of allogeneic HSCT and whether it may cause more severe respiratory infection [50]. Nevertheless, pertussis is responsible for notable morbidity in immunocompetent adults and HSCT recipients may benefit, in times of insufficient herd immunity, from re-immunization by the well-tolerated

pertussis vaccine [50]. As extremely rare in developed countries, there is no existing data regarding the specific risk of tetanus and diphtheria in the population of HSCT recipients. However, the loss of immunity to tetanus and diphtheria after HSCT is well documented, and a majority of the seropositive patients at the time of transplantation will turn negative by 2 years posttransplant [47].

After transplantation, revaccination by an average of three doses has shown to result in long-term seroprotection [51]. However, response to the conventional adult vaccine containing standard dose of tetanus toxoid combined with reduced doses of diphtheria and acellular pertussis toxoids (dTap) is weak regardless of the delay from HSCT [52]. Contrary to previously vaccinated immunocompetent adults, the tolerance profile of the vaccine containing the full dose of diphtheria and acellular pertussis toxoid (DTaP) is acceptable in HSCT recipients [53]. Moreover, three doses are needed to confer an acceptable response. Consequently, and according to current guidelines, HSCT recipients should receive three doses 1 month apart of the pediatric formulation vaccine (DTaP), starting 6–12 months after transplantation [16–20]. Some experts recommend a boost injection 18 months post-HSCT [16,17]. A lifelong re-immunization with reduced doses of diphtheria and pertussis (dTap) is preconized every 10 years.

6.5. *Polio vaccine*

As described for tetanus and diphtheria, HSCT recipients progressively lose poliovirus protective antibodies after transplant, especially in case of acute GVHD [54]. There is currently no published data regarding the specific risk of poliomyelitis in the specific population of HSCT recipients. The usual three-dose vaccination schedule has been shown to be safe and efficient in this population, with a similar immunogenicity when started at 6 months compared to 18 months posttransplant [54,55]. However, a more rapid decrease in protective antibodies titers has been described in patients with chronic GVHD [55].

According to current guidelines, all HSCT recipients should receive three doses 1 month apart of the inactivated polio vaccine starting 6–12 months after transplantation [16–20]. A boost injection is proposed 18–24 months after HSCT [16,17]. In order to reduce the number of injection, the pediatric vaccines combining diphtheria, tetanus, poliomyelitis, and pertussis (DTPaP) can be used. Of note, the live attenuated polio vaccine is contraindicated in HSCT recipients as well as in relatives.

6.6. *Recombinant hepatitis B virus (HBV) vaccine*

HBV can cause severe hepatitis following HSCT, although the incidences of HBV-related cirrhosis and hepatocellular carcinoma are not higher in HSCT recipients than in general population [56]. If donors are either naturally immune or have received HBV immunization prior to donation, HSCT allows a transfer of immunity to HBV to the recipients, which can prevent new HBV infection and even lead to the clearance of a preexisting HBV infection in the recipient [57]. However, HBs-antibody positive recipients progressively lose their immunity after HSCT. Additionally, HBV-naïve recipients

of HBV-naïve donors' stem cells continue to be at risk for HBV infection. Although lower than in immunocompetent adults, immunization response exceeds 60% in HSCT recipients [58]. However, the number of required injections and antigen dose per injection are still debated [59]. Some guidelines recommend the administration of four double-dose (20µg) injections at 6, 7, 8, and 18 months post-transplantation [16,17], while others advise a three-injection schedule between 6 and 12 months posttransplantation, followed by three additional injections (with 20µg standard dose or 40µg highdose) if the targeted anti-HBs' concentration of ≥ 10 mIU/mL has not been achieved [18,19]. In a pragmatic way, three doses of the combined DTPaP-Hib-HBV vaccine can be proposed from 6 months after transplant in order to reduce the overall number of vaccine injections. In all cases, post-vaccine anti-HBs' level must be monitored 1–2 months after the first three-dose series to determine if further injections are required.

6.7. Hepatitis A virus (HAV) vaccine

The loss of HAV antibodies after HSCT is well documented, including among naturally immunized patients [60]. There are few data regarding the HAV vaccine immunogenicity and safety among HSCT recipients. However, in a clinical study along with literature overview regarding HAV vaccination in immunosuppressed travelers including 13 HSCT recipients, response rates were acceptable, with a good safety profile [61]. Given the risk of HAV infection in residents of or travelers to high HAV endemic areas and the risk of outbreaks in regions of low endemicity, vaccination of HSCT recipients must be discussed. To date, the need for hepatitis A vaccination is covered by only one set of guidelines, recommending the administration of two doses of the monovalent HAV vaccine 6–12 months apart, starting 6–12 months after transplantation [17]. A four-dose schedule using the combined HAV-HAB vaccine can be an alternative.

6.8. Meningococci vaccines

There is little data regarding the risk of meningococcal invasive disease in the specific population of allogeneic HSCT recipients. In a nationwide prospective cohort study on community-acquired meningitis in the Netherlands, the risk of bacterial meningitis was found to be 30-fold higher in patients with history of HSCT compared to others, and *Neisseria meningitidis* was the second etiologic agent after *S. pneumoniae* [30].

The efficacy of the tetravalent (A, C, Y, W135) conjugated meningococcal vaccine (MCV4) has been evaluated in two studies, showing a moderate response after one dose administered at 8 or 20 months posttransplantation, with a rapid decrease in antibodies titers that were divided by half at 6 months [22,62]. The few patients receiving two doses had better serological response [22]. After three doses of meningococcal C conjugated vaccine (MCVC) given at 1-month interval from 12 to 18 months after allogeneic HSCT, response rate was 100% in a prospective trial [63]. Consequently, the administration of two doses of MCV4 6 months apart, starting 6–12 months after transplantation, is currently proposed by most international guidelines [16,18,20].

Some experts propose MCVC as an alternative [20]. The recently developed four-component meningococcal B (4CMenB) vaccine has not been evaluated in HSCT recipients. However, addressing the theoretically high-risk of HSCT recipients to develop invasive meningococcal infections, French health-care authorities recommend two doses of 4CMenB 1 month apart, starting 12 months after HSCT [16].

6.9. Human papilloma virus (HPV) vaccines

In series showing long-term follow-up after HSCT, female survivors appear to present an increased risk of HPV-induced cervical dysplasia [49]. HPV infection can also be an important concern in immunosuppressed males [64]. Despite the absence of data regarding HPV vaccination in HSCT recipients, the administration of a three-doses series of HPV vaccine should be considered [16,20]. The targeted population varies according to guidelines, including both male and female patients in most cases [17,19], while French recommendations restrict the indication to female individuals [16]. Age of the eligible population also varies according to countries, ranging from 9–19 [16] to 11–26 year-old [19].

6.10. Varicella-zoster virus (VZV) vaccines

VZV is responsible for an important risk of dermatomal reactivation and disseminated disease after HSCT [65]. Some data are available regarding the safety of varicella vaccine administered in patients meeting the criteria for live-attenuated vaccinations [66]. However, the indication of such a vaccination should be made with caution with regard to the description of some fatal cases of vaccine-induced disease probably related to an occult persisting immunosuppression state [67]. Some guidelines propose two injections 2 months apart of the varicella vaccine in selected seronegative patients [20]. Of note, even if they are not currently available, inactivated VZV vaccines have been evaluated and seem promising [68].

The use of the live attenuated zoster vaccine, containing at least 14-fold more virus than varicella vaccine, is currently contraindicated in allogeneic HSCT recipients. Nevertheless, the use of this vaccination beyond 24 months after transplantation and in GVHD-free patients was safe and associated with a reduced risk of reactivation [69]. However, some cases of fatal disseminated infections have been reported after live attenuated zoster vaccine in HSCT patients [70]. Inactivated zoster vaccine has been evaluated among autologous HSCT recipients, showing clinical effectiveness with a good tolerance profile [71,72], but remains to be evaluated in larger series and in allogeneic HSCT recipients. The safety of the currently available adjuvanted zoster vaccines had not been studied in HSCT recipients, but such strategies of vaccine responsiveness improvement may continue to emerge.

6.11. Measles, mumps, and rubella (MMR) vaccine

MMR antibody titers are known to decline gradually after HSCT, especially in previously vaccinated patients compared to those who experienced natural measles before transplantation [73]. Even if the risk of MMR in HSCT patients has not

specifically been evaluated, the context of worldwide outbreaks of measles and mumps due to insufficient vaccination coverage in the general population led to some severe and even fatal cases in HSCT recipients [74]. MMR vaccine can be administered safely to seronegative HSCT recipients meeting the criteria allowing live-attenuated vaccinations, with a good efficacy [63,75]. Current guidelines recommend the administration of one dose of the combined MMR vaccine in seronegative adults at least 24 months after transplantation, and in the absence of contraindication (active GVHD, immunosuppressive treatment, underlying disease relapse) [20]. However, the number of required doses is controversial, as some experts recommend the administration of two doses injected at least one month apart [16,19].

7. What is the impact of chronic graft versus host disease on immune response to vaccinations after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation?

Currently, between 30% and 70% of adult HSCT recipients develop chronic GVHD depending upon donor and transplant characteristics [76]. Multicenter and registry statistics show an aggregate cumulative incidence of 30–50% [5,6]. Manifestations typically appear within the first year after allogeneic HSCT, when doses of immunosuppressive medications are weaned. The disease can begin as early as two months and rarely beyond 12 months after HSCT (<10% of recipients) [5,6]. Although not fully understood, active chronic GVHD may be appropriately summarized as a failure of immune tolerance mechanisms mediated by activation and expansion of CD4+ T cells directed against self-antigens. It is postulated that alloreactive CD4+ T-cell clones may arise when maturation of donor precursor cells occurs in a damaged, dysfunctional recipient thymus resulting in escape from central negative selection [77]. Deviation of immune polarization results in proliferation and activation of tissue fibroblasts associated with a low number of regulatory T cells and B-cell dysfunction. B-cell dysfunction generates autoreactive B cells and the downstream production of autoreactive antibodies (Figure 1).

In the profoundly lymphopenic environment of the immediate posttransplantation setting, thymic-independent T-cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells. This provides an opportunity to expand the T-cell repertoire by engaging the available MHC class I and class II molecules with peptides of particular interests, including vaccine peptides. However, studies have shown that the early posttransplantation repertoire adopts an oligoclonal pattern based on evidence of limited diversity with skewing of the T cells toward host, leukemia, and viral antigens [78]. Thus, GVHD clones participate in clonal T-cell expansions and shape the T-cell recovery in the first months posttransplantation, to the point that GVHD clones can ‘dominate’ the T-cell compartment, as described in a patient with severe GVHD [79]. Eventually, a successful transplant outcome requires that the donor graft develops tolerance to recipient self-antigens while maintaining the ability to detect and respond effectively to an even broader array of foreign antigens, such as vaccine antigens. The prevalence of functional hyposplenism after allogeneic HSCT in the setting of chronic GVHD ranges from 15% to 40% [7]. Finally,

chronic GVHD treatment is based on immunosuppressive agents. Corticosteroids remain the standard first-line therapy. Nearly 50% of recipients experience steroid-refractory chronic GVHD with inadequate control requiring second-line treatment including tacrolimus, calcineurin inhibitors, extracorporeal photopheresis, and other immunotherapies currently under evaluation [77,80]. Still, chronic GVHD is a heterogeneous complication with different degrees of severity, from slight/moderate (limited) grades controlled by a single line of treatment to severe (extended) grade requiring multiple intensive immunosuppressive therapies.

Although it is proven that allogeneic HSCT recipients with chronic GVHD can mount responses to conjugate pneumococcal vaccines, all the factors described above may contribute in mitigating vaccine response. So far, very few vaccine immunization studies have addressed the impact of active chronic GVHD. Most studies were performed with pneumococcal conjugate vaccine and included a low number of recipients with chronic GVHD, mostly limited [33,35,37]. Other studies did not include active chronic GVHD recipients in the analyses of factors potentially affecting the immune response. Poor antibody responses have been reported after vaccination with pure polysaccharide-based vaccines in HSCT recipients [23]. However, even if patients might not develop ‘standard’ immunization, a degree of vaccine response can be induced by vaccination, capable of mitigating severity of some vaccine-preventable diseases, especially in patients with slight to moderate GVHD who do not require intensive immunosuppressive therapy.

At this point, in patients with ongoing active or resolved chronic GVHD, international guidelines do not recommend postponing vaccinations with inactivated vaccines [4]. In contrast, live vaccines are contraindicated in HSCT recipients with active GVHD, ongoing immunosuppression, or relapse of the underlying disease [20]. Data are still insufficient to provide vaccination schedules that may take into account active chronic GVHD treatment approaches such as combination of several immune suppressive agents and/or the use extracorporeal phototherapy. It is advised to measure the specific antibody levels before and after vaccination during active chronic GVHD in order to document the achievement of levels of protection [4]. Thus, prospective, multicenter cohort studies designed to monitor vaccine response according to hematological and transplant-related characteristics are needed.

8. Summary of vaccination guidelines after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Table 1 summarizes the recommendations for vaccinations in allogeneic HSCT recipients adapted from [16–20].

9. Expert commentary

Allogeneic HSCT recipients are unique patients who cover an entire immune spectrum over the course of their disease, from a state of nearly complete immune suppression to an expected full immune recovery. Current international guidelines for vaccinations in allogeneic HSCT are important to capitalize experience and data registries including immune

response profiles to vaccines, and vaccine true efficacy (impact on the incidence of vaccine-preventable diseases).

Vaccine optimization after allogeneic HSCT opens the way for many innovative approaches that may subsequently benefit to many other kinds of patients with immune deficiency. First, it is our belief that an individualized approach conducted by a vaccination center with trained physicians in the field of transplantation is the key to optimize vaccination uptake and adherence of recipients and their relatives. Vaccine hesitancy is not documented so far in transplant recipients (and more broadly, in immune compromised patients), and our experience confirms that this field of activity is spared from the controversy. However, recipients and their relatives ask many questions related to vaccine efficacy and safety that need to be genuinely answered in order to create the confidence required by the intensive vaccination schedule. Taking time to explain the concept of vaccination, as a way to 're instruct' the immune system and a path to positively stimulate immune recovery is unequivocally useful to preserve recipients and their relatives from skepticism toward vaccines. Secondly, identification of new surrogate markers of the immune status after allogeneic HSCT and their correlations with infection susceptibility are important exploratory studies to be carried out in the future. In other words, advances in immunology allow us to challenge the paradigm that antibody titers are the only readout of the immune system's ability to oppose a restrictive response to the development of some vaccine-preventable infections. Testing cohorts of allogeneic HSCT recipients with methods such as extensive immunophenotyping, functional assays, and characterization of interactions between vaccines-related immune responses and host gene signatures are exciting new fields of translational research. Such research should address the issue of when is the most appropriate time to start vaccinations, as previously underscored elsewhere [11]. It may as well greatly improve our understanding of vaccine efficacy according to hematological characteristics and consequently lead to an individualization of vaccine timetables linked to each recipient profile. In our view, a particular focus should be given to differences related to stem cell source, the impact of posttransplant severe opportunistic infections on immune recovery, and, by extent, vaccine efficacy. Consistently, the impact of active chronic GVHD on vaccine efficacy also needs to be addressed as the promoter of immune qualitative and quantitative alterations over time. It can be inferred that immunomodulatory and/or immunosuppressive interventions designed to improve recipients' outcome and quality of life during active chronic GVHD have an impact on vaccine efficacy. It is important to develop scores to identify those recipients who would benefit most from adapted vaccine schedule.

With the progresses in recipients' life expectancy, long-term vaccination coverage will likely become problematic, especially in those who have presented post-transplant complications that altered immune recovery (such as severe opportunistic infections and/or chronic GVHD). This reflects a marked heterogeneity, with distinct immunological and

molecular patterns of recovery, resulting in diverse clinical courses, prognosis, and, ultimately, various possibilities of booster immunization options on the long run. Finally, the new trajectories of patients undergoing complex diagnostic and treatment procedures based on innovative therapies and subsequently requiring lifelong follow-up raise important challenges in the field of vaccinations for recipients of transplantation: what should be long-term vaccine attitudes toward relatives and work environment? How to adequately manage travel vaccines after transplantation? Finally, there is a need to develop psychology and social sciences of vaccine perceptions in such specific subsets of patients and their relatives.

10. Five-year view

As the number of allogeneic HSCT recipients is increasing, studies will give insights on whether the cutoffs of antibody titers established through large immunization series in healthy children apply universally to allogeneic HSCT recipients. Further data will be produced on vaccine efficacy according to hematological characteristics and transplant-related complications. Furthermore, differences in immunogenic capacity of each vaccine exhort to propose trials testing higher dose immunizations, as previously or currently investigated in other settings (e.g. double-dose of inactivated quadrivalent influenza vaccine in children or double-dose of recombinant hepatitis B vaccine in HIV-infected individuals).

The new vaccine pipeline is expected to deliver in the near future results regarding candidate vaccines targeting two important opportunistic pathogens with regards to the allogeneic HSCT setting: cytomegalovirus and syncytial respiratory viruses. Candidate vaccines are currently under evaluation in phase II and III trials.

Key issues

- Vaccination is an important therapeutic intervention for improving standards of care of allogeneic HSCT recipients by reducing morbi-mortality due to vaccine-preventable diseases in this vulnerable population.
- Nevertheless, assessing the raw impact of vaccine-induced immunization after allogeneic HSCT on the incidence of vaccine-preventable diseases (true efficacy) is challenging due to the large number of patients required to affirm prevention of a specific infection or disease.
- Efficacy of vaccine immunization of allogeneic HSCT recipients largely depends on their immune reconstitution, itself determined by disease- and transplant-related factors (underlying disease, conditioning regimen, stem cell source) as well as transplant-related complications (GVHD, opportunistic infections). Chronic GVHD is a central issue to vaccine immunogenicity and efficacy after allogeneic HSCT.
- Vaccine immunogenicity also relies on vaccine composition, allogeneic HSCT recipients displaying poor responses to pure polysaccharide antigens in comparison with protein antigens or polysaccharide-protein conjugates generating a more robust immune response. Consequently, more

immunogenic vaccines using the protein-polysaccharide conjugation should be developed. In addition, further studies are needed to determine whether higher dose immunizations (especially for influenza) could increase the immunogenicity and remain well tolerated.

- Assessment of vaccine efficacy relies on correlates of protection, currently based on antibody titers, which only reflect the humoral response to vaccine antigen. Surrogate biomarkers, assessing both humoral and cellular immune response, as well as immune memory, have to be specifically developed in the allogeneic HSCT setting in order to evaluate immune response to vaccine-/pathogen-driven antigens. Altogether, identification of transplant-related factors associated with poor vaccine response and new biomarkers will permit the optimization of vaccine efficacy.
- Trials evaluating vaccination with live attenuated vaccines against varicella, measles, mumps and rubella are needed. Vaccination at 24 months post-transplant is arbitrary. Studies are expected to clarify the appropriate timing depending on transplant-related factors and immune reconstitution rate. Trials are also needed to determine the timing and number of vaccine doses required to protect hematopoietic cell transplant recipients against the human papilloma vaccine and the conjugated meningococcal vaccine.
- Because of decreased vaccine efficacy and contra-indication of live attenuated vaccines in allogeneic HSCT recipients, correct immunization of their relatives is of outstanding importance, especially against Influenza, varicella (in seronegative individuals) and pertussis, according to the cocooning strategy.
- Future research will have to evaluate long-term protection in allogeneic HSCT recipients.

Acknowledgments

We apologize to hundreds of colleagues worldwide whose excellent studies and reports we were unable to cite in this review because of space constraints. The authors thank Dr. Aydee-Tamara Tovar Sanchez, Dr. Sophie Trouillet-Assant, Pr. Gilles Salles, and Pr. Christian Chidiac.

Funding

The manuscript was not funded.

Declaration of interest

The 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. Peer reviewers on this manuscript have no relevant financial or other relationships to disclose.

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (*) or of considerable interest (**) to readers.

1. Li HW, Sykes M Emerging concepts in haematopoietic cell transplantation. *Nat Rev Immunol* 2012;12:403–416.

•• Excellent general review of hematopoietic stem cell transplantation.

2. Apperley J, Carreras E, Gluckman E, et al. The 2012 revised edition of the EBMT-ESH Handbook on Haematopoietic Stem Cell Transplantation [Internet]. 6th ed. 2012. Available from: <https://ebmtonline.forumservice.net>
3. Baronciani D, Angelucci E, Potschger U, et al. Hemopoietic stem cell transplantation in thalassemia: a report from the European Society for Blood and Bone Marrow Transplantation Hemoglobinopathy Registry, 2000-2010. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51:536–541.
4. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2009;15:1143–1238.
5. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, et al. National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2015;21:389–401.e1.
6. Lee SJ Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2017;129:30–37.
7. Cuthbert RJ, Iqbal A, Gates A, et al. Functional hyposplenism following allogeneic bone marrow transplantation *J Clin Pathol* 1995;48:257–259.
8. Bosch M, Khan FM, Storek J Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2012;19:324–335.
9. Suessmuth Y, Mukherjee R, Watkins B, et al. CMV reactivation drives posttransplant T-cell reconstitution and results in defects in the underlying TCRβ repertoire. *Blood*. 2015;125:3835–3850.
10. Small TN, Cowan MJ Immunization of hematopoietic stem cell transplant recipients against vaccine-preventable diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2011;7:193–203.
11. Kennedy LB, Li Z, Savani BN, et al. Measuring immune response to commonly used vaccinations in adult recipients of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2017;23:1614–1621.
12. Harris AE, Styczynski J, Bodge M, et al. Pretransplant vaccinations in allogeneic stem cell transplantation donors and recipients: an often-missed opportunity for immunoprotection? *Bone Marrow Transplant*. 2015;50:899–903.
13. Ariza-Heredia EJ, Gulbis AM, Stolar KR, et al. Vaccination guidelines after hematopoietic stem cell transplantation: practitioners' knowledge, attitudes, and gap between guidelines and clinical practice. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc* 2014;16:878–886.
14. Lerchenfeldt SM, Cronin SM, Chandrasekar PH Vaccination adherence in hematopoietic stem cell transplant patients: a pilot study on the impact of vaccination cards and reminder telephone calls. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc* 2013;15:634–638.
15. Salmon DA, Dudley MZ, Glanz JM, et al. Vaccine hesitancy: causes, consequences, and a call to action. *Vaccine*. 2015;33 Suppl 4:D66–71.
16. Haut Conseil de Santé Publique. Vaccination des personnes immunodéprimées ou aspléniques, 2e édition [Internet]. 2014. Available from: <http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdoaine?clefr=504>
17. Hilgendorf I, Freund M, Jilg W, et al. Vaccination of allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients: report from the international consensus conference on clinical practice in chronic GVHD. *Vaccine*. 2011;29:2825–2833.
18. Ljungman P, Cordonnier C, Einsele H, et al. Vaccination of hematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:521–526.
19. Rubin LG, Levin MJ, Ljungman P, et al. 2013 IDSA clinical practice guideline for vaccination of the immunocompromised host. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2014;58:309–318.
20. 7th european conference on infections in leukaemia guidelines for vaccination of patients with hematological malignancies and HSCT recipients [Internet]. 2017. Available from: <http://www.ecil-leukemia.com>.

- **Details the most recent international guidelines for revaccination of patients following autologous and allogeneic HSCT.**
- 21. Issa NC, Marty FM, Gagne LS, et al. Seroprotective titers against 2009 H1N1 influenza A virus after vaccination in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* **2011**;17:434–438.
- 22. Mahler MB, Taur Y, Jean R, et al. Safety and immunogenicity of the tetravalent protein-conjugated meningococcal vaccine (MCV4) in recipients of related and unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* **2012**;18:145–149.
- 23. Kumar D, Chen MH, Welsh B, et al. A randomized, double-blind trial of pneumococcal vaccination in adult allogeneic stem cell transplant donors and recipients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **2007**;45:1576–1582.
- 24. Engelhard D, Zakay-Rones Z, Shapira MY, et al. The humoral immune response of hematopoietic stem cell transplantation recipients to AS03-adjuvanted A/California/7/2009 (H1N1)v-like virus vaccine during the 2009 pandemic. *Vaccine* **2011**;29:1777–1782.
- 25. Engelhard D, Cordonnier C, Shaw PJ, et al. Early and late invasive pneumococcal infection following stem cell transplantation: a European Bone Marrow Transplantation survey. *Br J Haematol* **2002**;117:444–450.
- 26. Kumar D, Humar A, Plevneshi A, et al. Invasive pneumococcal disease in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: a decade of prospective population-based surveillance. *Bone Marrow Transplant* **2008**;41:743–747.
- 27. Torda A, Chong Q, Lee A, et al. Invasive pneumococcal disease following adult allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc* **2014**;16:751–759.
- 28. Kulkarni S, Powles R, Treleaven J, et al. Chronic graft versus host disease is associated with long-term risk for pneumococcal infections in recipients of bone marrow transplants. *Blood* **2000**;95:3683–3686.
- 29. Gudiol C, Garcia-Vidal C, Arnan M, et al. Etiology, clinical features and outcomes of pre-engraftment and post-engraftment bloodstream infection in hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant* **2014**;49:824–830.
- 30. van Veen KEB, Brouwer MC, van der Ende A, et al. Bacterial meningitis in hematopoietic stem cell transplant recipients: a population-based prospective study. *Bone Marrow Transplant* **2016**;51:1490–1495.
- 31. Debbache K, Varon E, Hicheri Y, et al. The epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in onco-haematology and haematopoietic stem cell transplant patients in France. Are the serotypes covered by the available anti-pneumococcal vaccines? *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* **2009**;15:865–868.
- 32. Parkkali T, Käyhty H, Ruutu T, et al. A comparison of early and late vaccination with *Haemophilus influenzae* type b conjugate and pneumococcal polysaccharide vaccines after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* **1996**;18:961–967.
- 33. Cordonnier C, Labopin M, Chesnel V, et al. Randomized study of early versus late immunization with pneumococcal conjugate vaccine after allogeneic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **2009**;48:1392–1401.
- **A double-blind, randomized, multicenter study on PCV-7 following allogeneic HSCT.**
- 34. Meisel R, Kuypers L, Dirksen U, et al. Pneumococcal conjugate vaccine provides early protective antibody responses in children after related and unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **2007**;109:2322–2326.
- 35. Cordonnier C, Labopin M, Chesnel V, et al. Immune response to the 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine after the 7-valent conjugate vaccine in allogeneic stem cell transplant recipients: results from the EBMT IDWP01 trial. *Vaccine* **2010**;28:2730–2734.
- 36. Hammarström V, Pauksen K, Azinge J, et al. Pneumococcal immunity and response to immunization with pneumococcal vaccine in bone marrow transplant patients: the influence of graft versus host reaction. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer* **1993**;1:195–199.
- 37. Cordonnier C, Ljungman P, Juergens C, et al. Immunogenicity, safety, and tolerability of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine followed by 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplant aged ≥ 2 years: an open-label study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **2015**;61:313–323.
- **Multicenter study that has addressed the 4-dose regimen versus the 3-dose series against pneumococcal disease in HSCT recipients.**
- 38. Choi S-M, Boudreault AA, Xie H, et al. Differences in clinical outcomes after 2009 influenza A/H1N1 and seasonal influenza among hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* **2011**;117:5050–5056.
- 39. Machado CM, Cardoso MRA, da Rocha IF, et al. The benefit of influenza vaccination after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **2005**;36:897–900.
- 40. Avetisyan G, Aschan J, Hassan M, et al. Evaluation of immune responses to seasonal influenza vaccination in healthy volunteers and in patients after stem cell transplantation. *Transplantation* **2008**;86:257–263.
- 41. Natori Y, Humar A, Lipton J, et al. A pilot randomized trial of adjuvanted influenza vaccine in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* **2017**;52:1016–1021.
- 42. Fukatsu Y, Nagata Y, Adachi M, et al. Serum IgM levels independently predict immune response to influenza vaccine in long-term survivors vaccinated at >1 year after undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* **2017**;105:638–645.
- 43. de Lavallade H, Garland P, Sekine T, et al. Repeated vaccination is required to optimize seroprotection against H1N1 in the immunocompromised host. *Haematologica* **2011**;96:307–314.
- 44. Gueller S, Allwinn R, Mousset S, et al. Enhanced immune response after a second dose of an AS03-adjuvanted H1N1 influenza A vaccine in patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* **2011**;17:1546–1550.
- 45. Halasa NB, Savani BN, Asokan I, et al. Randomized double-blind study of the safety and immunogenicity of standard-dose trivalent inactivated influenza vaccine versus high-dose trivalent inactivated influenza vaccine in adult hematopoietic stem cell transplantation patients. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* **2016**;22:528–535.
- 46. Ambati A, Einarsdottir S, Magalhaes I, et al. Immunogenicity of virosomal adjuvanted trivalent influenza vaccination in allogeneic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc* **2015**;17:371–379.
- 47. Parkkali T, Ruutu T, Stenvik M, et al. Loss of protective immunity to polio, diphtheria and *Haemophilus influenzae* type b after allogeneic bone marrow transplantation. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* **1996**;104:383–388.
- 48. Barra A, Cordonnier C, Preziosi MP, et al. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in allogeneic bone marrow recipients. *J Infect Dis* **1992**;166:1021–1028.
- 49. Savani BN, Stratton P, Shenoy A, et al. Increased risk of cervical dysplasia in long-term survivors of allogeneic stem cell transplantation—implications for screening and HPV vaccination. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* **2008**;14:1072–1075.
- 50. Florax A, Ehler K, Becker K, et al. *Bordetella pertussis* respiratory infection following hematopoietic stem cell transplantation: time for universal vaccination? *Bone Marrow Transplant* **2006**;38:639–640.
- 51. Škovránková J, Petráš M Persistence of humoral immunity to tetanus and diphtheria in hematopoietic stem cell transplant recipients after post-transplant immunization. *Pediatr Blood Cancer* **2012**;59:908–913.
- 52. Papadopoulos EB, Young JW, Kernan NA, et al. Use of the tetanus toxoid, reduced dose diphtheria and pertussis vaccine (Tdap) in Allogeneic Transplant (alloHCT) Recipients. *Blood* **2008**;112:2214–2215.

53. Parkkali T, Olander RM, Ruutu T, et al. A randomized comparison between early and late vaccination with tetanus toxoid vaccine after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*. 1997;19:933–938.
54. Parkkali T, Stenvik M, Ruutu T, et al. Randomized comparison of early and late vaccination with inactivated poliovirus vaccine after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*. 1997;20:663–668.
55. Ljungman P, Aschan J, Gustafsson B, et al. Long-term immunity to poliovirus after vaccination of allogeneic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2004;34:1067–1069.
56. Hui C-K, Lie A, Au W-Y, et al. A long-term follow-up study on hepatitis B surface antigen-positive patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2005;106:464–469.
57. Lau GK, Lok AS, Liang RH, et al. Clearance of hepatitis B surface antigen after bone marrow transplantation: role of adoptive immunity transfer. *Hepatology*. 1997;25:1497–1501.
58. Jaffe D, Papadopoulos EB, Young JW, et al. Immunogenicity of recombinant hepatitis B vaccine (rHBV) in recipients of unrelated or related allogeneic hematopoietic cell (HC) transplants. *Blood*. 2006;108:2470–2475.
59. Sarmati L, Andreoni M, Antonelli G, et al. Recommendations for screening, monitoring, prevention, prophylaxis and therapy of hepatitis B virus reactivation in patients with haematologic malignancies and patients who underwent haematologic stem cell transplantation—a position paper. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2017;23:935–940.
60. Yalçın SS, Kondolot M, Göker H, et al. Naturally acquired hepatitis A antibodies after haematopoietic stem cell transplantation. *Epidemiol Infect* 2011;139:683–687.
61. Garcia Garrido HM, Wieten RW, Grobusch MP, et al. Response to Hepatitis A vaccination in immunocompromised travelers. *J Infect Dis* 2015;212:378–385.
62. Parkkali T, Käyhty H, Lehtonen H, et al. Tetravalent meningococcal polysaccharide vaccine is immunogenic in adult allogeneic BMT recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27:79–84.
63. Patel SR, Ortin M, Cohen BJ, et al. Revaccination with measles, tetanus, poliovirus, Haemophilus influenzae type B, meningococcus C, and pneumococcus vaccines in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2007;44:625–634.
64. Leigh IM, Buchanan JA, Harwood CA, et al. Role of human papillomaviruses in cutaneous and oral manifestations of immunosuppression. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1999. 21(Suppl 1):S49–57.
65. Onozawa M, Hashino S, Haseyama Y, et al. Incidence and risk of postherpetic neuralgia after varicella zoster virus infection in hematopoietic cell transplantation recipients: Hokkaido Hematology Study Group. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2009;15:724–729.
66. Chou JF, Kernan NA, Prockop S, et al. Safety and immunogenicity of the live attenuated varicella vaccine following T replete or T cell-depleted related and unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation (alloHCT). *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2011;17:1708–1713.
67. Bhalla P, Forrest GN, Gershon M, et al. Disseminated, persistent, and fatal infection due to the vaccine strain of varicella-zoster virus in an adult following stem cell transplantation. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2015;60:1068–1074.
68. Hata A, Asanuma H, Rinki M, et al. Use of an inactivated varicella vaccine in recipients of hematopoietic-cell transplants. *N Engl J Med* 2002;347:26–34.
69. Issa NC, Marty FM, Leblebjian H, et al. Live attenuated varicella-zoster vaccine in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2014;20:285–287.
70. Curtis KK, Connolly MK, Northfelt DW. Live, attenuated varicella zoster vaccination of an immunocompromised patient. *J Gen Intern Med* 2008;23:648–649.
71. Winston DJ, Mullane KM, Boeckh MJ, et al. A Phase III, double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter clinical trial to study the safety, tolerability, efficacy, and immunogenicity of inactivated VzV Vaccine (ZVIN) in recipients of autologous hematopoietic cell transplants (Auto-Hcts). *Biol Blood Marrow Transplant* 2017;23:S24–S25.
72. Stadtmauer EA, Sullivan KM, Marty FM, et al. A phase 1/2 study of an adjuvanted varicella-zoster virus subunit vaccine in autologous hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*. 2014;124:2921–2929.
73. Ljungman P, Lewensohn-Fuchs I, Hammarström V, et al. Long-term immunity to measles, mumps, and rubella after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1994;84:657–663.
74. Lee D-G, Yoo J-H, Choi J-H, et al. A fatal case of measles pneumonia complicating an adult recipient of hemopoietic stem cell transplantation during the nationwide epidemic in Korea. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis* 2006;10:410–411.
75. Machado CM, De Souza VA, Sumita LM, et al. Early measles vaccination in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35:787–791.
76. Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of chronic graft-versus-host disease and therapeutic targets. *N Engl J Med* 2017;377:2565–2579.
77. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* 2012;12:443–458.
- **Excellent review of graft-versus-host disease.**
78. Mackall CL, Bare CV, Granger LA, et al. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J Immunol Baltim Md*. 1996;156:4609–4616.
79. Michálek J, Collins RH, Hill BJ, et al. Identification and monitoring of graft-versus-host specific T-cell clone in stem cell transplantation. *Lancet Lond Engl* 2003;361:1183–1185.
80. Cutler CS, Koreth J, Ritz J. Mechanistic approaches for the prevention and treatment of chronic GVHD. *Blood*. 2017;129:22–29.

2. Deuxième article : réponse vaccinale et tolérance du vaccin combiné pédiatrique penta- ou hexavalent chez l'adulte receveur d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Titre : Efficacy and Safety of Revaccination against Tetanus, Diphtheria, Haemophilus influenzae Type b and Hepatitis B Virus in a Prospective Cohort of Adult Recipients of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Auteurs : Anne Conrad, Marielle Perry, Marie-Elodie Langlois, Hélène Labussière-Wallet, Fiorenza Barraco, Sophie Ducastelle-Leprêtre, Marie-Virginie Larcher, Marie Balsat, Mathilde Bocard, Christian Chidiac, Tristan Ferry, Chantal Roure-Sobas, Gilles Salles, Florent Valour, Florence Ader, on behalf of the Lyon HemInf Study Group

Revue : Biology of Blood and Marrow Transplantation

IF/rang : 5,742/B

Référence : Biol Blood Marrow Transplant. 2020 Sep;26(9):1729-1737

doi : 10.1016/j.bbmt.2020.05.006

Avant-propos :

Cette publication rapporte les résultats de la première étude VaccHemInf (2014-2018) concernant la réponse vaccinale et la tolérance du vaccin combiné pédiatrique penta- ou hexavalent DTPCa-Hib±HBV, tel qu'il est recommandé par le HCSP et l'ECIL (hormis la dose de rappel à 1 an, non recommandée par l'ECIL) chez les adultes receveurs d'allo-CSH (168,170).

Méthodes :

Les receveurs d'allo-CSH suivis dans le service d'Hématologie des HCL étaient adressés en consultation de vaccinologie dédiée par leur hématologue référent pour recevoir le calendrier vaccinal recommandé. Le délai écoulé depuis l'allo-CSH n'était donc pas contrôlé. Les patients étaient vaccinés par 3 doses mensuelles du vaccin combiné pédiatrique DTPCa-Hib±HBV, suivies d'une dose de rappel de DTPCa-Hib±HBV à 1 an de la première dose. Ils recevaient en parallèle la vaccination contre le pneumocoque selon le schéma recommandé.

La réponse vaccinale aux valences D, T, Hib et HBV était évaluée de façon prospective au moyen de sérologies pré- et post-vaccinales (à environ 6, 12 et 24 mois du début de la revaccination). De façon concomitante étaient mesurés des paramètres quantitatifs de reconstitution immunitaire : dosage pondéral des Ig G/A/M et immunophénotypage des sous-populations lymphocytaires T-B-NK.

Le critère de jugement principal était, pour chacune des valences évaluées, la proportion de patients séroprotégés à 6 mois du début de la vaccination (=après 3 doses de vaccin), la

séroprotection étant définie conformément aux corrélats de protection communément admis (236). L'impact de caractéristiques hématologiques (leucémie aiguë vs autres, source cellulaire), des paramètres quantitatifs de reconstitution immunitaire, des complications post-greffe (GvHD chronique, photochimiothérapie extracorporelle) et du temps écoulé depuis l'allo-CSH (< ou ≥10 mois) sur l'amplitude la réponse vaccinale humorale (exprimée sous forme de concentration moyenne géométrique d'anticorps, GMC) était évalué en analyse univariée.

Principaux résultats :

Cent six adultes receveurs d'allo-CSH ayant débuté leur revaccination dans un délai médian de 12,4 mois post-greffe ont pu être évalués. Un tiers des patients avait des antécédents de GvHD chronique, mais moins de 20% une GvHD active, comme illustré par la faible proportion de patients recevant un traitement immunosuppresseur ou étant en cours d'immunomodulation par photochimiothérapie extracorporelle.

Nous avons documenté une bonne tolérance du vaccin combiné pédiatrique chez l'adulte allogreffé et une bonne réponse vaccinale aux valences D, T et Hib, dans la mesure où plus de 90% des receveurs d'allo-CSH avaient des taux d'anticorps supérieurs aux seuils de protection à 6 et 24 mois du début de la revaccination. En revanche, les taux de réponse à la valence HBV étaient seulement de 83,5% et 81,1% (anti-HBs ≥10 mUI/mL) voire 64,6% et 56,8% (anti-HBs ≥100 mUI/mL) à respectivement 6 et 24 mois du début de la revaccination.

Une maladie sous-jacente autre que la leucémie aiguë, un greffon d'USP, la GvHD chronique et la photochimiothérapie extracorporelle étaient associés à des taux d'anticorps spécifiques D et T plus bas à 6 mois (soit après 3 doses de vaccin) mais pas à distance (après réalisation de la dose de rappel).

Discussion :

Il s'agit de la première étude du vaccin combiné pédiatrique penta- ou hexavalent chez des adultes allogreffés, ayant permis de documenter la bonne tolérance des valences D et Ca fortement dosées dans cette population. Plusieurs enseignements concernant l'efficacité vaccinale peuvent être tirés de cette première étude.

Sous réserve du délai (quasiment 1 an post-greffe), supérieur à celui recommandé par le HCSP et l'ECIL, nous avons pu montrer chez des adultes une bonne voire très bonne réponse (>90%) aux valences D, T et Hib (conjugué), comme précédemment documenté chez des enfants et jeunes adultes receveurs d'allo-CSH et récemment confirmé par Winkler et al. et Haynes et al. (237–244). Ces niveaux de réponse étaient supérieurs à ceux rapportés en cas d'utilisation de vaccin contenant la valence diphtérique faiblement dosée (237). L'utilisation des vaccins pédiatriques fortement dosés chez les adultes, comme recommandé par le HCSP

et l'ECIL mais hors autorisation de mise sur le marché, s'avère donc appropriée pour la primo-vaccination des receveurs d'allo-CSH, en cours de reconstitution immunitaire.

Au vu des proportions élevées de patients séroprotégés, notre étude n'était pas assez puissante pour identifier des facteurs associés à l'absence de réponse vaccinale en termes de séroprotection pour ces valences. En revanche, nous avons pu analyser l'impact de différentes variables sur le niveau de réponse sérologique obtenu en analyse univariée.

Nous avons pu observer de plus faibles titres d'anticorps antitétaniques et/ou antidiphtériques après 3 doses de vaccin, chez des patients présentant certaines caractéristiques (maladie sous-jacente autre que leucémie aiguë, greffon d'USP, GvHD chronique et photochimiothérapie extracorporelle). Néanmoins, ces différences n'étaient plus visibles à 24 mois du début des revaccinations, soit après réalisation de la dose de rappel. Ces résultats suggèrent que l'administration d'une dose de rappel, spécificité des recommandations françaises, allemandes et britanniques et non prévue par l'ECIL ou l'IDSA par exemple (voir tableau 1, section I.2.2.), est pertinente : cette dose de rappel pourrait permettre de « gommer » l'impact des caractéristiques associées à une moins bonne réponse vaccinale et d'assurer une meilleure réponse à long terme, en démultipliant le taux d'anticorps (et en contribuant à la sélection des clones les plus affins, effet non analysé dans le cadre de cette étude), avec la limite que seulement une quarantaine de patients ont pu être évalués à 24 mois du début du schéma vaccinal.

Deux autres études sont venues compléter entre-temps le corpus de données d'immunogénicité de ces valences vaccinales après allo-CSH.

Une étude allemande, portant sur une population d'adultes receveurs d'allo-CSH en tous points similaire à la nôtre (n=84, vaccinés par ≥ 3 doses du vaccin combiné pédiatrique penta- ou hexavalent, environ 1 an après l'allo-CSH), a retrouvé également de très bon taux de réponse (>95%) aux valences T et Hib, un peu inférieur pour la valence D (88%) (245). Dans cette étude, la GvHD était associée à une moindre probabilité de réponse vaccinale (mais la différence n'était pas significative), de même qu'un taux bas de LB CD19+ et un taux bas d'IgG. Haynes et al. ont rapporté leur expérience portant sur une cohorte pédiatrique de receveurs de greffe de CSH (n=112 dont 84 allo-CSH), dont la particularité était que le début des revaccinations était conditionné par la présence de 7 critères associés à la reconstitution immunitaire (délai écoulé depuis la greffe / depuis l'arrêt de tout immunosuppresseur / depuis la dernière perfusion d'IgIV ; absence de GvHD active ; valeurs minimales de lymphocytes totaux / LT CD4+ / IgG). Cela a conduit à retarder les vaccinations (débutées dans un délai médian de 477 jours post-greffe) mais a permis d'obtenir d'excellents taux de réponse (100%) aux valences D, T et Hib (244).

Une conclusion importante de notre étude concerne la vaccination contre l'hépatite B. En application des recommandations françaises actuelles, les adultes receveurs d'allo-CSH ont reçu un schéma vaccinal à 3+1 doses d'antigène HBs recombinant, dosé à seulement 10 µg dans le vaccin combiné pédiatrique hexavalent, quand les adultes immunocompétents reçoivent 3 doses à 20 µg. Ce schéma a permis d'obtenir des taux de réponse supérieurs à ceux observés dans d'autres cohortes d'adultes receveurs d'allo-CSH et similaires à ceux observés chez des enfants allogreffés, mais néanmoins plus bas que chez des adultes immunocompétents (237,244,246–249).

Or, outre l'âge, la dose d'antigène HBs est connue pour être un facteur déterminant de l'immunogénicité du vaccin de l'hépatite B et des schémas vaccinaux plus fortement dosés sont recommandés dans d'autres populations immunodéprimées (infectés par le virus de l'immunodéficience humaine [VIH], transplantés d'organe solide) (250,251). De façon intéressante, Piekarska et al. ont récemment publié leur étude d'un schéma vaccinal à ≥3 doses de vaccin contre l'hépatite B dont au moins la première à 40 µg d'antigène HBs (doses ultérieures à 20 ou 40 µg selon le taux d'anti-HBs obtenu) chez 42 adultes allogreffés : ce schéma permettait d'obtenir une réponse vaccinale (anti-HBs ≥10 mUI/mL) chez tous les patients (100%), dont 84% avaient des taux d'anti-HBs ≥100 mUI/mL (252). La présence d'une GvHD était associée à des concentrations d'anti-HBs plus faibles mais n'empêchait pas la réponse vaccinale. L'impact de la maladie sous-jacente sur l'amplitude de la réponse sérologique n'était pas étudié.

Assurer une réponse vaccinale optimale, avec des titres d'anti-HBs élevés (≥100 mUI/mL), est particulièrement important chez les receveurs d'allo-CSH à risque de réactivation du virus de l'hépatite B, quand le donneur et/ou le receveur étaient préalablement infectés (248).

Par conséquent, nous suggérons de dissocier chez l'adulte receveur d'allo-CSH la vaccination contre l'hépatite B des autres valences, et donc de revacciner les adultes allogreffés par 3+1 doses de vaccin pentavalent et un schéma vaccinal contre l'hépatite B à dose standard voire renforcée. Cette stratégie, qui implique pour le patient des piqûres supplémentaires, devra être validée dans des études dédiées. A noter que dans les pays anglosaxons et au Canada, les recommandations de vaccination contre l'hépatite B après greffe de CSH préconisent d'ores et déjà l'utilisation de schémas renforcés (voir tableau 1, section I.2.2.).

En ce qui concerne les limites de ce deuxième travail, citons que la réponse vaccinale n'a été évaluée que sur le plan humoral, en sachant que les corrélats de protection connus pour les valences évaluées se basent également uniquement sur les niveaux d'anticorps. Il est peu probable que les IgIV, reçues par une majorité de notre population, aient faussé de façon significative l'évaluation de la réponse vaccinale dans la mesure où la dernière perfusion d'IgIV

remontait à plus de 4 mois (délai médian) au moment de l'initiation de la revaccination. De plus, il a été montré que les IgIV pourraient avoir une demi-vie plus courte chez les receveurs d'allo-CSH que chez les sujets sains et, dans tous les cas, inférieure à 30 jours (253–256). Nous n'avons pas effectué d'analyse multivariée des facteurs associés à l'amplitude de la réponse humorale, au vu de nos effectifs. Enfin, nous n'avons pas pu explorer la réponse aux valences polio (habituellement satisfaisante) et coqueluche (rapportée moins bonne, <70%), étudiée par d'autres équipes (237–239,245).



Efficacy and Safety of Revaccination against Tetanus, Diphtheria, *Haemophilus influenzae* Type b and Hepatitis B Virus in a Prospective Cohort of Adult Recipients of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Anne Conrad^{1,2,3,*}, Marielle Perry¹, Marie-Elodie Langlois^{1,2}, Hélène Labussiere-Wallet⁴, Fiorenza Barraco⁴, Sophie Ducastelle-Lepr etre⁴, Marie-Virginie Larcher⁴, Marie Balsat⁴, Mathilde Boccard^{1,3}, Christian Chidiac^{1,2}, Tristan Ferry^{1,2,3}, Chantal Roure-Sobas⁵, Gilles Salles^{2,4}, Florent Valour^{1,2,3}, Florence Ader^{1,2,3,6}, on behalf of the Lyon HemInf Study Group

¹ Hospices Civils de Lyon, Hôpital de la Croix-Rousse, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Lyon, France

² Université Claude Bernard Lyon I, Villeurbanne, France

³ Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, Lyon, France

⁴ Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Service d'Hématologie Clinique, Pierre-Bénite, France

⁵ Hospices Civils de Lyon, Hôpital de la Croix-Rousse, Institut des Agents Infectieux, Lyon, France

⁶ INSERM, F-CRIN, Innovative Clinical Research Network in Vaccinology (I-REIVAC), Paris Cedex, France

Article history:

Key Words:

Vaccination
Hematopoietic stem cell transplantation
Diphtheria
Haemophilus influenzae type b
Hepatitis B virus vaccine

A B S T R A C T

Data on immunogenicity and safety of the recommended revaccination schedule against diphtheria, tetanus, poliomyelitis, pertussis, *Haemophilus influenzae* type b (Hib), and hepatitis B in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) recipients are limited. This prospective single-center cohort study (April 2014 to March 2018) included adult allo-HSCT recipients referred to a dedicated vaccinology consultation and vaccinated with the pediatric combined diphtheria, tetanus, acellular pertussis, hepatitis B virus, inactivated poliovirus, and *Haemophilus influenzae* type b (DTaP(±HB)-IPV-Hib) vaccine (3 doses 1 month apart, booster dose 1 year later). The proportion of responders to tetanus, diphtheria, Hib, and hepatitis B vaccine and geometric mean concentrations (GMCs) of antibodies were assessed before and up to 24 months after vaccination. A total of 106 patients were vaccinated at a median (interquartile range) time of 12.4 (10 to 18.4) months post-transplant. At 5.3 (4.8 to 6.6) and 23.1 (21.1 to 25.1) months after vaccine initiation, high and sustained rates of protective antibody titers were achieved for tetanus (97.8% [95% confidence interval (95% CI), 92.4% to 99.7%], n = 91/93 and 100% [95% CI, 92% to 100%], n = 44/44), diphtheria (94.6% [95% CI, 87.9% to 98.2%], n = 88/93 and 90.9% [95% CI, 78.3% to 97.5%], n = 40/44), Hib (96.6% [95% CI, 90.4% to 99.3%], n = 85/88 and 93% [95% CI, 80.9% to 98.5%], n = 40/43), and hepatitis B (83.5% [95% CI, 73.5% to 90.9%], n = 66/79 and 81.1% [95% CI, 64.8% to 92%], n = 30/37). Underlying disease, stem cell source, chronic graft-versus-host-disease, and extracorporeal photopheresis differentially influenced GMCs of tetanus, diphtheria, and hepatitis B antibodies after 3 doses but not in the long term (24 months). Six (5.7%) patients experienced mild side effects. The pediatric DTaP(±HB)-IPV-Hib vaccine was safe and effective in eliciting a sustained protective humoral response in adult allo-HSCT recipients. Hepatitis B revaccination might be optimized by using higher antigen doses.

  2020 American Society for Transplantation and Cellular Therapy. Published by Elsevier Inc.

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is the curative treatment for various malignant and non-malignant hematologic disorders. It is based on the transfer of

an immune system from a healthy donor to the recipient through replacement of hematopoietic stem cells [1]. The increasing transplant activity and the improving post-transplant survival have led to a steadily growing pool of long-term allo-HSCT survivors with specific health challenges [1-6].

Prevention of infection is of paramount importance to allo-HSCT recipients, since infections are among the most frequent life-threatening complications after allo-HSCT [6]. Allo-HSCT

Financial disclosure: See Acknowledgments on page 1736.

*Correspondence and reprint requests: Anne Conrad, MD, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital de la Croix-Rousse, 103 Grande Rue de la Croix-Rousse, 69004 Lyon, France.

E-mail address: anne.conrad@chu-lyon.fr (A. Conrad).

recipients are specifically susceptible to invasive pneumococcal and *Haemophilus influenzae* infections, which might be prevented by vaccination [7–9]. They further lose protective immunity to tetanus, diphtheria, poliovirus, measles, and hepatitis B [10–14].

Various expert committees have issued vaccination schedules after allo-HSCT, mostly based on data obtained in pediatric allo-HSCT recipients [15–22]. Many questions are still pending in the adult setting. Immunogenicity and durability of the response to some vaccines are poorly documented. The influence of hematologic characteristics and transplant-related complications on vaccine efficacy is mostly unknown. In particular, graft-versus-host-disease (GVHD), whose occurrence frequently overlaps with vaccine schedule, may significantly affect immunization efficacy. Finally, the tolerance to some vaccine formulations recommended after allo-HSCT, such as full doses of diphtheria and acellular pertussis toxoid, is unknown in the adult population [18,19,22].

We report herein our real-life experience concerning reimmunization of adult allo-HSCT recipients using the pediatric combined diphtheria (D), tetanus (T), acellular pertussis (aP), hepatitis B virus (HB), inactivated poliovirus (IPV), and *Haemophilus influenzae* type b (Hib) conjugate vaccine (DTaP-HB-IPV-Hib), according to current guidelines. The primary objective was to determine the proportion of responders up to 24 months after vaccination, based on vaccine-specific antibody levels. Secondary objectives were to assess vaccine immunogenicity through comparison of the geometric mean concentrations (GMCs) at baseline and up to 24 months after vaccination in different immunization groups according to allo-HSCT characteristics, as well as safety of the reimmunization schedule.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Patient Population

From April 2014 to March 2018, all consecutive adult (≥ 18 years) allo-HSCT recipients, who underwent transplantation at the hematology department and who were referred to the vaccination center of our institution on the referent hematology physician's demand, were prospectively followed up to May 2019. Recipients were required to be at least 6 months post-transplant and disease free. The following patient characteristics were recorded: demographics, underlying hematologic disease, transplant characteristics (conditioning regimen, stem cell source, donor type), prophylaxis for GVHD (including anti-thymocyte globulins, methotrexate, post-transplant cyclophosphamide), grade of acute and active chronic GVHD (cGVHD) according to current international grading standards and their treatments (corticosteroids, calcineurin inhibitors, rituximab, extracorporeal photopheresis [ECP], and other immunosuppressants), administration of intravenous immunoglobulins (IVIg), and donor lymphocyte infusions [23–26].

The study was approved by the Ethics Committee of the Lyon university hospital (Comité d'Ethique, Hospices Civils de Lyon) and registered to the national data protection authority (Commission Nationale Informatique et Libertés, CNIL) under the number 18-063. Informed consent for collection of blood samples at each follow-up visit was obtained from recipients.

Vaccination Schedule

Patients were vaccinated according to French guidelines, which recommend 3 doses of the combined pediatric formulation DTaP-HB-IPV-Hib conjugate vaccine 1 month apart, beginning optimally 6 months post-transplant, followed by a fourth booster dose 12 months after the first dose [19]. Vaccines were administered by intramuscular route. Of note, this formulation contained a higher dose of D toxoid valence (≥ 20 to 30 IU/dose) and a lower dose of HB valence (10 $\mu\text{g}/\text{dose}$) as compared to the vaccines licensed for adults (≥ 2 IU/dose and 20 $\mu\text{g}/\text{dose}$, respectively). For patients with a history of hepatitis B or refusing such vaccination, the combined pediatric formulation HB valence-free pentavalent equivalents were used, and these recipients were excluded from the analysis for hepatitis B vaccine response.

Blood Sampling

At baseline (prevaccination, T1) and 6 (T2), 12 (T3), and 24 months (T4) after vaccine initiation, 5 to 10 mL of blood was routinely sampled for serologic testing; serum levels of immunoglobulins (Ig) G, A, and M were

measured by immunonephelometry and peripheral blood T lymphocytes, B lymphocytes, and natural killer cell subsets by flow cytometry.

Antibody Assays and Definition of Vaccine Response

Serum concentrations of specific IgG were measured at baseline (T1) and postvaccination (T2 to T4) for tetanus and diphtheria (toxoid; VaccZyme Tetanus or Diphtheria IgG Enzyme Immunoassay Kit; Binding Site Ltd., Birmingham UK), Hib (Hib capsular polysaccharide; VaccZyme *Haemophilus influenzae* type b IgG Enzyme Immunoassay Kit; Binding Site Ltd.), and hepatitis B (HB surface antigen, anti-HBs2; Advia XP Centaur; SIEMENS, Munich Germany). Assay range was 0.01 to 7 IU/mL for tetanus, 0.012 to 3 IU/mL for diphtheria, 0.11 to 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for Hib, and 3.1 to 1000 mIU/mL for HBs-specific antibodies. Vaccine response was defined by achievement of the following long-term protection thresholds in serum antibody concentrations [27]: ≥ 0.1 IU/mL for tetanus and diphtheria, ≥ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for Hib, and ≥ 10 mIU/mL for anti-HBs antibodies. Additional analysis was performed to calculate the proportion of HB-vaccinated recipients having achieved high-level anti-HBs titers (≥ 100 mIU/mL).

Endpoints

Primary endpoint was the proportion of responders at 6 months (T2) after vaccination for tetanus, diphtheria, Hib, and hepatitis B among evaluable recipients. Secondary endpoints were (1) maintenance of serologic responses at 12 and 24 months after vaccine initiation; (2) GMC assessment of specific antibodies at baseline and 6, 12, and 24 months after vaccine initiation and calculation of the geometric mean fold rise (GMFR) of antibody concentrations; (3) comparison of GMC of specific antibodies over time according to the underlying disease (acute leukemia versus others), to 3 transplant-related factors (stem cell source, cGVHD, and ECP), and to the time of vaccine initiation; and (4) assessment of safety through recording of adverse events (immediate local and general reactions).

Statistical Analysis

Qualitative variables were expressed as counts and percentages, and quantitative continuous data were provided as median and interquartile range (IQR). Descriptive data of demographic and hematologic characteristics were compared using the Mann-Whitney *U* test, the chi-square test, or the Fisher exact test, where appropriate. Exact 95% binomial confidence intervals (95% CIs) were calculated for proportions of vaccine responders. Serologic data were \log_{10} -transformed and shown as GMC or GMFR with 2-sided 95% CI. For the purpose of GMC calculations, samples with values below the lower detection limit were assigned an arbitrary value of half the lower detection limit, and those with values above the upper detection limit were further diluted until a measurable value was obtained or, in case they had not been further diluted, were assigned the value of the upper detection limit. GMCs before and after vaccination were compared using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. GMCs between specific immunization groups were compared using the Mann-Whitney *U* test or the Kruskal-Wallis test, where appropriate. Correlation between 2 continuous variables was analyzed using the Spearman correlation coefficient. All analyses were based on 2-sided *P* values, with statistical significance defined by *P* < .05, and performed using GraphPad Prism, version 8.3 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

RESULTS

Study Population

During the study period, 279 patients underwent allo-HSCT at our institution, among whom 124 (44.4%) were referred to the vaccination center. The final study population comprised the 106 allo-HSCT recipients who had received ≥ 1 dose of the combined DTaP(\pm HB)-IPV-Hib vaccine. Ninety-one (85.8%) patients received the hexavalent DTaP-HB-IPV-Hib vaccine and 15 (14.2%) the pentavalent DTaP-IPV-Hib vaccine (Figure 1).

Demographic and hematologic characteristics of the study population at baseline are presented in Table 1. Median time from allo-HSCT to baseline assessment was 9.4 months (IQR, 7.6 to 13.7). The first dose of combined DTaP(\pm HB)-IPV-Hib vaccine was administered at a median of 12.4 months (IQR, 10 to 18.4) after allo-HSCT. Of note, 66 (62.3%) patients had received ≥ 1 infusion of IVIg, the last dose administered at a median time of 4.5 months (IQR, 2.6 to 8) before T1.

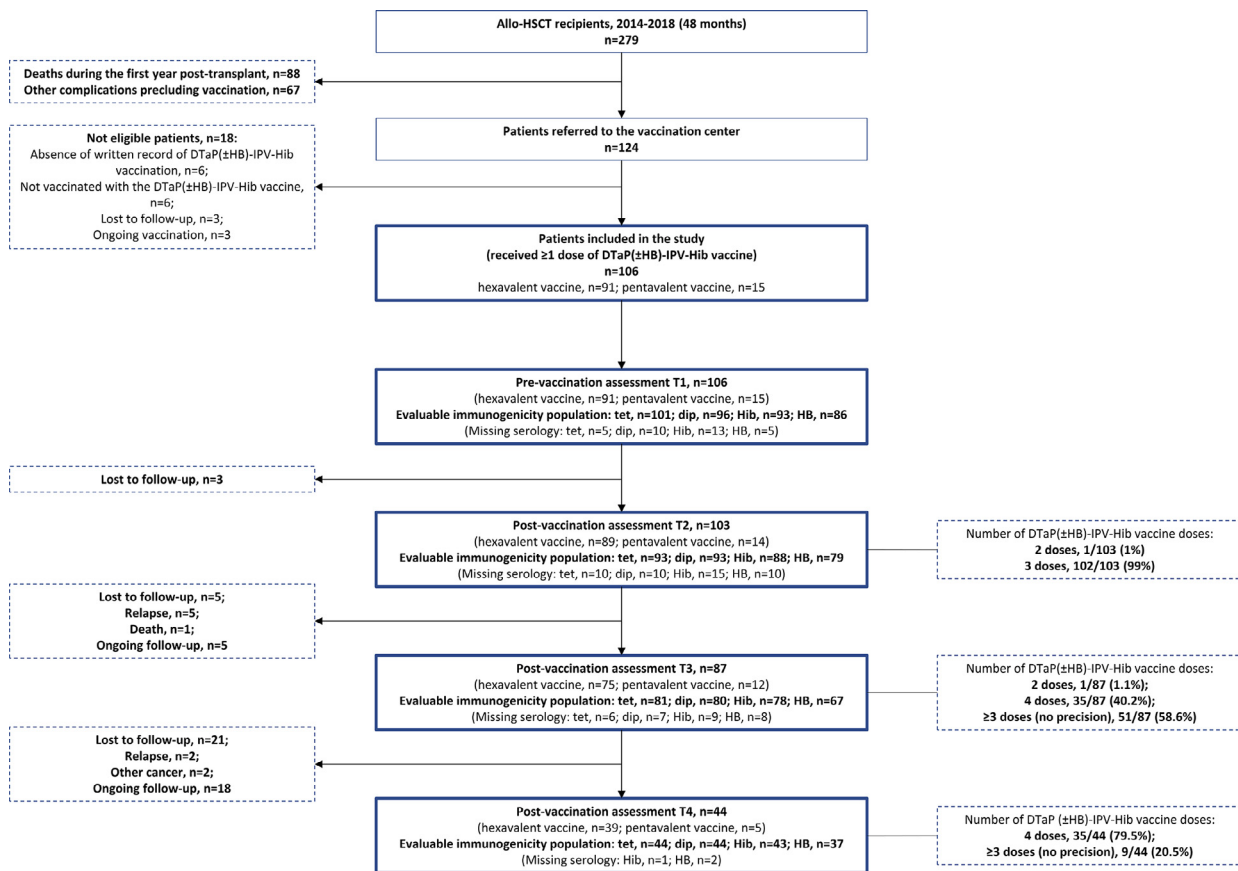


Figure 1. Patient flowchart. Of the 106 adult allo-HSCT recipients included in the study, 91 received the hexavalent DTaP-HB-IPV-Hib conjugate vaccine and 15 received the pentavalent DTaP-IPV-Hib conjugate vaccine according to the 3 + 1 schema. Response to hepatitis B vaccine was studied only in patients vaccinated with the hexavalent formulation. Specific antibodies to tetanus, diphtheria, *Haemophilus influenzae* type b, and hepatitis B were measured before vaccination (T1) and 6 (T2), 12 (T3), and 24 months (T4) after vaccine initiation. aP, high-dose acellular pertussis toxoid; dip, diphtheria; tet, tetanus.

Primary Endpoint: Proportion of Vaccine Responders after Allo-HSCT

At T1, 75.2% (95% CI, 65.7% to 83.3%; $n = 76/101$), 36.5% (95% CI, 26.9% to 46.9%; $n = 35/96$), 34.4% (95% CI, 24.9% to 45%; $n = 32/93$), and 55.8% (95% CI, 44.7% to 66.5%; $n = 48/86$) of evaluable patients still had protective antibody titers for tetanus, diphtheria, Hib, and hepatitis B, respectively. At T2, occurring at a median time of 5.3 (IQR, 4.8 to 6.6) and 3.2 months (2.4 to 4) from the first and third vaccine doses, a large majority of recipients had protective antibody titers (97.8% [95% CI, 92.5% to 99.7%; $n = 91/93$] for tetanus, 94.6% [95% CI, 87.9% to 98.2%; $n = 88/93$] for diphtheria, 96.6% [95% CI, 90.4% to 99.3%; $n = 85/88$] for Hib, and 83.5% [95% CI, 73.5% to 90.9%; $n = 66/79$] for hepatitis B). Durable seroprotection was observed, as shown in Figure 2. At T4, occurring at a median time of 23.1 (IQR, 21.1 to 25.1) and 11.5 (8.6 to 13.4) months from the first and last (fourth) vaccine doses, respectively, the proportion of recipients having protective antibody titers was 100% for tetanus (95% CI, 92% to 100%; $n = 44/44$), 90.9% for diphtheria (95% CI, 78.3% to 97.5%; $n = 40/44$), 93% for Hib (95% CI, 80.9% to 98.5%; $n = 40/43$), and 81.1% for hepatitis B (95% CI, 64.8% to 92%; $n = 30/37$). Of note, the median time from the last IVIg infusion to the T4 postvaccination assessment was 30.2 months (IQR, 25.1 to 33.8). The proportion of recipients achieving anti-HBs antibody titers ≥ 100 mIU/mL was 64.6% (95% CI, 53% to 75%; $n = 51/79$) at T2 and 56.8% (95% CI, 39.5% to 72.9%; $n = 21/37$) at T4.

Evolution of Specific Antibody Concentrations over Time

GMCs before and after vaccination for the evaluable immunogenicity population are illustrated in Figure 3. There was a significant increase of GMCs after vaccination for each of the 4 valences. For tetanus, GMCs increased from 0.26 IU/mL (95% CI, 0.21 to 0.34) at T1 to 1.45 IU/mL (95% CI, 1.15 to 1.82; $P < .001$) at T2 and 2.31 IU/mL (95% CI, 1.6 to 3.34; $P < .001$) at T4. For diphtheria, GMCs increased from 0.05 IU/mL (95% CI, 0.04 to 0.08) at T1 to 1.09 IU/mL (95% CI, 0.86 to 1.38; $P < .001$) at T2 and 0.85 IU/mL (95% CI, 0.54 to 1.32; $P < .001$) at T4. For Hib, GMCs increased from 0.76 μ g/mL (95% CI, 0.58 to 1) at T1 to 5.75 μ g/mL (95% CI, 4.81 to 6.87; $P < .001$) at T2 and 5.09 μ g/mL (95% CI, 3.86 to 6.73; $P < .001$) at T4. In patients vaccinated against hepatitis B, GMCs of anti-HBs antibodies increased from 16.64 mIU/mL (95% CI, 10.67 to 25.95) at T1 to 124.2 mIU/mL (95% CI, 78 to 197.8; $P < .001$) at T2 and 151.2 mIU/mL (95% CI, 74.64 to 306.5; $P < .001$) at T4. Corresponding GMFRs are indicated in Table 2. There was no correlation between time from allo-HSCT to vaccination and fold-rise increase of antibody concentrations between T1 and T2 or T4 for none of the 4 vaccine valences (data not shown).

Determinants of Antibody Levels (Univariate Analysis)

Magnitude of antibody response to each vaccine valence according to immunization groups and according to time from allo-HSCT to vaccination is illustrated in Figure 4. Regarding response to tetanus vaccine, GMCs were significantly lower in cord blood unit recipients (0.59 IU/mL [95%

Table 1
Demographic and Hematologic Characteristics at Baseline of 106 Allo-HSCT Recipients

Characteristic	Value
Sex ratio, M/F	1.72
Age, median (IQR), yr	47 (37.8-60)
Underlying disease*	
Acute leukemia	63 (59.4)
Lymphoproliferative neoplasms	18 (17)
Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms	15 (14.2)
Aplastic anemia	7 (6.6)
Multiple myeloma	3 (2.8)
Donor type	
HLA-genoidentical sibling	45 (42.5)
HLA-phenoidentical full-match unrelated donor	29 (27.4)
HLA-phenoidentical mismatch unrelated donor	25 (23.6)
HLA-haploidentical related donor	7 (6.6)
Stem cell source	
Peripheral blood stem cells	54 (50.9)
Bone marrow	40 (37.7)
Cord blood unit(s)	12 (11.3)
Conditioning regimen	
Myeloablative	57 (53.8)
Reduced intensity	49 (46.2)
GVHD prophylaxis	
ATG	57 (53.8)
Methotrexate	26 (24.5)
Calcineurin inhibitors	101 (95.3)
Mycophenolic acid	80 (75.5)
Post-transplant cyclophosphamide	12 (11.3)
History of acute GVHD	52 (49.1)
Grades I, II	44 (41.5)
Grades III, IV	8 (7.5)
History of chronic GVHD†	35 (33)
IVIg	66 (62.3)
Receipt of donor lymphocyte infusions	20 (18.9)
Post-transplant rituximab	5 (4.7)
Immunosuppressive/immunomodulatory treatment at baseline	
Extracorporeal photopheresis	18 (17)
Systemic corticosteroids	4 (3.8)
Calcineurin inhibitors	8 (7.5)
Tyrosine kinase inhibitors	4 (3.8)
Others‡	5 (4.7)
Ig level (g/L), median (IQR)	
IgG	9.6 (6.1-12.1)
IgA	0.8 (0.5-1.3)
IgM	0.7 (0.4-0.9)
Lymphocyte absolute counts (per μ L), median (IQR)	
Total lymphocyte count	1487 (878-2056)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T lymphocytes	258 (160-360)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T lymphocytes	449 (199-848)
CD4/CD8 ratio	0.51 (0.31-1.13)
CD19 ⁺ B lymphocytes	338 (126-644)
CD20 ⁺ B lymphocytes	312 (116-632)
CD21 ⁺ B lymphocytes	301 (109-551)
NK cells	163 (104-251)

Data are No. (%) of patients, unless otherwise indicated.

ATG indicates anti-thymocyte globulins; NK, natural killer.

* According to the 2016 revisions of the World Health Organization classifications of lymphoid neoplasms and myeloid neoplasms and acute leukemia [23,24].

† According to international grading standards [25,26].

‡ Other immunosuppressive/immunomodulatory treatments: ruxolitinib (n = 2), ibrutinib (n = 1), lenalidomide (n = 1), and peginterferon alfa-2a (n = 1).

CI, 0.31 to 1.13]) than in bone marrow (1.51 IU/mL [95% CI, 1.01 to 2.26]) or peripheral blood stem cell recipients (1.72 IU/mL [95% CI, 1.27 to 2.31], $P = .02$) at T2, but this difference waned by T4. There was a significantly lower response to tetanus vaccine at T2 for cGVHD compared to no cGVHD (0.97 IU/mL [95% CI, 0.61 to 1.55] versus 1.78 IU/mL [95% CI, 1.39 to 2.27], $P = .02$) and for ECP compared to no ECP (0.67 IU/mL [95% CI, 0.33 to 1.35] versus 1.74 IU/mL [95% CI, 1.4 to 2.16], $P = .003$), but these effects also waned over time. Regarding diphtheria, patients with acute leukemia responded significantly better to vaccination than patients with other underlying diseases at T2 (1.48 IU/mL [95% CI, 1.23 to 1.78] versus 0.69 IU/mL [95% CI, 0.42 to 1.14], $P = .01$). Cord blood unit recipients tended to have lower GMCs at T2 than bone marrow or peripheral blood stem cell recipients (0.44 IU/mL [95% CI, 0.13 to 1.49] versus 1.15 IU/mL [95% CI, 0.79 to 1.68] versus 1.3 IU/mL [95% CI, 1 to 1.68], $P = .07$). cGVHD and ECP had no significant impact on antibody levels. Response to Hib vaccine was uniformly good, and no hematologic factor had a significant impact on antibody response magnitude. Finally, regarding the hepatitis B vaccine, patients with acute leukemia had significantly higher antibody concentrations at each time point after vaccination than patients with other underlying diseases, especially at T4 (311.4 mIU/mL [95% CI, 147.3 to 658.2] versus 46.2 mIU/mL [95% CI, 12.8 to 166.2], $P = .01$), whereas there was no significant difference according to other hematologic factors. Although antibody levels to all valences were not significantly different, recipients starting vaccination before 10 months post-transplant exhibited more characteristics associated with good vaccine response (acute leukemia, no cGVHD, and no ECP). Conditioning had no significant impact on vaccine-specific antibody levels at any time point. Anti-thymocyte globulin was associated with significantly lower persisting antidiphtheria ($P < .001$) and anti-HBs ($P = .009$) antibodies at T1 but had no significant impact on antibody levels after vaccination. Immune reconstitution parameters (absolute counts of CD4⁺ T cells, CD20⁺ B cells, ratio of CD4⁺/CD8⁺ T cells, levels of IgG/IgA/IgM) at baseline had no significant impact on vaccine-specific antibody levels (data not shown).

Vaccine Safety

Vaccination was well tolerated, with 6 (5.7%) patients reporting mild side effects (sore arm, low-grade fever). No severe adverse event was recorded.

DISCUSSION

This prospective cohort study of adult allo-HSCT recipients revaccinated with pediatric formulation vaccines, the largest to date analyzing a real-life experience, brings new insights on vaccine response in this setting. First, adult recipients achieved similar high (>90%) and sustained rates of protective antibody titers for tetanus, high-dose diphtheria, and Hib than those observed in previous pediatric cohorts [28-30]. Second, the low-dose hepatitis B valence induced >80% of protective and sustained antibody titers. Third, hematologic and transplant-

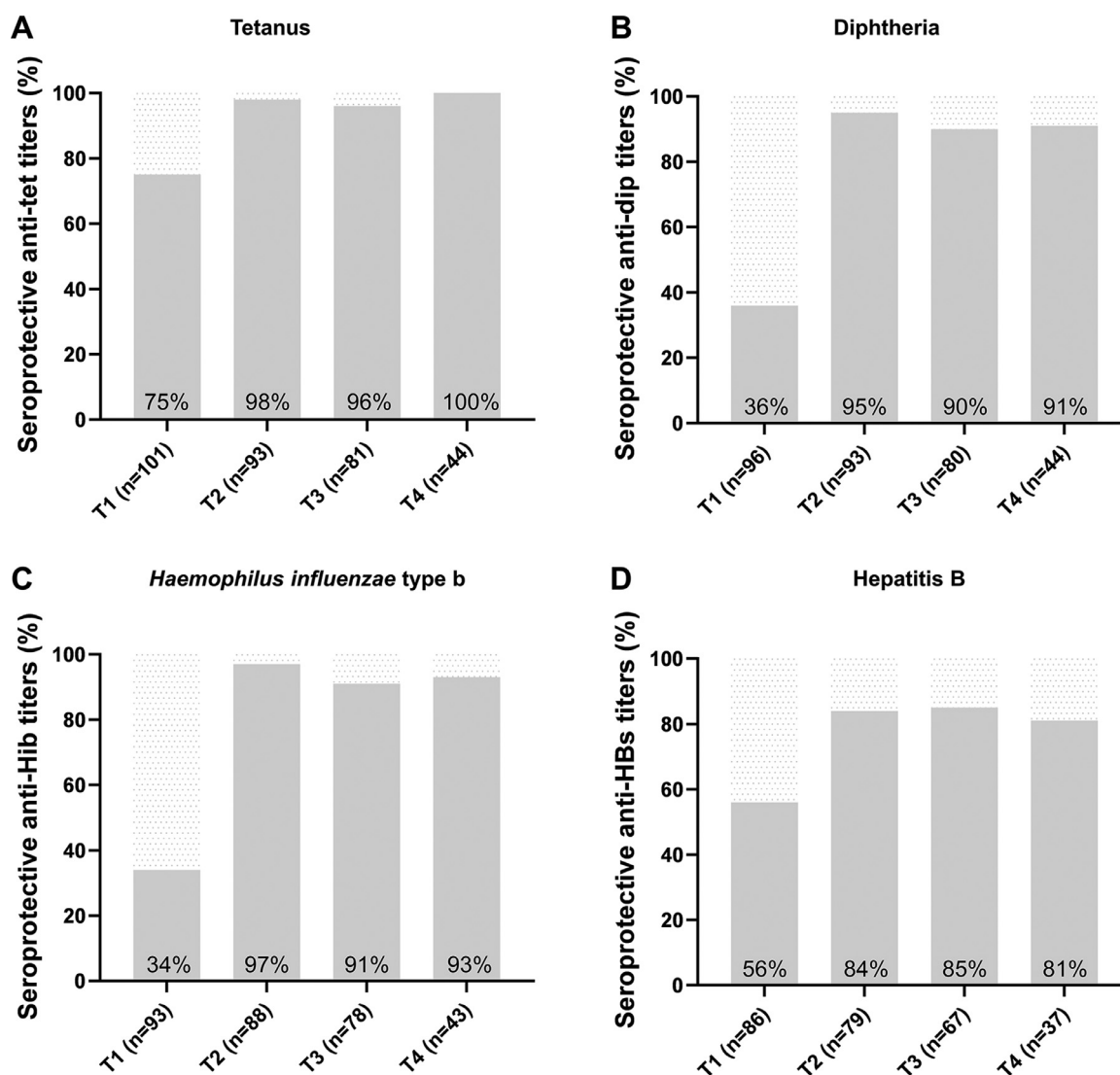


Figure 2. Proportion of vaccine responders after allo-HSCT. Proportion of allo-HSCT recipients with protective antibody titers for tetanus (A), diphtheria (B), *Haemophilus influenzae* type b (C), and hepatitis B (D) before vaccination (T1) and 6 (T2), 12 (T3), and 24 months (T4) after vaccine initiation. The denominator is the evaluable immunogenicity population (ie, the number of patients with an available serology at a given time point) and is indicated on the x-axis. Antibody titers were considered protective if superior or equal to 0.1 IU/mL for tetanus and diphtheria, 1 μ g/mL for Hib, and 10 mIU/mL for anti-HBs antibodies.

related characteristics influenced the magnitude of immune response to vaccines.

The pediatric vaccine was well tolerated, with less than 10% of patients having local or systemic adverse reactions. Three high-dose diphtheria toxoid doses resulted in 95% of seroprotective antidiphtheria titers. In the literature, vaccine response to diphtheria ranged from 62% to 100%, according to age, dose of diphtheria toxoid, and threshold of seroprotection used [28,29,31]. Attainment of seroprotective antidiphtheria titers was shown to be more frequent and more durable in children aged ≤ 7 years vaccinated with the DTaP vaccine than in children aged > 7 years vaccinated with the Td vaccine. Moreover, an older age at immunization has been associated with a worse response to the diphtheria vaccine [28,29]. Thus, the present data strongly support the latest European Conference on Infections in Leukaemia-7 (ECIL-7) guidelines that recommend DT vaccines for all ages post-HSCT [18].

Antigen dose is also known to be a key determinant of hepatitis B vaccine immunogenicity in immunosuppressed patients. Here, low dose (10 μ g) of recombinant HBs antigen resulted in

the weakest response rate, similar to the response rate at 2 years (77.1%) reported by Inaba et al. [28]. However, the response rate was still higher than the overall response rate (64%) reported in a study of allo-HSCT recipients of all ages vaccinated at a median time of 23.4 months post-transplant with an age-appropriate dose of hepatitis B vaccine [32]. In contrast, young healthy adults are expected to respond to recombinant hepatitis B vaccine in more than 90% to 95% of cases [33]. Augmented vaccine schedules are proposed in other immunosuppressed patient categories, that is, in HIV-infected individuals in whom vaccination with $4 \times 40 \mu$ g of recombinant HBs antigen has been shown to be more immunogenic than the $3 \times 20\text{-}\mu$ g/dose schema (82% versus 65%) [34]. Older age has also been associated with lower immunogenicity of hepatitis B vaccination [35]. Thus, seroconversion and maintenance of protective anti-HBs levels in adult allo-HSCT recipients might be optimized by using at least an adult $20\text{-}\mu$ g/dose schema, and higher dose schemes remain to be evaluated.

Most vaccine studies after allo-HSCT have included a low proportion of recipients with cGVHD, which occurs in

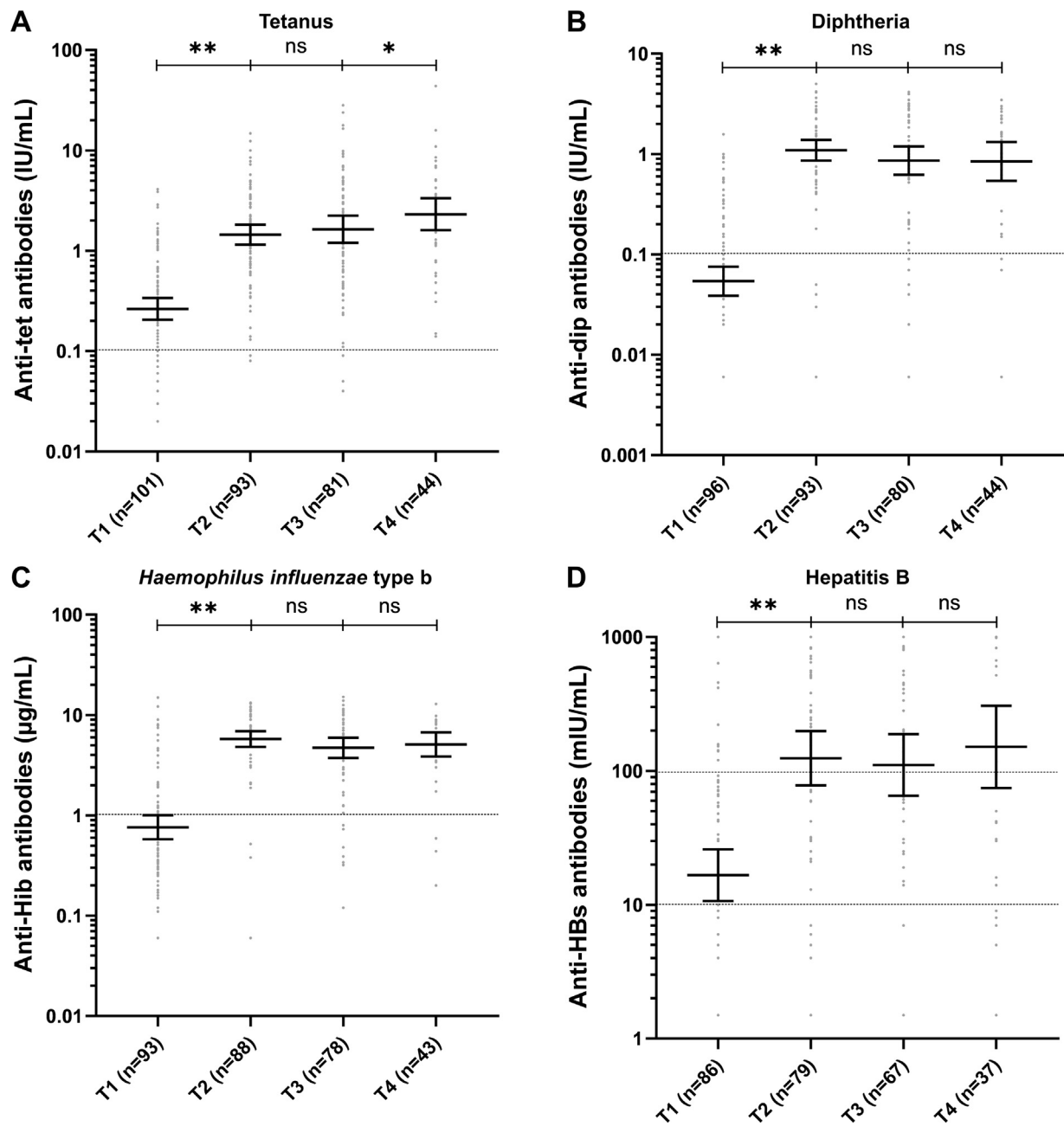


Figure 3. Geometric mean concentrations of specific antibodies in vaccinated allo-HSCT recipients. Geometric mean concentrations and their 95% confidence intervals of specific antibodies for tetanus (A), diphtheria (B), *Haemophilus influenzae* type b (C), and hepatitis B (D), before vaccination (T1) and 6 (T2), 12 (T3), and 24 months (T4) after vaccine initiation. The evaluable immunogenicity population (ie, the number of patients with an available serology at a given time point) is indicated on the x-axis. Each symbol represents data from an individual. The horizontal dashed lines indicate the seroprotective thresholds; for hepatitis B, the 10-mIU/mL and the 100-mIU/mL thresholds are indicated. Antibody concentrations at different time points were compared using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. * $P < .05$. ** $P < .001$. ns, not significant.

approximately 30% to 50% of recipients [1,36]. GVHD is expected to alter vaccine response through intrinsic and drug-related immunosuppressive intensification [37]. We intentionally included these recipients to stratify the risk of weaker response. Transplant-related factors such as stem cell source, cGVHD, and ECP were associated with a short-term weaker immunization, but this effect vanished over time, while immune reconstitution was expected to progress and GVHD to resolve. cGVHD was associated with lower antibody levels after tetanus and hepatitis B vaccination, consistent with previous findings [28,32]. Long-term immunization was not

different in each of these subsets. A single study has evaluated the effect of ECP on vaccine responsiveness and concluded to the absence of impact of monthly ECP on tetanus immunization in patients with scleroderma [38]. The data herein confirm the lack of effect of ECP on long-term (24 months) vaccine response, suggesting that reimmunization can be carried out under ongoing ECP. Regarding IVIg, their use is not expected to interfere with inactivated vaccines (in contrast to some live vaccines) but can lead to misestimating antibody levels [39]. This is particularly important in the present cohort, in whom 70% of patients received ≥ 1 IVIg infusion post-transplant,

Table 2
Geometric Mean Fold Rise of Tetanus-, Diphtheria-, *Haemophilus influenzae* Type b- and HBs-Specific Immunoglobulin Concentrations

Characteristic	T2/T1	T4/T1	T4/T3
	(n = 77-91)	(n = 37-42)	(n = 32-39)
Tetanus	5.8 (4.2-7.9)	12.8 (7.8-20.9)	1.9 (1.2-3)
Diphtheria	22.6 (15.5-33)	33.1 (19-57.7)	1.6 (0.9-2.7)
Hib	7.8 (5.6-10.8)	5.4 (3.4-8.6)	1.3 (0.9-1.9)
Hepatitis B	8.1 (4.5-14.4)	10.6 (4.7-24.3)	1.7 (0.9-3.2)

Geometric mean fold rise (95% confidence interval) of tetanus-, diphtheria-, *Haemophilus influenzae* type b-, and HBs-specific immunoglobulin concentrations after vaccination of adult allo-HSCT recipients with the combined DTaP (±HB)-IPV-Hib conjugate vaccine. Specific antibody levels were measured at baseline (T1) and 6 (T2), 12 (T3), and 24 (T4) months after vaccine initiation. “n” indicates the number of patients with available paired antibody assay results at both of the specified time points.

which contains anti-Hib and antitetanus antibodies, for which median half-lives have been evaluated at 29.3 days (range, 11.4 to 114) and 30.5 days (range, 16.1 to 47.5), respectively [40]. As IVIg were administered preferentially during the first 6 months post-transplant, it is unlikely that postvaccination assessments (>12 months post-transplant) were affected.

The time post-transplantation might affect vaccine responsiveness, as immune reconstitution is a dynamic process. Some guidelines recommend initiating vaccination at 6 months, others within a window of 6 to 12 months [17-19]. Here, the median time of vaccine initiation was 12.4 months post-transplant. Of note, time from HSCT to vaccination was not controlled in the present cohort, and patients referred earlier to the vaccination center responded as well as those vaccinated later but were also those with the most favorable hematologic characteristics and post-transplant course.

The present study has strengths and limitations, specifically the real-life setting, which offers advantages and drawbacks: the cohort included 33% of allo-HSCT recipients with a history of cGVHD, which is representative of the allo-HSCT population. Patients were vaccinated irrespective of immune reconstitution parameters. However, as only allo-HSCT recipients referred to the vaccination center by their treating hematologist were included, this might be a source of selection bias. Multivariate analysis was not performed because of the overall good vaccine response. Another limit concerns loss to follow-up, especially for the 24-month time point. Finally, cutoffs of protective antibody titers were derived from large-scale immunization studies in immunocompetent infants, but these cutoffs might not apply to allo-HSCT recipients.

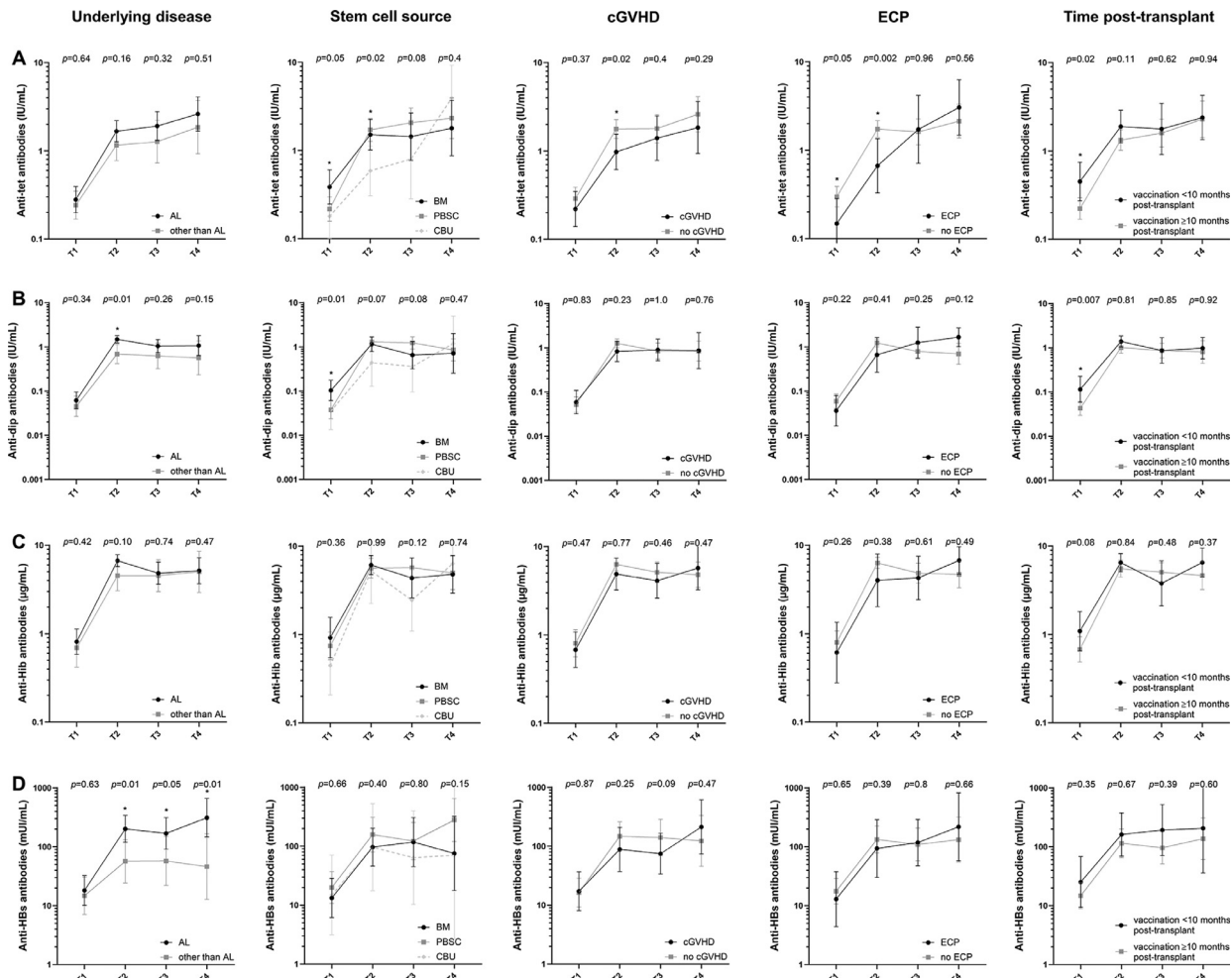


Figure 4. Geometric mean concentrations of specific antibodies in different immunization groups. Geometric mean concentrations and their 95% confidence intervals of specific antibodies for tetanus (A), diphtheria (B), *Haemophilus influenzae* type b (C), and hepatitis B (D) before vaccination (T1) and 6 (T2), 12 (T3), and 24 months (T4) after vaccine initiation, according to hematologic characteristics and to time of vaccine initiation. Antibody concentrations at different time points were compared between different immunization groups using the Mann-Whitney U test or the Kruskal-Wallis test, where appropriate. *P < .05. AL, acute leukemia; BM, bone marrow; CBU, cord blood unit; PBSC, peripheral blood stem cell.

In summary, the pediatric combined DTaP-HB-IPV-Hib conjugate vaccine was safe and overall effective in adult allo-HSCT recipients in eliciting a protective humoral response to diphtheria, tetanus, and Hib. Regarding hepatitis B vaccination, our data plead for the use of adult antigen dose, despite the burden of 3 additional vaccine shots. Interventional studies are needed to address the number of DTaP-HB-IPV-Hib conjugate vaccine doses needed, as additional booster might be necessary in some patient categories with factors hampering vaccine response. As currently under way in our center, a prospective cohort study including immune functional assays, in addition to clinical and serologic follow-up, could further contribute to refining the reimmunization agenda for adult allo-HSCT recipients at an individual level.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Pr. Mauricette Michallet, Dr. Xavier Thomas, Aylée-Tamara Tovar Sanchez, and Myriam Renault, as well as Verena Landel (Direction de la recherche clinique et de l'innovation, Hospices Civils de Lyon) for help in preparing the manuscript.

The Lyon HemInf study group includes the following: F. Ader, V. Alcazer, E. Bachy, M. Balsat, F. Barraco, M. Bocard, G. Billaud, P. Chauvelot, C. Chidiac, A. Conrad, S. Ducastelle-Leprière, O. Dumitrescu, D. Dupont, V. Escuret, T. Ferry, G. Fossard, E. Frobert, H. Ghesquière, H. Labussière-Wallet, M.-V. Larcher, M.-E. Langlois, F. Laurent, B. Lina, G. Lina, J. Menotti, P. Miaillhes, G. Monneret, F. Morfin-Sherpa, T. Perpoint, M. Perry, M. Rabodonirina, M. Renault, C. Roure-Sobas, G. Salles, S. Trouillet-Assant, F. Valour, F. Venet, F. Wallet, and M. Wallon.

Financial disclosure: This work was supported by a grant from the Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (Bourse du Groupe Vaccination et Prévention, 2017, to A.C.).

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

Authorship statement: A.C. contributed to acquisition of the data and interpretation of the data, performed the statistical analyses, and drafted the manuscript. M.P., M.-E.L., H.L.-W., F. B., S.D.-L., M.-V.L., M.B.a, M.B.o, C.C., T.F., and G.S. contributed to acquisition and interpretation of the data and revised the paper for important intellectual content. C.R.-S. contributed to acquisition and interpretation of the data, performed serologic analyses, and revised the paper for important intellectual content. F.V. participated in the design of the study and contributed to acquisition of the data, interpreted the data, and drafted the manuscript. F.A. conceived and designed the study; participated in acquisition, analysis, and interpretation of the data; and drafted the manuscript. All authors were involved in critical revision of the article for important intellectual content and approved the final version.

REFERENCES

- Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Masszi T. Revised edition of the European Bone Marrow Transplantation (EBMT)-European Society of Haematology (ESH) Handbook on Haematopoietic Stem Cell Transplantation. Available at: <https://ebmtonline.forumservice.net/>. Accessed March 4, 2019.
- Gratwohl A, Baldomero H, Aljurf M, et al. Hematopoietic stem cell transplantation: a global perspective. *JAMA*. 2010;303:1617–1624.
- Majhail NS, Rizzo JD, Lee SJ, et al. Recommended screening and preventive practices for long-term survivors after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47:337–341.
- Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2010;363:2091–2101.
- Hahn T, McCarthy PL, Hassebroek A, et al. Significant improvement in survival after allogeneic hematopoietic cell transplantation during a period of significantly increased use, older recipient age, and use of unrelated donors. *J Clin Oncol*. 2013;31:2437–2449.
- D'Souza A, Fretham C. Current uses and outcomes of hematopoietic cell transplantation (HCT): CIBMTR summary slides. 2018. Available at:

<https://www.cibmtr.org/ReferenceCenter/SlidesReports/SummarySlides/pages/index.aspx#CiteSummarySlides>. Accessed July 14, 2019.

- Aucouturier P, Barra A, Intrator L, et al. Long lasting IgG subclass and anti-bacterial polysaccharide antibody deficiency after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1987;70:779–785.
- Kumar D, Humar A, Plevneshi A, et al. Invasive pneumococcal disease in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: a decade of prospective population-based surveillance. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41:743–747.
- Rozmus J, Mallhi K, Ke J, Schultz KR. Functional hyposplenism after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50:1343–1347.
- Li Volti S, Mauro L, Di Gregorio F, et al. Immune status and immune response to diphtheria-tetanus and polio vaccines in allogeneic bone marrow-transplanted thalassemic patients. *Bone Marrow Transplant*. 1994;14:225–227.
- Parkkali T, Ruutu T, Stenvik M, et al. Loss of protective immunity to polio, diphtheria and *Haemophilus influenzae* type b after allogeneic bone marrow transplantation. *APMIS*. 1996;104:383–388.
- Parkkali T, Olander RM, Ruutu T, et al. A randomized comparison between early and late vaccination with tetanus toxoid vaccine after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*. 1997;19:933–938.
- Ljungman P, Lewensohn-Fuchs I, Hammarström V, et al. Long-term immunity to measles, mumps, and rubella after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1994;84:657–663.
- Kaloyannidis P, Batsis I, Yannaki E, et al. Allografted recipients immunized against hepatitis B virus are at high risk of gradual surface antibody (HbsAb) disappearance post transplant, regardless of adoptive immunity transfer. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13:1049–1056.
- Ljungman P, Engelhard D, de la Cámara R, et al. Vaccination of stem cell transplant recipients: recommendations of the Infectious Diseases Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35:737–746.
- Hilgendorf I, Freund M, Jilg W, et al. Vaccination of allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients: report from the international consensus conference on clinical practice in chronic GVHD. *Vaccine*. 2011;29:2825–2833.
- Rubin LG, Levin MJ, Ljungman P, et al. 2013 IDSA clinical practice guideline for vaccination of the immunocompromised host. *Clin Infect Dis*. 2014;58:309–318.
- Cordonnier C, Einarsdóttir S, Cesaro S, et al. Vaccination of haematopoietic stem cell transplant recipients: guidelines of the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis*. 2019;19:e200–e212.
- HSCP. *Vaccination des personnes immunodéprimées ou aspléniques. Recommandations actualisées*. Paris, France: Haut Conseil de la Santé Publique; 2014. Available at: <https://www.hscp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=504>. Accessed November 6, 2019.
- Australian Government, Department of Health. Recommendations for revaccination after haematopoietic stem cell transplant in children and adults. 2018. Available at: <https://immunisationhandbook.health.gov.au/resources/handbook-tables/table-recommendations-for-revaccination-after-haematopoietic-stem-cell>. Accessed July 14, 2019.
- Government of Canada. Immunization of immunocompromised persons: Canadian Immunization Guide. 2007. Available at: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/healthy-living/canadian-immunization-guide-part-3-vaccination-specific-populations/page-8-immunization-immunocompromised-persons.html#t3>. Accessed November 6, 2019.
- Ljungman P, Cordonnier C, Einsele H, et al. Vaccination of hematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:521–526.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127:2391–2405.
- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127:2375–2390.
- Lee SJ. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2017;129:30–37.
- Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21:389–401.e1.
- Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17:1055–1065.
- Inaba H, Hartford CM, Pei D, et al. Longitudinal analysis of antibody response to immunization in paediatric survivors after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2012;156:109–117.
- Shah GL, Shune L, Purtil D, et al. Robust vaccine responses in adult and pediatric cord blood transplantation recipients treated for hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21:2160–2166.
- Patel SR, Ortin M, Cohen BJ, et al. Revaccination of children after completion of standard chemotherapy for acute leukemia. *Clin Infect Dis*. 2007;44:635–642.
- Olkinuora H, Käyhty H, Davidkin I, et al. Immunity after (re)vaccination of paediatric patients following haematopoietic stem cell transplantation. *Acta Paediatr*. 2012;101:e373–e377.
- Jaffe D, Papadopoulos EB, Young JW, et al. Immunogenicity of recombinant hepatitis B vaccine (rHBV) in recipients of unrelated or related allogeneic hematopoietic cell (HC) transplants. *Blood*. 2006;108:2470–2475.

33. Zajac BA, West DJ, McAleer WJ, Scolnick EM. Overview of clinical studies with hepatitis B vaccine made by recombinant DNA. *J Infect.* 1986;13:39–45.
34. Launay O, van der Vliet D, Rosenberg AR, et al. Safety and immunogenicity of 4 intramuscular double doses and 4 intradermal low doses vs standard hepatitis B vaccine regimen in adults with HIV-1: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2011;305:1432–1440.
35. Fisman DN, Agrawal D, Leder K. Effect of age on immunologic response to recombinant hepatitis B vaccine: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2002;35:1368–1375.
36. Arai S, Arora M, Wang T, et al. Increasing incidence of chronic graft-versus-host disease in allogeneic transplantation: a report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21:266–274.
37. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, et al. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol.* 2016;7:507.
38. Suchin KR, Cassin M, Washko R, et al. Extracorporeal photochemotherapy does not suppress T- or B-cell responses to novel or recall antigens. *J Am Acad Dermatol.* 1999;41:980–986.
39. Centers for Disease Control and Prevention. *Vaccination & Immunoprophylaxis: General Recommendations. CDC Yellow Book 2020: Health Information for International Travel.* New York, NY: Oxford University Press; 2017. Available at: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/preparing-international-travelers/vaccination-and-immunoprophylaxis-general-recommendations>. . Accessed September 27, 2019.
40. Wasserman RL, Church JA, Peter HH, et al. Pharmacokinetics of a new 10% intravenous immunoglobulin in patients receiving replacement therapy for primary immunodeficiency. *Eur J Pharm Sci.* 2009;37:272–278.

3. Troisième article : étude VaccHemInf-FIGHT

Titre : 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

Auteurs : Anne Conrad, Mathilde Boccard, Florent Valour, Vincent Alcazer, Aydee-Tamara Tovar Sanchez, Christian Chidiac, Frédéric Laurent, Philippe Vanhems, Gilles Salles, Karen Brengel-Pesce, Boris Meunier, Sophie Trouillet-Assant, Florence Ader, on behalf of the Lyon HEMINF Study Group

Revue : BMJ Open

IF/rang : 2,496/C

Référence : BMJ Open. 2019 Feb 15;9(2):e026093

doi : 10.1136/bmjopen-2018-026093.

Avant-propos :

Forts de l'expérience acquise dans le cadre de la première étude VaccHemInf, nous avons souhaité affiner notre approche d'étude de la réponse vaccinale après greffe de CSH en apportant les modifications majeures suivantes à notre méthodologie :

- extension du suivi prospectif aux adultes receveurs d'une auto-CSH, éligibles d'après les recommandations à une revaccination selon les mêmes modalités que les receveurs d'allo-CSH, alors qu'il existe encore moins de données de réponse et tolérance vaccinales dans cette population particulière ;
- mise en œuvre du calendrier vaccinal spécifique au plus proche des recommandations, en initiant les revaccinations dès 6 mois post-greffe, autant que possible ;
- évaluation de la reconstitution immunitaire sur le plan quantitatif et fonctionnel par l'intermédiaire d'un panel de tests de fonctionnalité immunitaire, avec pour objectif d'identifier les paramètres de reconstitution immunitaire associés à la réponse vaccinale ;
- évaluation de la réponse vaccinale au niveau humoral mais également, pour certaines valences, au niveau cellulaire *via* des tests de fonctionnalité immunitaire.

En collaboration avec le Service d'Hématologie des HCL, l'Institut des Agents Infectieux, le Laboratoire d'Immunologie des HCL, le Laboratoire Commun de Recherche HCL-bioMérieux, le Centre International de Recherche en Infectiologie et le Centre de Ressources Biologiques Sud nous avons donc conçu l'étude VaccHemInf-FIGHT (NCT03659773), dont la méthodologie a fait l'objet de cette publication dédiée, présentée ci-dessous.

L'inclusion et le suivi clinique des patients ont été faits par moi-même et le Pr Florence Ader, les tests sérologiques à l'Institut des Agents Infectieux des HCL sous la responsabilité du Dr Roure-Sobas, l'immunophénotypage des sous-populations lymphocytaires au laboratoire d'immunologie de HCL sous la responsabilité du Pr Fabienne Venet et les tests de fonctionnalité immunitaire au Laboratoire Commun de Recherche HCL-bioMérieux par William Mouton et Mathilde Bocard, sous la responsabilité des Drs Sophie Assant et Karen Brengel-Pesce.

Méthodes :

Il s'agit d'une étude de cohorte prospective monocentrique de receveurs d'allo- et auto-CSH, vaccinés conformément aux recommandations du HCSP (3+1 injections de vaccin combiné pédiatrique penta- ou hexavalent DTPCa-Hib±HBV et 3 injections de VPC-13 puis 1 injection de VPP-23 (ou VPC-13 en cas de GvHD chronique active)) et suivis à l'initiation (V1) puis à 6 (V2), 12 (V3) et 24 mois (V4) du début des revaccinations (170).

Le schéma d'étude est représenté figure 10.

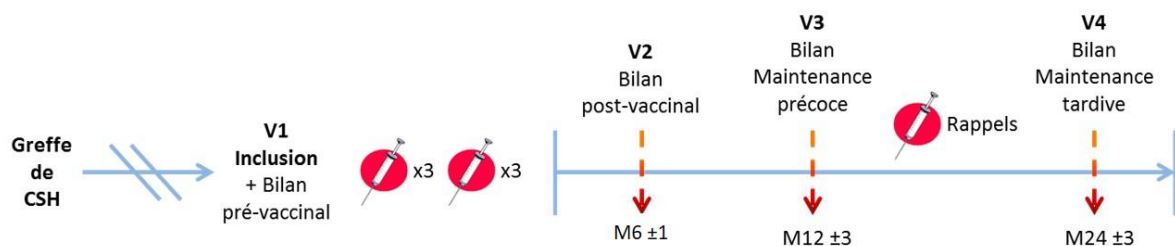


Figure 10. Schéma de l'étude VacHemInf-FIGHT, évaluant la réponse vaccinale et la reconstitution immunitaire chez des adultes receveurs de greffe de CSH, vaccinés conformément aux recommandations du HCSP (170).

La réponse vaccinale à cinq valences des vaccinations recommandées au cours de la première année post-greffe est évaluée au moyen de sérologies commerciales : D, T, Hib, HBV et pneumocoques (sérologie « globale » dosant les anticorps IgG dirigés contre les 23 sérotypes contenus dans le VPP-23).

Le critère de jugement principal est la réponse vaccinale évaluée en termes de proportion (IC95 selon Clopper et Pearson) de patients présentant des anticorps \geq seuil de séroprotection (D et T : 0,1 UI/mL ; Hib : 1 μ g/mL ; HBV : 10 mUI/mL) (236).

Les critères de jugement secondaires sont l'évolution des concentrations d'anticorps (exprimées sous forme de GMC [IC95]) et de la proportion de patients doublant au moins leur taux d'anticorps pour une valence donnée.

La reconstitution immunitaire est évaluée pour tous les patients au niveau quantitatif par un dosage pondéral des Ig G/A/M et un immunophénotypage des sous-populations lymphocytaires étendu T-B-NK, avec numération par cytométrie en flux des contingents lymphocytaires T naïfs (CD45RA+CCR7+), à mémoire centraux (CD45RA-CCR7+), effecteurs à mémoire (CD45RA-CCR7-) et à mémoire en différenciation terminale (TEMRA, CD45RA+CCR7-).

Pour un sous-groupe de patients (étude FIGHT : environ 1 patient sur 2, pas de randomisation), la reconstitution immunitaire a été évaluée sur le plan fonctionnel en réponse à des stimuli définis, à l'inclusion et à 6 mois.

Les stimulations *in vitro* sont effectuées avec :

- de la PHA, mitogène non spécifique ;
- du lipopolysaccharide (LPS) d'*Escherichia coli*, agoniste des Toll like receptor-4 (TLR-4), et de l'entérotoxine staphylococcique B (SEB), superantigène, utilisés respectivement comme stimulants des réponses immunitaires innée et adaptative ;
- des antigènes vaccinaux : vaccin antitétanique monovalent (Tetanol pur®, GSK) et vaccin VPC-13 (Prevenar 13®, Pfizer), utilisés pour évaluer la réponse cellulaire T aux vaccins antitétanique et antipneumococcique ;
- une préparation antigénique VZV commerciale (VZV grade 2 antigen, Microbix Biosystems), correspondant au surnageant d'une lignée cellulaire (MRC-5) infectée par le VZV et traité par irradiation γ , et la préparation antigénique « contrôle » (surnageant de cellules MRC-5 non infectées).

Les *readouts* suivants sont analysés :

- Sur PBMC : stimulés par la PHA (contrôle positif), des antigènes vaccinaux ou de l'antigène VZV
 - Prolifération lymphocytaire, évaluée en cytométrie en flux par quantification de l'incorporation dans les LT (cellules CD3+) du 5-éthynyl-2'-deoxyuridine (EdU) au moyen du Click-It EdU AF488 flow kit (Life Technologies) et exprimée en proportion (%) de LT CD3+ EdU+ ;
 - Sécrétion d'IFN- γ , dosée dans les surnageants par technique immunoenzymatique automatisée (Ella Automated Immunoassay System, Bio-Techne)
- Sur sang total : stimulation par des antigènes vaccinaux ou de l'antigène VZV
 - Expression des gènes *tnf- α* et *ifn- γ* , mesurée par PCR quantitative

- Sur sang total incubé dans des tubes TruCulture®, systèmes de tubes permettant la stimulation du sang total en conditions standardisées (257,258) : stimulation par du LPS et du SEB (voir manuscrit en cours de préparation, Annexe 1)
 - Analyse de l'expression, au niveau transcriptomique, d'un panel conçu sur mesure de 144 gènes par quantification des transcrits d'ARNm (nCounter technology, NanoString Technologies) ;
 - Mesure de la sécrétion de cytokines dans les surnageants

Enfin, une biobanque (PBMC, ARN et plasma) est constituée. Sur les échantillons de plasma, la virémie de Torque Teno Virus (TTV) a été quantifiée (voir Annexe 2).

Ces tests de fonctionnalité immunitaire ont également été effectués sur des échantillons provenant de volontaires sains (donneurs de sang).

Par ailleurs, une étude ancillaire « FLU-VIVA » (pour *Influenza vaccine effectiveness assessment among allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients*) a été conduite à l'occasion de la campagne de vaccination antigrippale 2019-2020 chez des receveurs d'allo-CSH et des professionnels de santé (sains).

3.1. Publication : protocole de l'étude VaccHemInf-FIGHT

BMJ Open 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

Anne Conrad,^{1,2,3} Mathilde Boccard,^{1,2,3} Florent Valour,^{1,2,3} Vincent Alcazer,^{3,4} Aydee-Tamara Tovar Sanchez,^{5,6} Christian Chidiac,^{1,3} Frédéric Laurent,^{1,2,3,7} Philippe Vanhems,^{2,3,5,6} Gilles Salles,^{3,4} Karen Brengel-Pesce,⁸ Boris Meunier,^{8,9} Sophie Trouillet-Assant,^{2,3,8,10} Florence Ader,^{1,2,3} on behalf of the Lyon HEMINF Study Group

To cite: Conrad A, Boccard M, Valour F, *et al.* 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* 2019;**9**:e026093. doi:10.1136/bmjopen-2018-026093

► Prepublication history for this paper is available online. To view these files, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2018-026093>).

Received 16 August 2018
Revised 6 November 2018
Accepted 7 November 2018



© Author(s) (or their employer(s)) 2019. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to

Dr Florence Ader;
florence.ader@chu-lyon.fr

ABSTRACT

Introduction Immune reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a complex and dynamic process, varying from a state of nearly complete immunosuppression to an expected full immune recovery. Specific vaccination guidelines recommend reimmunisation after HSCT but data regarding vaccine efficacy in this unique population are scarce. New immune functional assays could enable prediction of vaccine response in the setting of HSCT.

Methods and analysis A prospective, longitudinal single-centre cohort study of autologous and allogeneic HSCT recipients was designed in order to determine the vaccine response to five vaccine targets (pneumococcus, hepatitis B virus, *Haemophilus Influenzae* type b, tetanus and diphtheria) and to correlate it to immune function parameters. A workflow was set up to study serological response to vaccines and to describe the functional immune status of 100 HSCT recipients (50 autologous and 50 allogeneic) before and 3, 12 and 24 months after primary immunisation. At each time point, 'basic' immune status recording (serology, immunophenotyping of lymphocyte subsets by flow cytometry) will be assessed. The immune response will furthermore be evaluated before and 3 months after primary vaccination by two ex vivo immune functional assays assessing: (1) tumour necrosis factor alpha, interferon gamma production and host messenger RNA expression on whole-blood stimulation by lipopolysaccharide or *Staphylococcus aureus* enterotoxin B and (2) T-lymphocyte proliferation in response to a standard mitogen (phytohaemagglutinin) or to selected recall antigens. Reference intervals will be determined from a cohort of 30 healthy volunteers. This translational study will provide data describing vaccine response, immune functionality of HSCT recipients over time and will allow mapping HSCT recipients with regard to their immune function.

Strengths and limitations of this study

- This is a prospective study to describe the response to five major vaccines among a cohort of adult autologous and allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) recipients in a 'real-life' setting.
- Secondary outcomes of this study will offer opportunity to assess the impact of pretransplant and post-transplant factors (ie, graft-vs-host disease) as well as of functional immune status of HSCT recipients on vaccine response.
- Innovative immune functional assays will assess innate and adaptive immune response of HSCT recipients at the transcriptomic, protein and cellular level before and 3 months after primary vaccination.
- Immunisation will be initiated on haematologist's referral, which might create a bias of inclusion and impact vaccine response.
- Biomarkers of immune functionality could help to optimise vaccine schedules at an individual level, but this will have to be addressed and validated in further specific studies.

Ethics and dissemination Ethical approval has been obtained from the institutional review board (no 69HCL17_0769). Results will be communicated at scientific meetings and submitted for publication in peer-reviewed journals.

Trial registration number NCT03659773; Pre-results.

INTRODUCTION

Haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a cellular therapy aiming at curing malignant and non-malignant

haematological diseases.¹⁻³ Allogeneic HSCT is based on the transfer of an immune system from a donor to a recipient through replacement of haematopoietic stem cells for diseases such as acute leukaemia or thalassaemia major that are otherwise refractory to treatment. Autologous HSCT is based on the reinjection of recipients' own immune system ensuing intensive chemotherapy for diseases such as multiple myeloma or aggressive lymphoma. On HSCT, recipients experience a phase of profound immunosuppression with loss of protective immunity against most infectious agents followed by gradual immune recovery.²⁻⁴ Infections are among the most frequent complications after HSCT, and consequently, key players for recipients' outcome.² Indeed, infections are the second cause of death for both autologous and allogeneic HSCT beyond day 100 post-transplant.⁵ Reimmunisation of HSCT recipients against vaccine-preventable infections is an important post-transplant intervention for reducing morbimortality.⁶ Consistently, vaccination schedules have been proposed by various expert committees, based on epidemiology of vaccine-preventable diseases and the relatively few data available on efficacy, safety and effectiveness of vaccines in the HSCT setting.⁶⁻¹¹ However, some studies have suggested that patients with haematological malignancies and an impaired immune status might benefit, especially for influenza, from additional vaccine doses to those recommended at present.¹²⁻¹³ Therefore, addressing vaccine response obtained in HSCT recipients in a 'real-life' setting with the currently recommended vaccination schedule is an important issue.

Studies have brought evidence of immune responsiveness to vaccines after HSCT, referred to as vaccine efficacy. The reference method for assessing vaccine efficacy is the measurement of serum antibody titres. Nonetheless, antibody titres do not correlate accurately with clinical protection, in addition to the issue of durability of protection.¹⁴ Given the complexity and heterogeneity of HSCT recipients, it is unlikely that a single biomarker is sufficient to assess vaccine-induced protection. A panel of validated operational biomarkers may bring enough information to achieve such a goal. Moreover, immune recovery is a highly dynamic process, and it is unlikely that all recipients fit into a single pattern of reimmunisation: on the one hand, some HSCT recipients, according to their functional immune status, might require delayed initiation of their reimmunisation schedule and/or higher amounts of vaccine antigens (ie, multiple vaccine doses) to improve response to vaccination. On the other hand, some HSCT recipients with rapid and good-quality immune reconstitution might benefit from an earlier implementation of the vaccination schedule. The various pretransplant and post-transplant factors influencing immune recovery and immunisation response might consequently be included in more personalised post-transplant vaccination schedules.

Rationale

The VaccHemInf project aims to assess the efficacy of recommended vaccines in adult patients undergoing autologous or allogeneic HSCT, challenging the antibody titre reference method by a panel of immune functional assays measuring at different time points cellular immune responsiveness to standardised antigens and vaccines. Our hypothesis is that many pretransplant and post-transplant factors are involved in the vaccine response, which may be altered durably after HSCT. Consequently, a panel of immune functional assays may best predict vaccine efficacy at the individual level.

Objectives

We have assigned two objectives to the VaccHemInf project: (1) to assess efficacy of five major vaccines (pneumococcus, hepatitis B virus (HBV), *Haemophilus Influenzae* type b, tetanus and diphtheria) administered after HSCT using the antibody titre reference method in a 'real-life' setting, in correlation with multiple variables related to haematological characteristics, treatment management, pattern of post-transplant immune recovery and transplant-related complications; (2) to evaluate innovative ex vivo immune functional assays testing biomarkers aiming at measuring vaccine-specific response. This part of the VaccHemInf project is named *Fonctionnalité Immunitaire après Greffe de cellules souches Hématopoïétiques* (FIGHT).

Deliverables

The assigned agenda is to measure sequentially the functional innate and adaptive immune response to five vaccines and to identify transplant-related factors associated with low or no immunisation. 'Mapping' the recipients of HSCT on an immunological scale would allow predicting vaccine efficacy, and ultimately establish a personalised standard of care for vaccinations based on recipient immune recovery record.

METHODS AND ANALYSIS

Study design

The VaccHemInf project is a single-centre prospective, consecutive cohort of adult HSCT recipients transplanted at the Haematology department of a 5362-bed tertiary-care university hospital (Lyon, France). During the past 5 years, the 114-bed Haematology department carried out an average of 102 (range, 90-110) and 81 (range, 73-88) autologous and allogeneic HSCT yearly, respectively.

Setting

On referent haematologist's agreement, eligible adult (autologous or allogeneic) HSCT recipients will be referred to the vaccination centre dedicated to immunocompromised patients hosted by the Infectious Diseases department of Lyon's university hospital for inclusion in the VaccHemInf cohort. The recruitment period will be of 24 months and recipient overall follow-up will cover

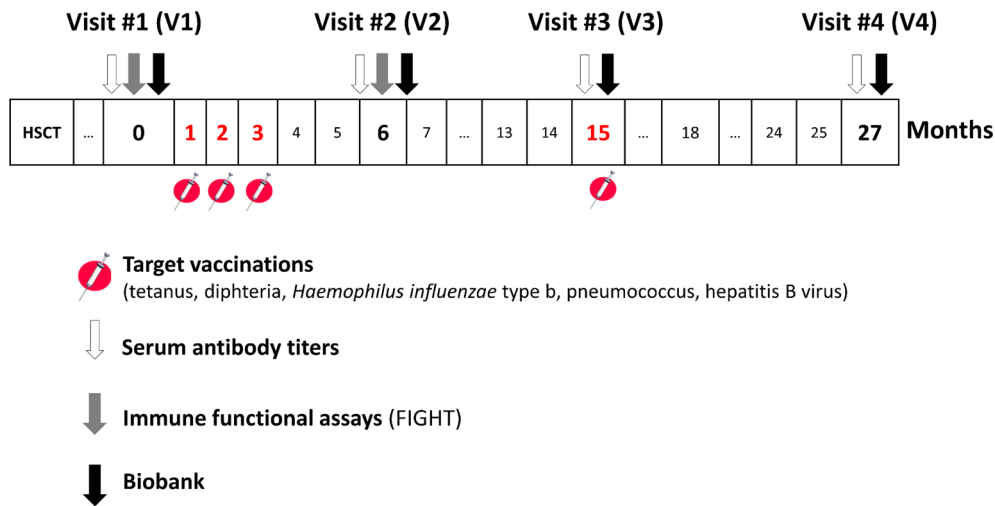


Figure 1 Workflow of vaccines and sampling schedule of the VaccHemInf cohort. FIGHT, Fonctionnalité Immunitaire après Greffe de cellules souches Hématopoiétiques; HSCT, haematopoietic stem cell transplantation.

a period of 48 months. For the purpose of FIGHT, 30 control healthy volunteers will be enrolled and will be tested for immune functional assays. Healthy volunteers will be recruited among the donors to the blood bank of the Etablissement Français du Sang (EFS) of Lyon. According to the EFS standardised procedures for blood donation, informed consent will be obtained from healthy donors, and personal data will be anonymised at the time of blood donation prior to the transfer of blood to the research laboratory.

Participants

The workflow of the VaccHemInf cohort is described in figure 1. Recipients aged 18 years or more will be included. During the first visit (V1), explanations will be given on: (1) implementation of the vaccination schedule and preblood test assessment and (2) postvaccination

assessments at the 3 months (V2), 12 months (V3) and 24 months (V4) visits to monitor vaccine response and tolerance. FIGHT immune functional assays will only be performed at V1 and V2, as described in the workflow presented in figure 2. Exclusion criteria will apply in case of post-transplant relapse of the haematological underlying disease or in case of recipients' death.

Endpoints

To address the objectives mentioned above, the primary endpoint will be to measure vaccine-specific antibody titres and to express vaccine response in percentage of responders and geometric mean titres (GMTs) immediately before and at 3, 12 and 24 months after vaccinations.

Secondary endpoints will be: (1) to investigate immune status before and 3, 12 and 24 months after vaccinations through the routine immunomonitoring and FIGHT new

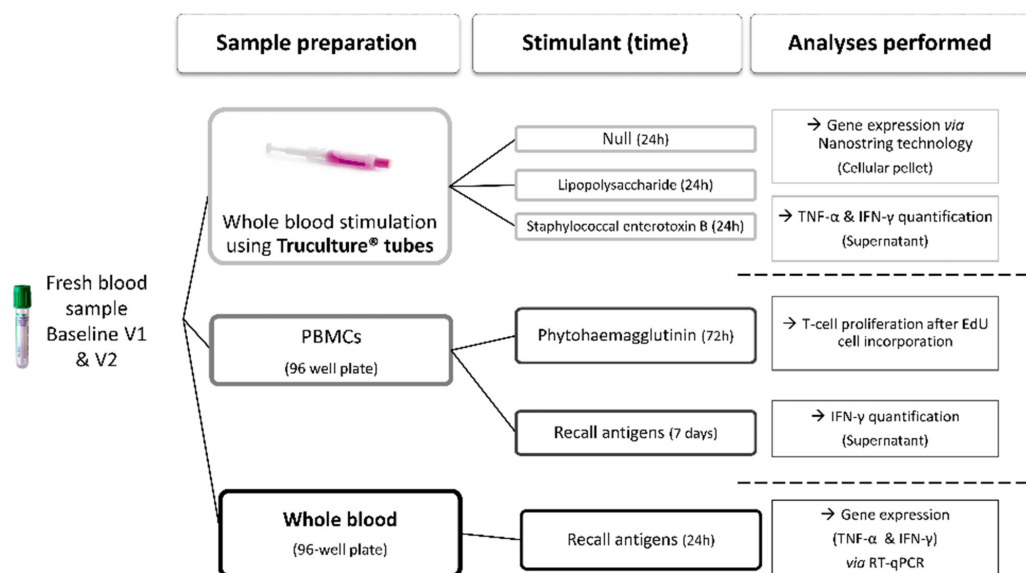


Figure 2 Workflow of the immune functional assays ('FIGHT') of the VaccHemInf cohort. EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; FIGHT, Fonctionnalité Immunitaire après Greffe de cellules souches Hématopoiétiques; IFN-γ, interferon gamma; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; RT-qPCR, real-time reverse transcription PCR; TNF-α, tumour necrosis factor alpha.

Box 1 List of pretransplant variables

Age at transplantation
 Gender
 Comorbidities
 ▶ HCT-CI.¹⁵
 ▶ Diabetes mellitus.
 ▶ Tobacco smoking (active/stopped, pack per year).
 ▶ Chronic pulmonary disease.
 ▶ Chronic heart condition.
 ▶ Chronic neurological condition.
 ▶ Autoinflammatory disease.
 Underlying haematological diseases
 ▶ Acute myeloid leukaemia/myelodysplastic syndrome.
 ▶ Acute lymphoblastic leukaemia.
 ▶ Myeloproliferative neoplasms.
 ▶ Acquired bone marrow failure syndrome.
 ▶ Lymphoproliferative neoplasms/multiple myeloma.
 Anti-HLA antibodies
 ▶ Positive/negative.
 ▶ Donor specific.
 Splenectomy/functional hyposplenism
 HCT-CI, Haematopoietic Cell Transplantation Comorbidity Index.

immune functional assays; (2) to thoroughly document vaccine safety; (3) to implement an exhaustive prospectively maintained database including variables related to the above endpoints.

Variables

The following data will be exhaustively recorded in a VaccHemInf-specific numerical clinical record folder (e-CRF): demographics, comorbidities using the Haematopoietic Cell Transplantation Comorbidity Index¹⁵ and haematological underlying conditions (box 1). The transplant characteristics will include disease status at transplantation, prior transplantation(s), conditioning regimen, graft cellularity, donor type, donor HLA matching, stem cell source, graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis including post-transplant cyclophosphamide for haploidentical transplants, and donor and recipient serostatus for cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and toxoplasmosis (box 2). The post-transplant characteristics will include time to engraftment, second graft when appropriate, occurrence and grade of acute GVHD and its treatment, occurrence and grade of chronic GVHD according to the last National Institutes of Health Consensus criteria and its treatment,^{16 17} opportunistic infections of bacterial, fungal, viral or parasitic origin occurring on conditioning (day 7 before HSCT) and after HSCT using the European Group for Blood and Marrow Transplantation classification for infections, infectious agent-related reactivations and diseases (updated with the latest guidelines, and which list and full definition criteria are provided in table 1),^{18–32} peripheral blood T-lymphocytes and B-lymphocytes subsets and natural killer counts (box 3). Event variables will correspond to the applied French vaccination schedule (table 2).⁷ The responses to vaccines are defined as follows: for pneumococcus, a

Box 2 List of transplant variables**Disease status at transplantation**

- ▶ Early.
 - ▶ Intermediate.
 - ▶ Advanced.
- Prior transplantation(s)

Gender mismatch

- ▶ Male recipient with female donor.

Conditioning regimen

- ▶ Myeloablative.
- ▶ Reduced intensity.
- ▶ Total body irradiation (yes/no, dose).

Graft cellularity

Total nucleated cells

- ▶ Bone marrow/peripheral blood (10^8 cells/kg).
- ▶ Cord blood (10^7 cells/kg).

CD34+ cells

- ▶ Bone marrow/peripheral blood (10^6 cells/kg).
- ▶ Cord blood (10^5 cells/kg).

CD3+ cells (10^6 cells/kg)

ABO mismatch

- ▶ No mismatch.
- ▶ Major.
- ▶ Minor.
- ▶ Bidirectional.

Donor HLA matching

- ▶ Matched sibling.
- ▶ Matched unrelated donor.
- ▶ Mismatched unrelated donor.
- ▶ Cord blood (matched or mismatched).
- ▶ Haploidentical.

Stem cell source

- ▶ Bone marrow.
- ▶ Peripheral blood mobilised stem cells.
- ▶ Cord blood.

Graft-versus-host disease prophylaxis

- ▶ Antithymocyte globulins.
- ▶ Ciclosporin.
- ▶ Tacrolimus.
- ▶ Methotrexate.
- ▶ Mycophenolate mofetil.
- ▶ Cyclophosphamide.
- ▶ Methylprednisolone.

Donor and recipient serostatus

- ▶ Cytomegalovirus.
- ▶ Epstein-Barr virus.
- ▶ Toxoplasmosis.
- ▶ Hepatitis B virus.

30–270 mg/L IgG titre corresponds to a healthy population range (supplier data). In immunocompetent adults vaccinated with the 23-valent non-conjugated pneumococcal vaccine, the median increase in IgG titre was 4.7 (IQR, 2.7–6.6) times.^{33–35} Consequently, a fourfold increase in the IgG titre will be considered significant to

Table 1 EBMT classification of infections and current criteria for infections, infectious agent-related reactivations and diseases according to the latest consensus of reference definitions for each infection

Type of infection	References
Fungal	<i>Aspergillus</i> spp diseases ¹⁹ <i>Candida</i> spp diseases ²⁰ Mucormycosis ²¹ Hyalohyphomycosis-related diseases ²² <i>Pneumocystis jirovecii</i> pneumonia ²³
Viral Were excluded: directly treated low viral load (<3 log ₁₀ copies/mL for CMV/HHV-6, <4 log ₁₀ UI/mL for EBV, evidence of BK virus in urine without symptoms nor BK viraemia)	EBV ²⁴ CMV ^{25 26} HHV-6, -7, -8 ²⁵ BK virus ²⁷ Adenovirus ²⁸ Influenza virus ²⁹ Community-acquired respiratory viruses ³⁰
Bacterial infections	BSI without organ dysfunction BSI with at least one organ dysfunction: according to 2016 Sepsis-3 criteria ³¹ : Sepsis (qSOFA and SOFA ≥2) Septic shock
Parasitic	Toxoplasmosis ³²
Sepsis of unknown origin	≥5 days persistent fever (≥38.5°C) under appropriate anti-infectious agent escalation, without any documentation.

BSI, blood stream infection; CMV, cytomegalovirus; EBMT, European Group for Blood and Marrow Transplantation; EBV, Epstein-Barr virus; HHV, human herpes virus; SOFA, sepsis-related organ failure assessment.

reach immunisation. For *H. influenzae* type b, serology has no definite critical value. In immunocompetent adults vaccinated with the *H. influenzae* type b conjugate vaccine, the median increase in IgG titre was 5 (IQR, 3.5–7) times.^{35 36} Consensually, values between 0.15 and 1 µg/mL will be considered to be short-term protective, with a linearity limit of 9 µg/mL.^{36 37} An IgG titre higher than the standard protection threshold will be considered protective for tetanus and diphtheria (≥0.1 IU/mL) and HBV (anti-HBs antibody titre >10 mIU/mL).³⁸ An anti-HBs titre >100 IU/mL will be considered to confer long-lasting protection.³⁹

FIGHT immune functional assays

To investigate innate and adaptive immune responses, two standardised immune functional assays will be carried out based on the findings of the REALISM project, which has established reference intervals in a large cohort of healthy volunteers.⁴⁰ Briefly, the first immune functional assay will consist in collecting whole blood samples using the standardised TruCulture system (Myriad RBM, Austin, Texas, USA) directly containing immunogenic stimuli: medium alone (Null), lipopolysaccharide (LPS) at 100 ng/mL (from *Escherichia coli* O55:B5), and *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB) at 0.4 µg/mL, respectively.⁴¹ On a 24-hour stimulation at 37°C, the supernatant and the pellet will be collected using the separation valve. The supernatant will be stored at -80°C until batch serial quantification of cytokines tumour necrosis factor alpha (TNF-α) and interferon gamma (IFN-γ) with Simple plex cartridges (ProteinSimple, San Jose, California, USA)

using the ELLA platform (ProteinSimple). The cellular pellet will be stabilised in 2 mL of Trizol LS (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) and the messenger RNA (mRNA) will be isolated with the NucleoSping 96 RNA tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) for analysis of mRNA expression using the nCounter technology (NanoString Technologies, Seattle, Washington, USA), consisting in an RNA hybridisation method, whose gene set can include up to 780 genes.^{41 42}

The second immune functional assay will consist in inducing T-lymphocyte proliferation and measuring IFN-γ release in the supernatant in response to an ex vivo stimulation with a standard mitogen, phytohaemagglutinin (PHA). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) will be isolated from fresh, heparinized blood samples by Ficoll density gradient centrifugation (U-04; Eurobio, Les Ulis, France) and will be incubated with culture medium overnight. Then, PBMCs will be stimulated in duplicate with PHA at 4 µg/mL (R30852801; Remel, Oxoid, Thermo Fisher Scientific, USA) in a 96-well cell culture plate at 37°C for 72 hours. On incubation, supernatant will be harvested for IFN-γ quantification using the ELLA platform. Cells will be harvested and cell proliferation will be determined by the incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) at 10 µM for 2 hours in T-cells using the Click-It EdU AF488 flow kit (C10420; Life Technologies, Carlsbad, California, USA). In first, cells will be stained with allophycocyanin (APC)-labelled anti-CD3 monoclonal antibodies (Beckman Coulter, Brea, California, USA), fixed with IOTest 3 fixative solution (Beckman

Box 3 List of post-transplant variables

- Time to engraftment (days)
- Second graft (when appropriate)
- Receipt of donor lymphocyte infusion(s)
- Receipt of intravenous immunoglobulins
- Adjunctive post-transplant drug(s)
- Acute graft-versus-host disease (GVHD)
 - ▶ Yes/no.
 - ▶ Grade.
 - ▶ Localisation(s).
 - ▶ Treatment.
- Chronic GVHD
 - ▶ Yes/no.
 - ▶ Grade.
 - ▶ Localisation(s).
 - ▶ Treatment.
 - ▶ Extracorporeal photopheresis.
- Infections (refer to [table 1](#) for full list and references)
 - ▶ Bacterial.
 - ▶ Fungal.
 - ▶ Viral.
 - ▶ Parasitic.
 - ▶ Catheter related.

Immunological parameters

- Peripheral blood immunoglobulins M, G, A
- Peripheral blood T-lymphocyte subset counts
 - ▶ CD3+.
 - ▶ CD4+.
 - ▶ CD8+.
 - ▶ Ratio CD4+/CD8+.
 - ▶ CD2+.
- Peripheral blood B-lymphocyte subset counts
 - ▶ CD19+.
 - ▶ CD20+.
 - ▶ CD21+.
- Natural killer counts

Coulter), and EdU will be activated with 100 μ L of a reaction cocktail containing Alexa Fluor 488 (AF488) azide (component of the Click-It). Flow cytometry analyses will be performed on a Navios flow cytometer (Beckman Coulter). CD3⁺ cells will be first selected among total events based on a monoparametric CD3-APC histogram. Then, the percentage of EdU⁺ cells among CD3⁺ cells, along with the geometric means of fluorescence intensity of EdU-AF488 in this population, will be measured among 2.5×10^3 CD3⁺ cells recorded.⁴³

Using the immune functional assay described above, an innovative approach will consist in testing alternative recall antigens: varicella zoster virus (VZV) antigen (Microbix, Mississauga, Ontario, Canada), pneumococcal antigens (Pfizer, France) and tetanus toxoid (Pasteur Institute, Paris, France). The recall antigens stimulation will be performed on: (1) PBMCs, to quantify EdU⁺ cells and measure IFN- γ after 7 days of incubation; (2) whole blood samples for 24 hours in order to extract RNA (QIAamp RNA Blood Mini Kit, QIAGEN, France) and perform a reverse transcription using the SuperScript VILO cDNA

Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, France). TNF- α and IFN- γ gene expression will be quantified by qPCR using Taqman probes (Thermo Fisher Scientific) on CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

Routine cellular immunophenotyping will be processed at the Haematology and Immunology laboratories of Lyon university hospital (Lyon-Sud and Edouard Herriot hospitals, respectively). A large panel of B-cell and T-cell membrane markers associated with naïve or memory status will be investigated by flow cytometry. For B-cells, CD19+, CD20+, CD21+ and naïve B-cells (CD19+CD27-IgD+), memory B-cells commutated or not (CD19+CD27+IgD+/IgD-) will be counted. For T-cells, central memory T-cells (CD4+CD45 RA-CCR7+), effector memory T-cells (CD4+CD45 RA-CCR7- and CD4+CD45 RA+CCR7-) will be counted in addition of routine CD4+ and CD8+ subsets.

Sera from venous blood collection will be frozen at -20°C at the Institut des Agents Infectieux (Croix-Rousse Hospital, Lyon university hospital). Levels of specific serum IgG to seven serotypes included in the PCV13 vaccine (pn4, pn6B, pn9V, pn14, pn18C, pn19F, pn23F), and to pn1 and pn5 as markers of the immune response to PPV23, will be determined using a commercial ELISA (VaccZyme Anti-PCP IgG Enzyme Immunoassay Kit, Binding Site, UK). In addition, VZV-specific IgG and IgM (Liaison VZV IgG and IgM, DiaSorin, Italy), diphtheria-specific and tetanus-specific IgG (VaccZyme Diphtheria or Tetanus Toxoid IgG Enzyme Immunoassay Kit) as well as HBV-specific anti-HBs antibody (anti-HBs2, Advia XP Centaur, SIEMENS, Germany) titres will be determined.

The biobanking of viable PBMC through cryopreservation will require a specific written consent. PBMC samples will be stored at the Centre de Ressources Biologiques Cytathèque (Lyon-Sud Hospital, Lyon university hospital). Furthermore, the FIGHT cohort will provide the opportunity to establish four different types of biobanks, enabling further explorations of innovative biomarkers: (1) TruCulture plasma and mRNA from cellular pellet biobank from whole blood stimulated with LPS, SEB or unstimulated, to study immune response; (2) EDTA plasma biobank to study viral reactivation markers and soluble host biomarkers; (3) RNA biobank to study new transcriptomic host biomarkers (RNA will be extracted from whole blood collected in PAXgene Blood RNA tubes (Thermo Fischer Scientific)); (4) viable frozen PBMCs.

Study sample size

The VaccHemInf project focuses on a highly specific population of patients for whom few or no vaccine efficacy data are available based on transplant characteristics. As the main goal of the study is primarily descriptive (prevalence of responders at different follow-up times), a sample sizing is not required. However, taking into account that prevalence is not known at the selected follow-up times and that logistic regression models will be used, we based our calculation on Machin's rule of thumb suggesting the

Table 2 Recommendations for vaccinations in HSCT recipients according to current French guidelines

Immunisation target	Vaccine schedule
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3 doses of PCV13 in monthly intervals, starting 3 months post-HSCT. Fourth dose boost injection with PPSV23 at 12–18 months post-HSCT, substituted by PCV13 in recipients with chronic GVHD.
DTaPP	3 doses of the paediatric vaccine (DTaPP) in monthly intervals starting at 6 months post-HSCT. Boost injection with DTaPP at 18 months post-HSCT. Lifelong revaccination with dTapP every 10 years.
<i>Haemophilus influenzae</i> type b (Hib)	3 doses of the conjugate Hib vaccine in monthly intervals starting at 6 months post-HSCT. Boost injection at 18 months post-HSCT.
Influenza	1 dose of the inactivated trivalent vaccine starting 6 months post-HSCT. In case of ongoing outbreak, reduce the delay between HSCT and vaccination to 3 months. Lifelong annual vaccination by 1 dose of the inactivated trivalent vaccine. Vaccination of relatives and healthcare workers caring the patient is highly recommended.
Hepatitis B	4 injections (20 µg) at 6, 7, 8 and 18 months post-transplantation.
<i>Neisseria meningitidis</i>	2 doses of MC4V 6 months apart, starting 12–18 months post-HSCT. 2 doses of 4CMenB 1 month apart, starting 12–18 months post-HSCT.

4CMenB, 4-component meningococcal B vaccine; DTaPP, diphtheria, tetanus, acellular pertussis and poliovirus (with full dose of diphtheria and acellular pertussis toxoids); dTapP, diphtheria, tetanus, acellular pertussis and poliovirus (with reduced dose of diphtheria and acellular pertussis toxoids); HSCT, haematopoietic stem cell transplantation; MC4V, tetravalent meningococcal conjugate vaccine; PCV, pneumococcal conjugate vaccine; PPSV, pneumococcal polysaccharide vaccine.

inclusion of 10 patients per estimated parameter in the model.⁴⁴ For this reason, at least 50 patients are required.

Statistical methods

Qualitative variables will be expressed as count (percentage) while quantitative data will be expressed as median (IQR). The primary endpoint will be compared between V1 and V2, between V1 and V3 as well as between V1 and V4 regarding multiple variables related to haematological characteristics, treatment management, pattern of post-transplant immune recovery and transplant-related complications. Comparison will be performed using the Wilcoxon test, the Mann-Whitney U test, the χ^2 test or the Fisher exact test, where appropriate. For the GMT, means and 95% CI will be computed for the log₁₀ transformed titres and then transformed back to the original units by exponentiation. For vaccine targets with low to moderate responder rates, the association between responders/non-responders endpoint and factor will be established using logistic regression. All factors associated with endpoint with a significance level $p < 0.15$ will be kept for multivariate logistic regression models. These models will be adjusted with at most two or three confounding factors chosen according to evidence-based literature. In case of relapse of the haematological disease, in case of death during follow-up or in case of loss to follow-up, patients will be included in the analysis provided that there is at least the prevaccination and one or more post-vaccination assessment available. Analyses will be based on two-sided p values, with statistical significance defined by $p < 0.05$ and conducted with R V.3.4.4. Finally, appropriate multiple imputations (ie, at random or not) will be taken into consideration in the case of a relevant amount of missing values.

Patient and public involvement

No patients were involved in the design or implementation of this study. Study participants will be individually informed about their results during scheduled medical visits and will be given access, on demand, to the final publication of the study results.

Ethics and dissemination

The study is registered to the French Commission for Individual Data Protection and Public Liberties of Lyon's university hospital under the number 18–063 and has been approved by the national review board for biomedical research in March 2018 (Comité de Protection des Personnes Sud-Est V) under the title VaccHemInf-69HCL17_0769.

Informed consent

The identification of recipients included in the study will be kept anonymous and protected by a cryptographic code. Data will be anonymously extracted from medical records (HCL software). The informed and signed consent will be registered on the computerised record of each recipient. Full information of the objectives and the workflow of the study will be given and the possibility will be provided to the recipient to refuse to participate or to exit the study whenever chosen. A comprehensive notice will be distributed to the recipient summarising the protocol and the follow-up of the study.

Dissemination

Results will be communicated at scientific meetings and submitted for publication in peer-reviewed journals.

DISCUSSION

Strengths and limitations of the VacHemInf study design

The interest in designing a prospective cohort including all consecutive adult HSCT recipients who complete the vaccination schedule and have the full prevaccination and postvaccination assessments, independently of their complications and immunomodulatory therapy, is to test such a schedule in a 'real-life' setting. Another interest is the assessment of antibody titres at 24 months after vaccination, which has not been documented so far. We acknowledge the biases that contribute to overestimate the serum antibody concentrations: first, the heterogeneity in timing of recipient inclusion referred on referent haematologist's signal. The later after HSCT, the better immune recovery; second, some recipients receive intravenous Igs after transplantation, which may overestimate assessment of serological response to vaccines. We also acknowledge the bias due to the serology methods, notably for pneumococcus, which may be optimised through alternative methods such as the measurement of specific IgG₂ antibodies or in vitro opsonisation test.

Strengths and limitations of the VacHemInf project database

The purpose of immune functional assays is to measure deeper aspects of the immunity in response to vaccines. Precisely here, the variables collected in the database will potentially have an impact on the immune function, consequently altering the readout, interpretation, specificity and sensitivity of the assays. The Milieu Interieur Consortium has set up preliminary reference ranges of a healthy immune response and its natural variance.⁴¹ Similarly, in order to map the immune disorders, the 30 healthy donors of the VacHemInf study will provide a reference panel essential for the evaluation of the 'in-range' or 'out-range' scale. In addition, the duration of the follow-up for this current project will last 24 months for a population of patients closely monitored by their referent physicians, with virtually no loss to follow-up. An added value might be to extend the duration of follow-up up to 5 years, on recipient's agreement, to sustain the quality of information. Nonetheless, we acknowledge that a potential confounder will be the important number of collected variables with a sample size that may not allow complex analysis or may likely be statistically underpowered. In order to assess the impact of functional immune status on vaccine response of HSCT recipients, a multi-centre study with a larger number of patients is planned in the future.

Author affiliations

¹Département des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

²CIRI-Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm U1111, Université Claude Bernard Lyon, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, Lyon, France

³Université Claude Bernard Lyon I, Lyon, France

⁴Département d'Hématologie Clinique, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

⁵Service d'Hygiène, Epidémiologie, Infectiologie et Prévention, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

⁶Équipe Épidémiologie et Santé Internationale, Laboratoire des Pathogènes Émergents, Fondation Mérieux, Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm U1111, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5308, Ecole Nationale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon, Lyon, France

⁷Institut des Agents Infectieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

⁸Joint Research Unit, Hospices Civils de Lyon/BioMérieux, Lyon, France

⁹Soladis, Lyon, France

¹⁰Virpath, Inserm U1111, Lyon, France

Collaborators F Ader, V Alcazer, E Bachy, M Balsat, F Barraco, M Boccard, J S Casalegno, C Chidiac, A Conrad, S Ducastelle-Leprêtre, O Dumitrescu, D Dupont, V Escuret, T Ferry, G Fossard, E Frobert, S Goutelle, E Hodille, H Labussière-Wallet, M-V Larcher, F Laurent, B Lina, G Lina, J Menotti, B Meunier, P Miaillhes, G Monneret, F Morfin-Sherpa, E Paubelle, T Perpoint, M Rabodonirina, C Roure-Sobas, G Salles, X Thomas, S Trouillet-Assant, F Valour, F Wallet, M Wallon.

Contributors AC, MB, FV, VA, KB-P, BM, ST-A and FA were involved in trial design and drafting of the manuscript. All authors (AC, MB, FV, VA, A-TTS, CC, FL, PV, GS, KB-P, BM, ST-A and FA) were involved in critical revision of the article for important intellectual content and approved the final version.

Funding This research is being supported by an internal grant from the Hospices Civils de Lyon (Appel d'Offre Jeune Chercheur 2018).

Competing interests KB-P is an employee of bioMérieux SA, an in vitro diagnostic company.

Patient consent for publication Not required.

Ethics approval Ethical approval has been obtained from the national review board for biomedical research in March 2018 (Comité de Protection des Personnes Sud-Est V) under the title VacHemInf-69HCL17_0769.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

REFERENCES

- Li HW, Sykes M. Emerging concepts in haematopoietic cell transplantation. *Nat Rev Immunol* 2012;12:403–16.
- Apperley J, Carreras E, Gluckman E. The 2012 revised edition of the EBMT-ESH handbook on haematopoietic stem cell transplantation. 2012 <https://ebmtonline.forumservice.net>.
- Baronciani D, Angelucci E, Potschger U, *et al*. Hemopoietic stem cell transplantation in thalassemia: a report from the European society for blood and bone marrow transplantation hemoglobinopathy registry, 2000–2010. *Bone Marrow Transplant* 2016;51:536–41.
- Bosch M, Khan FM, Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2012;19:324–35.
- D'Souza A, Fretham C. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR Summary Slides. 2017 <https://www.cibmtr.org/ReferenceCenter/SlidesReports/SummarySlides/pages/index.aspx>.
- Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, *et al*. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:1143–238.
- Haut Conseil de Santé Publique (HCSP). Vaccination des personnes immunodéprimées ou aspléniques. 2014 <http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=504>.
- Hilgendorf I, Freund M, Jilg W, *et al*. Vaccination of allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients: report from the international consensus conference on clinical practice in chronic GVHD. *Vaccine* 2011;29:2825–33.
- Ljungman P, Cordonnier C, Einsele H, *et al*. Vaccination of hematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2009;44:521–6.
- Rubin LG, Levin MJ, Ljungman P, *et al*. 2013 IDSA clinical practice guideline for vaccination of the immunocompromised host. *Clin Infect Dis* 2014;58:309–18.

11. 7th European conference on infections in leukaemia guidelines for vaccination of patients with hematological malignancies and HSCT recipients. 2017 <http://www.ecil-leukaemia.com/telechargements/ECIL%207%20Vaccine%20Part%20I%20and%20II%20Final.pdf>.
12. Hahn M, Schnitzler P, Schweiger B, et al. Efficacy of single versus boost vaccination against influenza virus in patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2015;100:e285–e288.
13. Engelhard D, Zakay-Rones Z, Shapira MY, et al. The humoral immune response of hematopoietic stem cell transplantation recipients to AS03-adjuvanted A/California/7/2009 (H1N1)v-like virus vaccine during the 2009 pandemic. *Vaccine* 2011;29:1777–82.
14. Reber A, Katz J. Immunological assessment of influenza vaccines and immune correlates of protection. *Expert Rev Vaccines* 2013;12:519–36.
15. Sorror ML, Maris MB, Storb R, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood* 2005;106:2912–9.
16. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, et al. National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: i. the 2014 diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21:389–401.
17. Lee SJ. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2017;129:30–7.
18. Cordonnier C, Engelhard D, Ljungman P, et al. Definitions of infectious diseases and complications after stem cell transplant, a proposal of infectious diseases working party of the EBMT. 2001 <https://www.ebmt.org/Contents/About-EBMT/Who-We-Are/ScientificCouncil/Documents/IDWPdefinitions.pdf>.
19. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect* 2018;24:e1–e38.
20. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis* 2016;62:409–17.
21. Skiada A, Lanternier F, Groll AH, et al. Diagnosis and treatment of mucormycosis in 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3). *Haematologica* 2013;98:492–504.
22. Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin Microbiol Infect* 2014;20 Suppl 3:27–46.
23. Maschmeyer G, Helweg-Larsen J, Pagano L, et al. ECIL guidelines for treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected haematology patients. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:2405–13.
24. Styczynski J, van der Velden W, Fox CP, et al. Management of Epstein-Barr virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: sixth European conference on infections in leukemia (ECIL-6) guidelines. *Haematologica* 2016;101:803–11.
25. Ljungman P, de la Camara R, Cordonnier C, et al. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008;42:227–40.
26. Emery V, Zuckerman M, Jackson G, et al. Management of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2013;162:25–39.
27. Cesaro S, Dalianis T, Hanssen Rinaldo C, et al. ECIL guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:12–21.
28. Matthes-Martin S, Feuchtinger T, Shaw PJ, et al. European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transpl Infect Dis* 2012;14:555–63.
29. Engelhard D, Mohty B, de la Camara R, et al. European guidelines for prevention and management of influenza in hematopoietic stem cell transplantation and leukemia patients: summary of ECIL-4 (2011), on behalf of ECIL, a joint venture of EBMT, EORTC, ICHS, and ELN. *Transpl Infect Dis* 2013;15:219–32.
30. Hirsch HH, Martino R, Ward KN, et al. Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis and treatment of human respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, metapneumovirus, rhinovirus, and coronavirus. *Clin Infect Dis* 2013;56:258–66.
31. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315:801–10.
32. Martino R, Maertens J, Bretagne S, et al. Toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2000;31:1188–94.
33. Musher DM, Luchi MJ, Watson DA, et al. Pneumococcal polysaccharide vaccine in young adults and older bronchitics: determination of IgG responses by ELISA and the effect of adsorption of serum with non-type-specific cell wall polysaccharide. *J Infect Dis* 1990;161:728–35.
34. Berger M. Immunoglobulin G subclass determination in diagnosis and management of antibody deficiency syndromes. *J Pediatr* 1987;110:325–8.
35. Schauer U, Stemberg F, Rieger CH, et al. Levels of antibodies specific to tetanus toxoid, *Haemophilus influenzae* type b, and pneumococcal capsular polysaccharide in healthy children and adults. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:202–7.
36. Peltola H, Käyhty H, Virtanen M, et al. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b bacteremic infections with the capsular polysaccharide vaccine. *N Engl J Med* 1984;310:1561–6.
37. Rodrigo MJ, Vendrell M, Cruz MJ, et al. Utility of the antibody response to a conjugated *haemophilus influenzae* type b vaccine for diagnosis of primary humoral immunodeficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1462–5.
38. World Health Organization. Health topics: Immunization. 2018 <http://www.who.int/topics/immunization/en/>.
39. Sarmati L, Andreoni M, Antonelli G, et al. Recommendations for screening, monitoring, prevention, prophylaxis and therapy of hepatitis B virus reactivation in patients with haematologic malignancies and patients who underwent haematologic stem cell transplantation—a position paper. *Clin Microbiol Infect* 2017;23:935–40.
40. Rol ML, Venet F, Rimmele T, et al. The REAnimation Low Immune Status Markers (REALISM) project: a protocol for broad characterisation and follow-up of injury-induced immunosuppression in intensive care unit (ICU) critically ill patients. *BMJ Open* 2017;7:e015734.
41. Duffy D, Rouilly V, Libri V, et al. Functional analysis via standardized whole-blood stimulation systems defines the boundaries of a healthy immune response to complex stimuli. *Immunity* 2014;40:436–50.
42. Urrutia A, Duffy D, Rouilly V, et al. Standardized whole-blood transcriptional profiling enables the deconvolution of complex induced immune responses. *Cell Rep* 2016;16:2777–91.
43. Poujol F, Monneret G, Friggeri A, 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.
44. Machin D, Campbell MJ, Tan SB, et al. Comparing two independent groups for binary data. *Sample Size Tables for Clinical Studies*. 3 edn, 2011:30–41.

3.2. Avancement de l'étude et résultats préliminaires

Les inclusions ont eu lieu entre fin avril 2018 et janvier 2021. Au total, 142 patients ont été inclus. En parallèle, les échantillons sanguins de 31 volontaires sains, au statut vaccinal inconnu, recrutés *via* l'Etablissement Français du Sang ont été analysés pour disposer de valeurs « normales » pour les tests de fonctionnalité immunitaire. Le diagramme de flux des patients est présenté figure 11. Un premier gel de base de données a été effectué en mai 2021, ayant permis une première analyse intermédiaire présentée ci-dessous.

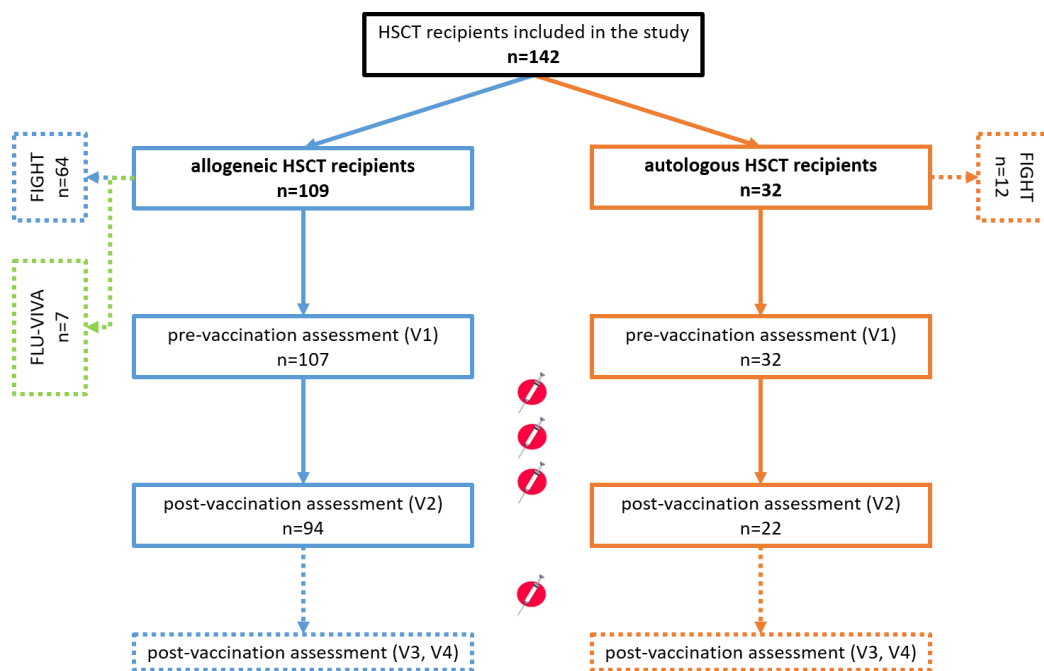


Figure 11. Diagramme de flux des receveurs de greffe de CSH inclus dans l'étude VaccHemInf-FIGHT.

Trois publications concernant la reconstitution immunitaire ont déjà pu être préparées à partir de ces données : un manuscrit sur la réponse immunitaire cellulaire au VZV (cf. section III.4.), un autre concernant l'analyse transcriptomique de la reconstitution immunitaire fonctionnelle (Annexe 1) et enfin un manuscrit concernant la virémie TTV après allo-CSH (Annexe 2).

Le suivi de la cohorte VaccHemInf-FIGHT se poursuit jusqu'au premier trimestre 2023. Les données de réponse vaccinale au vaccin combiné pédiatrique et à la vaccination antipneumococcique sont en cours d'analyse ; sont présentés ci-dessous (analyse statistique : GraphPad Prism, V 9.4.0) les résultats préliminaires concernant la réponse au vaccin combiné pédiatrique hexavalent. En conséquence, ces conclusions ne sont pas définitives et certains résultats pourront être sensiblement différents dans la publication finale.

a. Réponse vaccinale et reconstitution immunitaire après allogreffe de CSH

Les données de réponse vaccinale et de reconstitution immunitaire de 109 receveurs d'allo-CSH sont analysées (population en intention de traiter), dont les caractéristiques démographiques et hématologiques sont présentées dans le tableau 2. Parmi ces 109 patients, 64 ont été évalués par des tests de fonctionnalité immunitaire (FIGHT).

Tableau 2. Caractéristiques démographiques et hématologiques des receveurs d'allo-CSH à l'inclusion. Sur les 109 receveurs d'allo-CSH inclus, 64 ont été évalués par des tests de fonctionnalité immunitaire à l'inclusion (FIGHT). Abréviations : GVHD, graft-versus-host disease ; HLA, Human Leukocyte Antigen ; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation ; IQR, intervalle interquartile ; IVIg, immunoglobulines intraveineuses polyvalentes

ALLO-HSCT recipients	n=109	n=64 (FIGHT)
Time from allo-HSCT (months), median (IQR)	7.2 (6-8.9)	6.8 (5.8-8.4)
Sex ratio M/F	61/48	36/28
Age (years), median (IQR)	50 (37.5-60)	44.5 (34-60)
Underlying disease, n(%)		
acute leukemia	75 (69)	47 (73.4)
myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms	19 (17.4)	11 (17.2)
lymphoproliferative neoplasms	13 (11.9)	5 (7.8)
multiple myeloma	2 (1.8)	1 (1.6)
History of HSCT, n(%)	10 (9.2)	5 (7.8)
Donor type, n(%)		
HLA-genoidentical sibling	39 (35.8)	22 (34.4)
HLA-phenoidentical fullmatch unrelated donor	36 (33)	23 (35.9)
HLA-phenoidentical mismatch unrelated donor	14 (12.8)	7 (10.9)
HLA-haploidentical related donor	20 (18.3)	12 (18.8)
Stem cell source, n(%)		
peripheral blood stem cells	85 (78)	48 (75)
bone marrow	23 (21.1)	15 (23.4)
cord blood unit(s)	1 (0.9)	1 (1.6)
Conditioning regimen, n(%)		
myeloablative	38 (34.9)	24 (37.5)
reduced-intensity	71 (65.1)	40 (62.5)
total body irradiation	29 (26.6)	20 (31.3)
GVHD prophylaxis, n(%)		
ATG	59 (54.1)	35 (54.7)
methotrexate	28 (25.7)	17 (26.6)
calcineurin inhibitors	108 (99.1)	63 (98.4)
mycophenolic acid	56 (51.4)	33 (51.6)
post-transplant cyclophosphamide	41 (37.6)	23 (35.9)
History of acute GVHD, n(%)	73 (67)	45 (70.3)
grades I, II	65 (59.6)	43 (67.2)
grades III	8 (7.3)	2 (3.1)
History of chronic GVHD, n(%)	17 (15.6)	8 (12.5)
localized	8 (7.3)	5 (7.8)
extensive	9 (8.3)	3 (4.7)
IVIg, n(%)	75 (68.8)	44 (68.8)
time from last administration (months), median (IQR)	4.2 (2.6-6.2)	4.5 (2.9-6.2)
Receipt of donor lymphocyte infusions, n(%)	14 (12.8)	8 (12.5)
Post-transplant rituximab, n(%)	4 (3.7)	2 (3.1)
Immunosuppressive treatment at baseline, n(%)	39 (35.8)	20 (31.3)
calcineurin inhibitors	24 (22)	13 (20.3)
systemic corticosteroids	20 (18.3)	9 (14.1)
mycophenolic acid	1 (0.9)	0
ruxolitinib	5 (4.6)	3 (4.7)
Extracorporeal photopheresis, n(%)	16 (14.8)	3 (4.7)

Les patients ont été inclus (V1) dans un délai médian de 7,2 mois (intervalle interquartile [IQR], 6-8,9) après leur allo-CSH.

Le vaccin combiné pédiatrique hexavalent a été prescrit lors de la V1 à tous les patients. Huit patients n'ont pas reçu le vaccin prescrit, pour 12 autres patients, il n'a pas été possible de savoir s'ils avaient ou non reçu la vaccination prescrite. La date d'administration de la première dose de vaccin (dose-1) était connue pour 88 participants et est intervenue dans un délai médian de 8,5 mois (IQR, 6,9-10,6) après la greffe. Parmi ces 88 participants, 5 ont reçu la dose-1 le jour de la V2 ou après la V2.

Réponse vaccinale : concernant le critère de jugement principal, à la première visite post-vaccinale (V2), soit dans un délai médian de 13,6 mois (IQR, 12-16,1) après l'allo-CSH, 97,5% (IC95, 91,4-99,7 ; n=79/81), 97,7% (IC95, 91,9-99,7 ; n=85/87), 86,5% (IC95, 77,6-92,8 ; n=77/89) et 81,4% (IC95, 71,6-89 ; n=70/86) des patients évaluable avaient des anticorps supérieurs au seuil protecteur pour respectivement D, T, Hib et HBV (≥ 10 mUI/mL). Concernant la réponse au vaccin de l'hépatite B, 59,3% des patients (IC95, 48,2-69,8 ; n=51/86) avaient un titre d'anticorps anti-HBs ≥ 100 mUI/mL.

L'évolution des proportions de patients séroprotégés entre V1 et V2 est représentée figure 12.

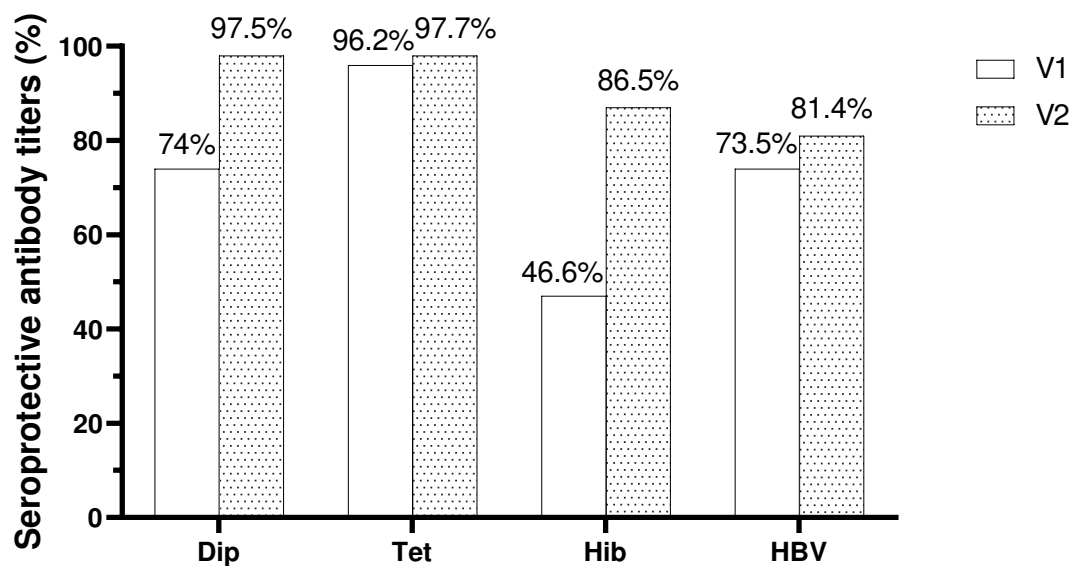


Figure 12. Proportion de receveurs d'allogreffe de CSH séroprotégés à l'inclusion (V1) et lors de la première visite post-vaccinale (V2, après 3 doses du vaccin combiné pédiatrique hexavalent). Délai médian (IQR) entre allo-CSH et V1 7,2 mois (6-8,9), entre allo-CSH et V2 13,6 mois (12-16,1). Les seuils de séroprotection retenus sont : Dip et Tet, 0,1 UI/mL ; Hib, 1 μ g/mL ; HBV, 10 mUI/mL (236). Abréviations : Dip, diphtérie ; Tet, tétanos ; Hib, Haemophilus influenzae type b ; HBV, hépatite B

A l'inclusion, les GMC d'anticorps spécifiques étaient respectivement de 0,22 UI/mL (IC95, 0,17-0,27 ; n=104), 0,57 UI/mL (IC95, 0,48-0,68 ; n=104), 0,88 µg/mL (IC95, 0,68-1,15 ; n=103) et 34,4 mUI/mL (IC95, 25-47,2 ; n=102) pour D, T, Hib et HBV. Les GMC d'anticorps ont augmenté de façon significative entre V1 et V2, mesurés respectivement à 1,21 UI/mL (IC95, 0,94-1,54 ; n=81 ; $p < 0,001$), 1,52 UI/mL (IC95, 1,16-1,99 ; n=87 ; $p < 0,001$), 4,93 µg/mL (IC95, 3,8-6,4 ; n=89 ; $p < 0,001$) et 126,1 mUI/mL (IC95, 80,5-197,7 ; n=86 ; $p < 0,001$) à V2 pour ces mêmes valences (Figure 13). Les ratios des moyennes géométriques (GMFR, *geometric mean fold rise*) correspondants s'élevaient respectivement à 5,28 (IC95, 3,74-7,46), 2,63 (IC95, 1,94-3,56), 5,42 (IC95, 3,87-7,59) et 3,75 (IC95, 2,34-6) pour D, T, Hib et HBV.

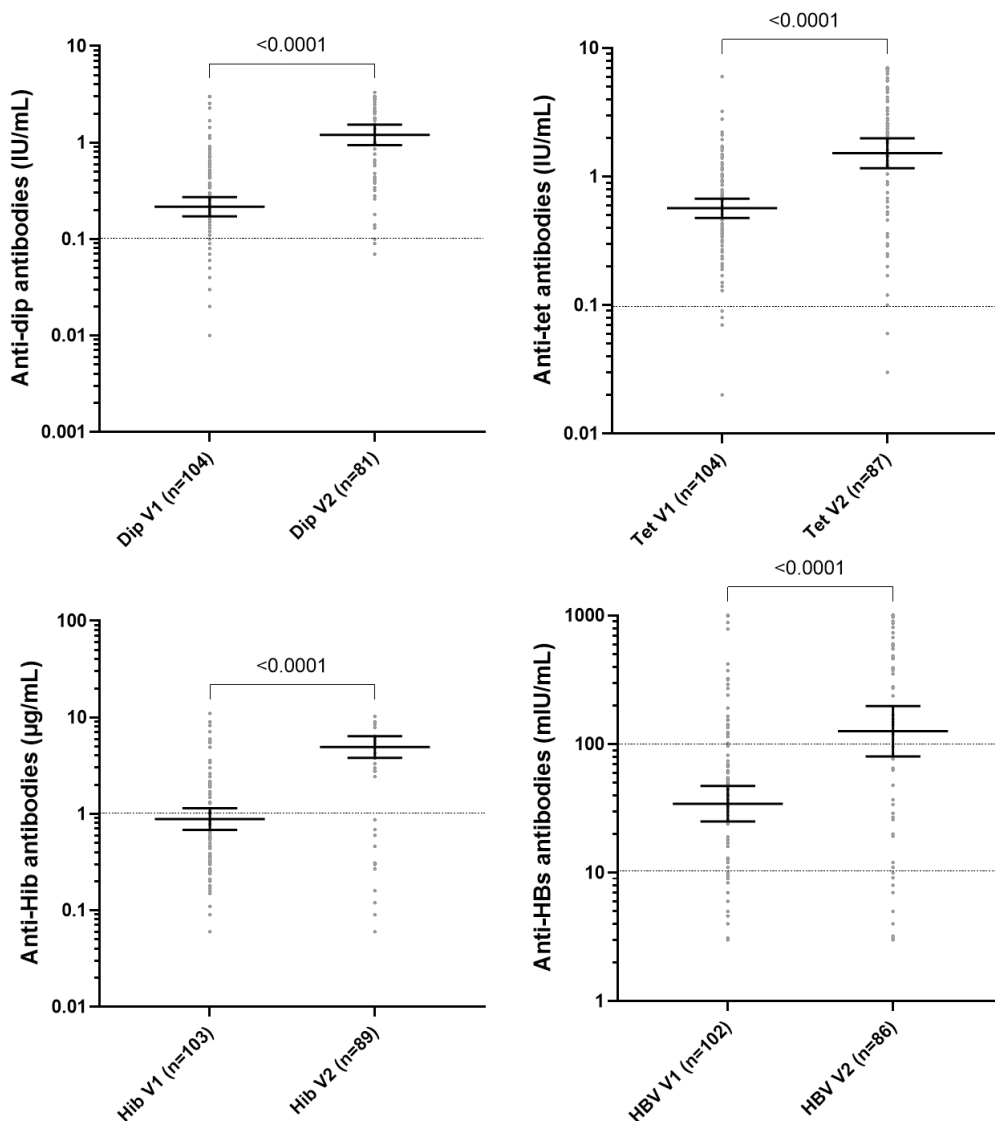


Figure 13. Evolution des concentrations d'anticorps spécifiques chez des receveurs d'allo-CSH vaccinés par 3 doses du vaccin combiné pédiatrique hexavalent. Les concentrations moyennes géométriques et leurs intervalles de confiance à 95% sont indiqués. Les seuils de séroprotection sont identifiés par des lignes horizontales pointillées. Les concentrations d'anticorps à V1 et V2 ont été comparées par le test de Wilcoxon. Abréviations : Dip, diphtérie ; Tet, tétanos ; Hib, Haemophilus influenzae type b ; HBs, antigène de surface du virus de l'hépatite B ; HBV, hépatite B.

Les proportions de patients multipliant leur taux d'anticorps spécifiques d'un facteur 2 ou plus entre V1 et V2 étaient plus basses que les proportions de patients séroprotégés à V2, soit respectivement 74,4% (IC95, 63,2-83,6 ; n=58/78), 59,5% (IC95, 48,3-70,1 ; n=50/84), 70,1% (IC95, 59,4-79,5 ; n=61/87) et 56,8% (IC95, 45,3-67,8 ; n=46/81) pour respectivement D, T, Hib et HBV.

En ce qui concerne la reconstitution immunitaire, le tableau 3 indique les valeurs à V1 et V2 des sous-populations lymphocytaires et des dosages pondéraux d'Ig. Entre V1 et V2, les concentrations médianes d'IgG et d'IgA ont augmenté de façon significative quand les concentrations d'IgM restaient relativement stables. De même, les nombres absolus des lymphocytes totaux, des LT CD4+ et de leurs sous-classes, des LT CD8+ naïfs et TEMRA ainsi que des LB ont tous augmenté de façon significative entre V1 et V2.

L'évolution des principales sous-classes lymphocytaires est représentée figure 14.

Tableau 3. Evolution des marqueurs de reconstitution immunitaire entre l'inclusion (V1) et la première visite post-vaccinale (V2) chez 109 receveurs d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Valeurs comparées par le test de Wilcoxon. Abréviations : Ig, immunoglobuline ; IQR, intervalle interquartile ; NV, valeurs normales ; TCM, lymphocytes T à mémoire centraux ; TEM, lymphocytes T effecteurs à mémoire ; TEMRA, lymphocytes T à mémoire en différenciation terminale.

ALLO-HSCT recipients	V1	V2	p
Immunoglobulin (g/L), median (IQR)			
IgG (NV, 6.7-12.5)	7.3 (5.65-10.6)	9.19 (6.25-12.1)	0.015
IgA (NV, 1.04-3.33)	0.7 (0.39-1.18)	0.93 (0.51-1.42)	0.020
IgM (NV, 0.52-1.46)	0.66 (0.36-1)	0.63 (0.38-1.07)	0.285
Absolute lymphocyte count (/μL), median (IQR) (NV, 1000-2800)	1225 (770-2125)	1610 (1070-2190)	0.011
T-cells and subsets (/μL), median (IQR)			
CD3+ (NV, 521-1772)	678 (369-1146)	915 (519-1307)	<0.001
CD3+ CD4+ (NV, 336-1126)	231 (121-328)	264 (192-435)	<0.001
Naïve CD4+ (CD45RA+CCR7+) (NV, 121-456)	15.5 (6.8-35)	34 (11.5-67)	<0.001
TCM CD4+ (CD45RA-CCR7+) (NV, 92-341)	48.5 (21-83.5)	66 (39.8-100)	<0.001
TEM CD4+ (CD45RA-CCR7-) (NV, 59-321)	126 (78.5-204)	147 (96.3-241)	0.009
TEMRA CD4+ (CD45RA+CCR7-) (NV, 11-102)	5 (0-21.5)	9 (2-24)	0.006
CD3+ CD8+ (NV, 125-780)	396 (215-855)	512 (244-851)	0.088
Naïve CD8+ (CD45RA+CCR7+) (NV, 86-257)	18.5 (9-49.8)	38 (19-70)	<0.001
TCM CD8+ (CD45RA-CCR7+) (NV, 19-93)	8 (2.5-17)	13 (6-26)	0.078
TEM CD8+ (CD45RA-CCR7-) (NV, 15-162)	145 (72.5-344)	144 (65.5-320)	0.076
TEMRA CD8+ (CD45RA+CCR7-) (NV, 39-212)	138 (56.5-373)	247 (78.8-432)	0.008
CD4+/CD8+ ratio (NV, 0.9-6)	0.52 (0.3-0.92)	0.6 (0.35-1.13)	0.004
B-cells and subsets (/μL), median (IQR)			
CD19+ (NV, 67-516)	174 (80.5-370)	306 (187-488)	<0.001
CD20+ (NV, 64-593)	173 (79.5-367)	303 (182-487)	<0.001
CD21+ (NV, 67-516)	162 (72.5-345)	293 (175-451)	<0.001
NK cells (/μL), median (IQR) (NV, 70-523)	141 (83-237)	153 (97.5-238)	0.435

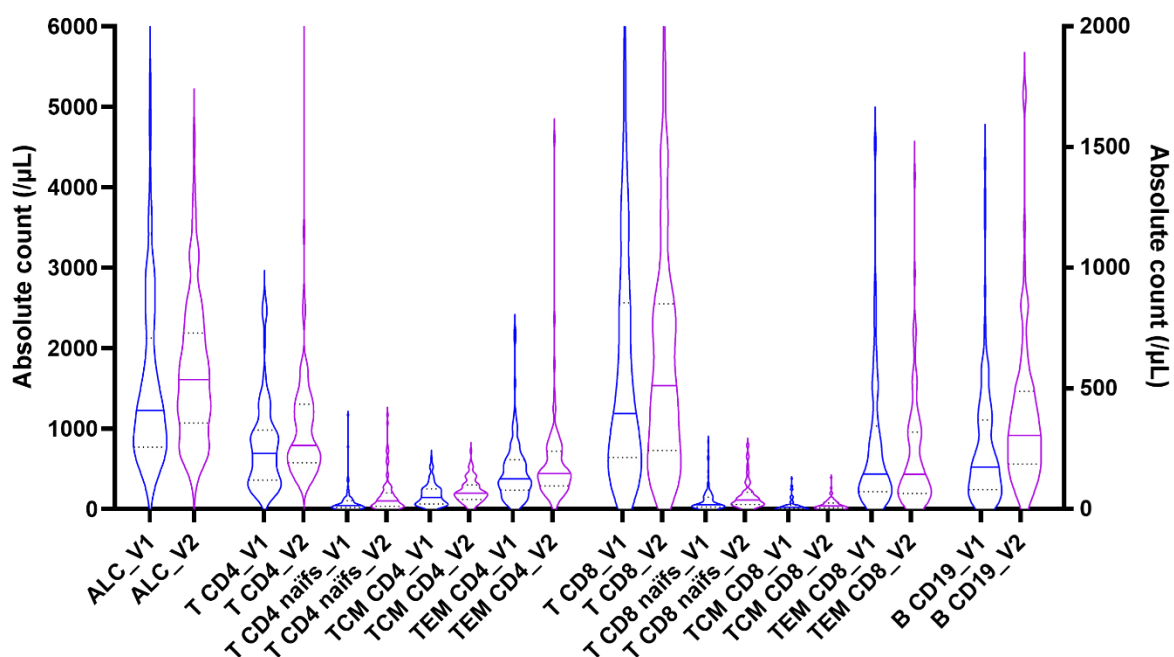


Figure 14. Evolution des numérations des lymphocytes totaux et principales sous-populations lymphocytaires entre l'inclusion (V1, bleu) et la première visite post-vaccinale (V2, violet) chez 109 receveurs d'allogreffe de CSH. Le nombre absolu de lymphocytes totaux (ALC) est représenté sur l'ordonnée de gauche, le nombre absolu des autres sous-populations lymphocytaires sur l'ordonnée de droite. Abréviations : ALC, absolute lymphocyte count ; TCM, lymphocytes T à mémoire centraux ; TEM, lymphocytes T effecteurs à mémoire.

Concernant la reconstitution immunitaire fonctionnelle (sous-cohorte FIGHT), la capacité de prolifération lymphocytaire T (à J3) en réponse à une stimulation mitogène par la PHA augmentait significativement entre V1 et V2 (médiane, 23,4% [IQR, 13,9-33,7] vs 34,4% [IQR, 25,7-40,8] ; $p < 0,0001$), tout en restant inférieure à celle des 31 volontaires sains (médiane, 40,9% [IQR, 34,2-44,5] ; $p = 0,0064$). A V1, 29% ($n = 18/62$) des receveurs d'allo-CSH avaient une capacité de prolifération lymphocytaire T jugée « normale », c'est-à-dire $\geq 30\%$. A l'inverse, 27,4% ($n = 17/62$) avaient une capacité de prolifération lymphocytaire T $< 15\%$ à V1. La sécrétion d'IFN- γ en réponse à la stimulation mitogène par la PHA augmentait également de façon significative entre V1 et V2 (médiane, 5863 pg/mL [IQR, 1169-16602] vs 7329 pg/mL [IQR, 3585-23847] ; $p = 0,046$) mais demeurait en-dessous du niveau de sécrétion constaté chez les volontaires sains (médiane, 74884 pg/mL [IQR, 43281-101518] ; $p < 0,0001$) (Figure 15).

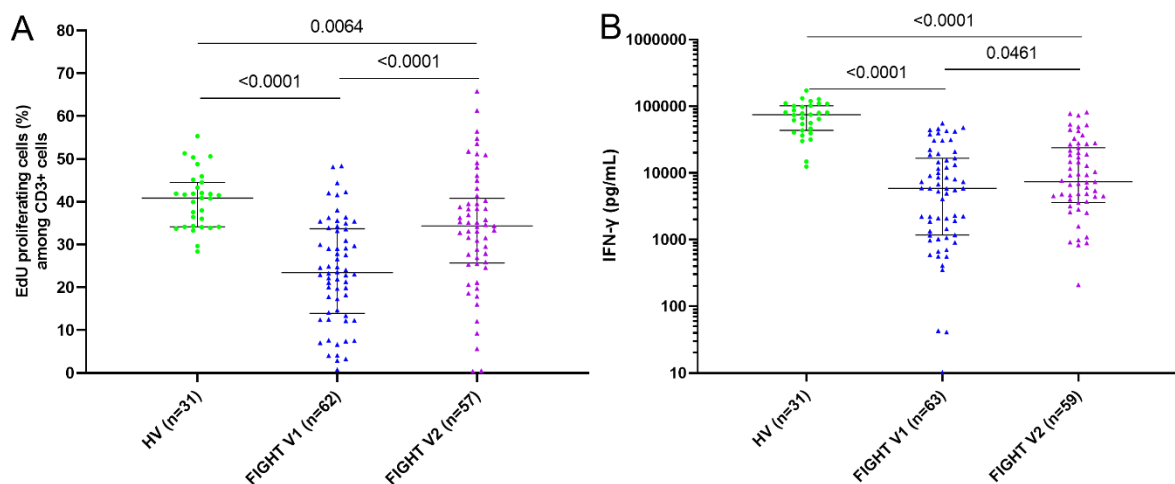


Figure 15. Réponse proliférative et sécrétion d'IFN- γ après stimulation de PBMC par la PHA. Sont représentées (A) la proportion de lymphocytes T (CD3+) proliférant et (B) la quantité d'IFN- γ sécrétée après stimulation de PBMC par la PHA chez des receveurs d'allogreffe de CSH de la sous-cohorte FIGHT, à l'inclusion (V1) et à la première visite post-vaccinale (V2), et chez 31 volontaires sains. 10^5 PBMC/puits ont été stimulés pendant 3 jours par la PHA puis la prolifération de lymphocytes T (CD3+ EdU+) dans le culot cellulaire a été quantifiée en cytométrie en flux par le Click-It® EdU AF488 flow kit (Life Technologies) après incorporation d'EdU et la sécrétion d'IFN- γ dans le surnageant a été quantifiée par Ella. Valeurs appariées (V1-V2) comparées par le test de Wilcoxon, groupes (HV-V1/2) comparés par le test de Mann-Whitney. Abréviations : EdU, 5-éthynyl-2'-deoxyuridine ; HV, volontaires sains ; IFN- γ , interféron- γ ; PBMC, cellules mononucléées du sang périphérique ; PHA, phytohémagglutinine.

Facteurs associés à la séroprotection à V2. Les proportions de séroprotection après vaccination étant très élevées pour les valences D et T, aucun facteur associé à l'absence de réponse vaccinale ne pouvait être identifié avec nos effectifs.

En ce qui concerne l'absence de réponse à la vaccination Hib (anticorps $< 1 \mu\text{g/mL}$ à V2 : $n=12/89$, 13,5%), en analyse univariée, les greffons de moelle osseuse (vs autres sources cellulaires) étaient associés à l'absence de réponse vaccinale ($p=0,0309$, test de Fisher). Aucune autre variable clinique n'était associée de façon statistiquement significative à la réponse vaccinale. Concernant les marqueurs de reconstitution immunitaire, les patients ayant répondu à la vaccination avaient une numération de LT CD8+ naïfs à V1 plus élevée que les patients n'ayant pas répondu à la vaccination Hib ($p=0,0517$, test de Mann-Whitney). Les autres sous-populations lymphocytaires, de même que les marqueurs de fonctionnalité (sécrétion d'IFN- γ et réponse proliférative après stimulation par la PHA), n'étaient pas associés à la réponse vaccinale.

En ce qui concerne l'absence de réponse à la vaccination HBV (anti-HBs $< 10 \text{ mUI/mL}$ à V2 : $n=16/86$, 18,6%), l'analyse univariée permettait d'identifier que les patients receveurs d'une allo-CSH haplo-identique (vs autres types d'allo-CSH) avaient tendance à ne pas répondre à

la vaccination HBV ($p=0,0603$). Les LT CD4+ naïfs ($p=0,0063$) et CD8+ naïfs ($p=0,0391$) étaient plus élevés à V1 parmi les répondeurs à la vaccination. Les autres sous-populations lymphocytaires, de même que les marqueurs de fonctionnalité (sécrétion d'IFN- γ et réponse proliférative après stimulation par la PHA), n'étaient pas associés à la réponse vaccinale.

A noter que l'antécédent de perfusion d'IgIV ($p=0,0001$) et une concentration d'anti-HBs élevée ($p=0,0102$) à V1 étaient associés à un taux d'anticorps anti-HBs ≥ 10 mUI/mL à V2, suggérant un transfert passif d'anti-HBs (IgIV, transfusions etc.) et/ou la persistance d'anti-HBs acquis avant l'allo-CSH plus qu'une authentique réponse à la vaccination. Cette observation met en exergue la difficulté à évaluer, au moyen de la seule sérologie, la réponse immunitaire à la stimulation vaccinale.

Facteurs associés aux niveaux d'anticorps spécifiques mesurés. Nous avons précédemment mis en évidence l'association entre des variables cliniques et les niveaux d'anticorps dosés avant/après vaccination chez des receveurs d'allo-CSH (cf. section III.2.). L'impact de 7 variables cliniques (mesurées à V1) sur les concentrations d'anticorps D, T, Hib et HBV à V1/V2 a donc été étudié en analyse univariée (test de Mann-Whitney) : la maladie sous-jacente (leucémie aiguë vs autres), la source cellulaire (CSP vs autres), la GvHD chronique, la photochimiothérapie extracorporelle, la présence d'un traitement immunosuppresseur, l'antécédent de perfusion(s) d'IgIV et, pour la sous-cohorte FIGHT ($n=62$), une réponse proliférative « normale » ($\geq 30\%$) à la PHA.

Les concentrations d'anticorps spécifiques d'aucune valence vaccinale n'étaient significativement différentes en fonction de la maladie sous-jacente (leucémie aiguë vs autres). Les patients receveurs d'un greffon à base de CSP répondaient mieux à la vaccination T que les patients receveurs d'autres types d'allo-CSH (GMC : 1,76 mUI/mL [IC95, 1,3-2,38], $n=66$ vs 0,97 mUI/mL [IC95, 0,55-1,71], $n=21$; $p=0,043$). Après vaccination, les patients atteints de GvHD chronique avaient des anticorps anti-Hib (GMC : 3,79 $\mu\text{g/mL}$ [IC95, 1,77-8,08], $n=15$ vs 5,2 $\mu\text{g/mL}$ [IC95, 3,93-6,9], $n=74$; $p=0,085$) et anti-HBs (GMC : 42 mUI/mL [IC95, 12-150], $n=13$ vs 145,8 mUI/mL [IC95, 90-236,2], $n=73$; $p=0,03$) plus bas que les patients sans antécédent de GvHD chronique. Les patients sous photochimiothérapie extracorporelle ($n=11$, dont GvHD chronique extensive active, $n=1$) tendaient à avoir des anticorps post-vaccination D ($p=0,092$), T ($p=0,002$) et HBV ($p=0,092$) plus élevés que les patients sans immunomodulation par photochimiothérapie extracorporelle, et ce alors qu'ils n'étaient pas plus nombreux à recevoir des perfusions d'IgIV ($p>0,9999$, test de Fisher), mais ces données sont à interpréter avec prudence étant donné les faibles effectifs. Les patients recevant un traitement immunosuppresseur à V1 avaient des anticorps anti-HBs à V1 plus élevés que les patients ne recevant plus d'immunosuppresseurs (GMC : 68,5 mUI/mL [IC95, 39,46-118,9], $n=37$ vs 23,2 mUI/mL [IC95, 16,1-33,4], $n=65$; $p=0,001$) mais avaient aussi tendance à être

proportionnellement plus nombreux à recevoir des IgIV (79% vs 63%, $p=0,087$). De même, les patients recevant des IgIV (à V1) avaient des anticorps anti-HBs plus élevés à V1 que les patients qui n'en recevaient pas ($p=0,035$), mais il n'y avait plus de différence significative de la concentration d'anti-HBs après vaccination. Les patients ayant une capacité de réponse proliférative « normale » ($\geq 30\%$) à V1 n'avaient pas d'anticorps spécifiques significativement plus élevés après vaccination que ceux dont les LT avaient une capacité de prolifération $< 30\%$. L'impact de ces variables cliniques sur les niveaux d'anticorps anti-HBs mesurés à V1/V2 est illustré figure 16.

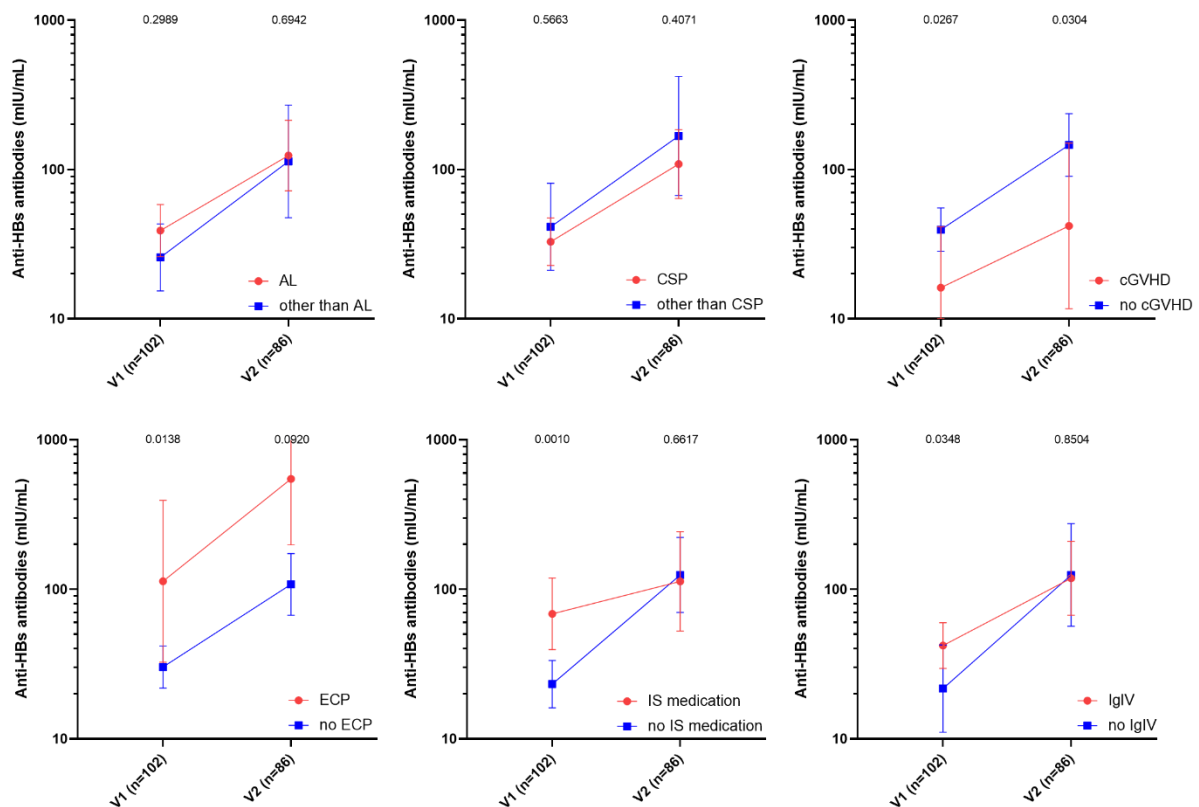


Figure 16. Concentrations d'anticorps anti-HBs mesurées avant (V1) et après (V2) vaccination chez des receveurs d'allogreffe de CSH en fonction de la maladie sous-jacente, de la source cellulaire, de la présence d'une GvHD chronique, d'un traitement par photochimiothérapie extracorporelle, par immunosuppresseurs ou par IgIV. Les moyennes géométriques et leurs intervalles de confiance à 95% sont représentés, les groupes comparés par le test de Mann-Whitney. Abréviations : AL, leucémie aiguë ; CSP, cellules souches périphériques, cGVHD, GvHD chronique ; ECP, photochimiothérapie extracorporelle ; IS, immunosuppresseur ; IgIV, immunoglobulines intraveineuses polyvalentes.

Aucun paramètre de reconstitution immunitaire (numération des lymphocytes et de leurs sous-populations, dosages pondéraux d'Ig, réponse à la PHA) n'était corrélé au moins modérément (Spearman $r > 0,4$) avec les niveaux d'anticorps spécifiques mesurés à V2.

Il faut noter que l'impact des caractéristiques cliniques et paramètres de reconstitution immunitaire sur l'amplitude de la réponse vaccinale (à V2) est susceptible d'être sous-estimé, car de nombreux receveurs d'allo-CSH répondeurs à la vaccination avaient des anticorps supérieurs au seuil supérieur de quantification de la technique sérologique employée, sans que le titre exact d'anticorps ne soit connu.

Apport des IFA spécifiques du vaccin antitétanique pour l'évaluation de la réponse à la valence vaccinale T. La réponse cellulaire au vaccin antitétanique a été analysée *ex vivo* chez les receveurs d'allo-CSH de la sous-cohorte FIGHT, avant et après vaccination, et comparée à celle de volontaires sains, supposés vaccinés contre le tétanos par le passé. Brièvement, les PBMC ont été isolées et stimulées pendant 7 jours avec du vaccin antitétanique (concentration finale, 1 µg/mL) puis analysées quant à leur capacité de prolifération (incorporation de l'EdU par les LT) en cytométrie en flux et quant à la sécrétion d'IFN-γ dans le surnageant. En parallèle, du sang total était stimulé pendant 24h avec du vaccin antitétanique (1 µg/mL) puis les cellules récoltées, l'ARN extrait et l'ARNm d'*ifn-γ* quantifié par RT-PCR.

Parmi les receveurs d'allo-CSH de cette sous-cohorte, 93,3% (n=56/60) avaient des titres d'anticorps antitétaniques protecteurs ($\geq 0,1$ UI/mL) à V2, et 64,9% (n=37/57) augmentaient leur titre d'anticorps d'un facteur ≥ 2 entre V1 et V2. La GMC d'anticorps antitétaniques passait de 0,6 mUI/mL [IQ95, 0,48-0,74] à 1,8 UI/mL [IC95, 1,34-2,41] ($p < 0,001$, test de Wilcoxon) entre V1 et V2, soit un GMFR de 2,96 (IC95, 2,09-4,19).

Avant vaccination, la proportion médiane de LT capables de proliférer en réponse à la stimulation par du vaccin antitétanique était de 0,06% (IQR, 0-0,2 ; extrêmes, 0-8,7 ; n=63) chez les receveurs d'allo-CSH, significativement inférieure à celle des volontaires sains (médiane 2,4% [IQR, 0,07-11,52], n=17 ; $p=0,0004$). De même, la quantité d'IFN-γ détectée dans le surnageant des receveurs d'allo-CSH était significativement inférieure à celle détectée chez les volontaires sains (médiane 0,097 pg/mL [IQR, 0-1,36], n=62 vs 114 pg/mL [IQR, 4,53-1130], n=31 ; $p < 0,0001$).

Huit receveurs d'allo-CSH se distinguaient à V1 par une sécrétion d'IFN-γ notable (6,1-1829 pg/mL) en réponse à la stimulation *ex vivo* par le vaccin antitétanique, qui faisait émettre l'hypothèse d'une immunité cellulaire préexistante, transmise par le donneur ou persistante malgré la procédure d'allogreffe. Ces patients avaient reçu 7,2 mois (IQR, 6-10) plus tôt un greffon à base de CSP (n=7) ou de moelle osseuse (n=1) après un conditionnement d'intensité réduite (n=7) ou myélo-ablatif (n=1). Aucun de ces patients ne présentait une GvHD chronique et 2 avaient reçu des infusions de lymphocytes du donneur.

Après vaccination, la proportion de LT qui proliféraient (médiane 4,4% [IQR, 0,42-26,29], n=58) et la quantité d'IFN- γ détectée dans le surnageant (médiane 41,85 pg/mL [IQR, 1,01-610 pg/mL, n=58) après stimulation *ex vivo* par du vaccin antitétanique augmentaient de façon significative par rapport à V1 ($p < 0,0001$ pour les 2). La réponse proliférative et la sécrétion d'IFN- γ se rapprochaient des valeurs constatées chez les volontaires sains (respectivement $p = 0,2404$ et $p = 0,2893$), bien qu'étant plus hétérogènes chez les receveurs d'allo-CSH. Ces résultats sont illustrés figure 17.

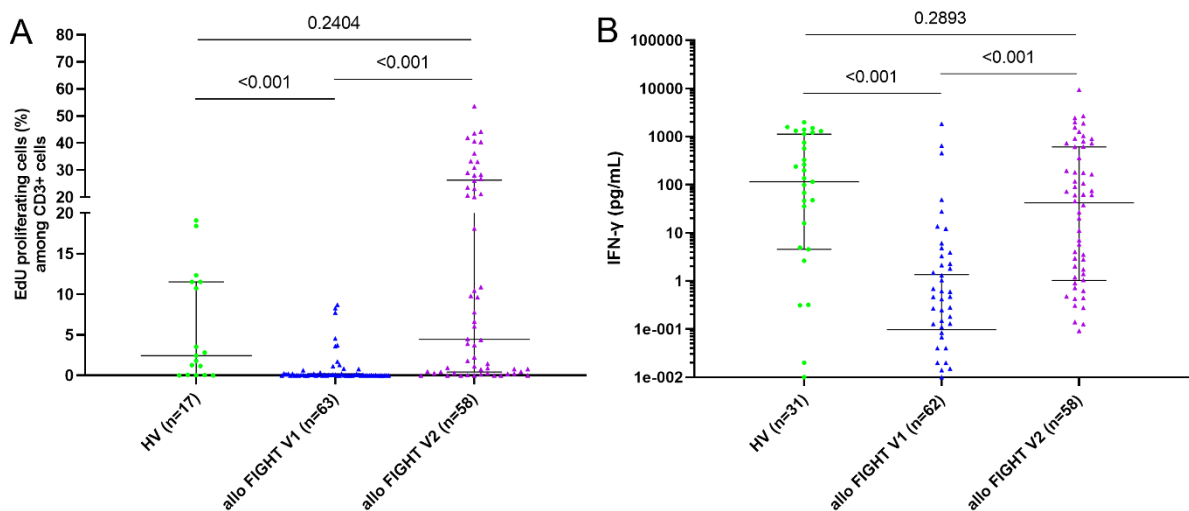


Figure 17. Réponse proliférative et sécrétion d'IFN- γ après stimulation de PBMC par du vaccin antitétanique. Sont représentées (A) la proportion de lymphocytes T (CD3+) proliférant et (B) la quantité d'IFN- γ sécrétée après stimulation de PBMC par du vaccin antitétanique (Tetanol pur®, GSK) chez des receveurs d'allogreffe de CSH de la sous-cohorte FIGHT, à l'inclusion (V1) et à la première visite post-vaccinale (V2), et chez 31 volontaires sains. 10^5 PBMC/puits ont été stimulées pendant 7 jours par du vaccin antitétanique (1 μ g/mL) puis la prolifération de lymphocytes T (CD3+ EdU+) dans le culot cellulaire a été quantifiée en cytométrie en flux par le Click-It® EdU AF488 flow kit (Life Technologies) après incorporation d'EdU et la sécrétion d'IFN- γ dans le surnageant a été quantifiée par Ella. Valeurs appariées (V1-V2) comparées par le test de Wilcoxon, groupes (HV-V1/2) comparés par le test de Mann-Whitney. Abréviations : EdU, 5-éthynyl-2'-deoxyuridine ; HV, volontaires sains ; IFN- γ , interféron- γ ; PBMC, cellules mononucléées du sang périphérique.

Avant vaccination, la quantité d'ARNm d'*ifn- γ* détectée dans les échantillons de sang total des receveurs d'allo-CSH après 24h de stimulation *ex vivo* par le vaccin antitétanique était pas ou modérément augmentée par rapport aux conditions de contrôle (*fold change* médian, 0,9548 [IQR, 0,5813-1,970], n=60) alors qu'elle était notable après vaccination (*fold change* médian, 9,513 [IQR, 1,540-31,14], n=57 ; $p < 0,0001$).

La proportion de réponse à la vaccination antitétanique en termes de séroprotection étant très élevée, nous nous sommes intéressés aux receveurs d'allo-CSH dont les titres d'anticorps antitétaniques n'augmentaient pas d'un facteur ≥ 2 après vaccination (n=20) pour évaluer l'apport des IFA spécifiques du vaccin antitétanique : parmi ces receveurs d'allo-CSH, 18 avaient pu être étudiés par des IFA à V2, dont 9 n'avaient ni de réponse proliférative significative ($\geq 2\%$ des LT), ni de sécrétion significative d'IFN- γ ($\geq 4,5$ pg/mL) après stimulation *ex vivo*, suggérant l'absence de réponse cellulaire significative.

Au total, ces résultats préliminaires de l'étude VaccHemInf-FIGHT confirment les résultats de la première étude VaccHemInf, et ce alors que les receveurs d'allo-CSH étaient vaccinés environ 4 mois plus tôt, et qu'un tiers des patients recevaient une immunosuppression pharmacologique.

Le schéma à 3 doses de vaccin combiné pédiatrique est bien toléré et permet d'obtenir des taux de séroprotection élevés pour les valences D, T et Hib. En revanche, près de 20% des patients vaccinés n'ont pas d'anticorps anti-HBs protecteurs après vaccination par $3 \times 10 \mu\text{g}$ d'antigène HBs recombinant. Les caractéristiques cliniques (source cellulaire, type de donneur, GvHD chronique, photochimiothérapie extracorporelle) et de reconstitution immunitaire (numération des LT naïfs) influencent la réponse vaccinale. La réponse lymphocytaire à la stimulation par la PHA ne semble pas prédictive de la réponse vaccinale.

Les résultats de l'IFA spécifique du vaccin antitétanique suggèrent que : (i) certains receveurs d'allo-CSH ont une immunité cellulaire antitétanique préexistante à la vaccination et (ii) les IFA mesurant les réponses cellulaires peuvent contribuer à l'évaluation de la réponse vaccinale, quand l'interprétation de la sérologie est rendue délicate par les phénomènes de transfert passif d'anticorps.

Le suivi des patients et l'exploitation des données accumulées se poursuit, notamment en ce qui concerne la réponse à plus long terme au vaccin combiné pédiatrique et à la vaccination antipneumococcique.

b. Réponse vaccinale et reconstitution immunitaire après autogreffe de CSH

Au total, 32 receveurs d'auto-CSH ont été inclus dans un délai médian de 5,5 mois (IQR, 4,8-7,9) après leur auto-CSH. Les caractéristiques démographiques et hématologiques ainsi que l'état d'avancement de la reconstitution immunitaire à l'inclusion des receveurs d'auto-CSH sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4. Caractéristiques démographiques, hématologiques et état d'avancement de la reconstitution immunitaire des receveurs d'auto-CSH à l'inclusion. Abréviations : Ig, immunoglobuline ; IQR, intervalle interquartile ; NV, valeurs normales ; TCM, lymphocytes T à mémoire centraux ; TEM, lymphocytes T effecteurs à mémoire ; TEMRA, lymphocytes T à mémoire en différenciation terminale.

AUTO-HSCT recipients	n=32
Time from auto-HSCT (months), median (IQR)	5.5 (4.8-7.9)
Sex ratio M/F	25/7
Age (years), median (IQR)	53 (40.3-61.3)
Underlying disease, n(%)	
multiple myeloma	15 (46.9)
mature B neoplasms	11 (34.4)
mature T and NK neoplasms	2 (6.3)
Hodgkin lymphoma	4 (12.5)
Asplenia, n(%)	0
IVIg	4 (12.5)
time from last administration (months), median (IQR)	1.6 (0.3-3.8)
Concomitant treatments, n(%)	
lenalidomide	11 (34.3)
Immunoglobulin (g/L), median (IQR)	
IgG (NV, 6.7-12.5)	6.8 (5.1-9.81)
IgA (NV, 1.04-3.33)	0.8 (0.48-1.25)
IgM (NV, 0.52-1.46)	0.26 (0.17-0.55)
Absolute lymphocyte count (/μL), median (IQR) (NV, 1000-2800)	1185 (788-1663)
T-cells and subsets (/μL), median (IQR)	
CD3+ (NV, 521-1772)	707 (439-966)
CD3+ CD4+ (NV, 336-1126)	286 (196-405)
Naïve CD4+ (CD45RA+CCR7+) (NV, 121-456)	11 (4-35)
TCM CD4+ (CD45RA-CCR7+) (NV, 92-341)	81 (48-154)
TEM CD4+ (CD45RA-CCR7-) (NV, 59-321)	141 (83-225)
TEMRA CD4+ (CD45RA+CCR7-) (NV, 11-102)	4 (0-11.5)
CD3+ CD8+ (NV, 125-780)	415 (226-644)
Naïve CD8+ (CD45RA+CCR7+) (NV, 86-257)	20 (7-40)
TCM CD8+ (CD45RA-CCR7+) (NV, 19-93)	20 (5-32)
TEM CD8+ (CD45RA-CCR7-) (NV, 15-162)	178 (85-243)
TEMRA CD8+ (CD45RA+CCR7-) (NV, 39-212)	131 (52-219)
CD4+/CD8+ ratio (NV, 0.9-6)	0.73 (0.54-1.04)
B-cells and subsets (/μL), median (IQR)	
CD19+ (NV, 67-516)	86 (19-218)
CD20+ (NV, 64-593)	85 (18-211)
CD21+ (NV, 67-516)	76 (16-188)
NK cells (/μL), median (IQR) (NV, 70-523)	159 (101-240)

Le vaccin combiné pédiatrique hexavalent a été prescrit à tous les patients, conformément aux recommandations du HCSP (170). Quatre patients n'ont pas reçu le schéma vaccinal prescrit, 22 patients ont reçu ≥ 1 dose du vaccin combiné pédiatrique et pour 6 patients, cette information n'était pas disponible. La dose-1 a été administrée dans un délai médian de 9,3 mois (IQR, 7,1-11,6) après l'auto-CSH. Vingt-deux patients ont pu être évalués à l'occasion d'une première visite post-vaccinale, dont 19 avaient effectivement reçu au moins une dose de vaccin combiné pédiatrique.

Concernant le critère de jugement principal, à V2, 95,2% (IC95, 76,2-99,9 ; n=20/21), 100% (IC95, 83,9-100 ; n=21/21), 90,9% (IC95, 70,8-98,8 ; n=20/22) et 76,2% (IC95, 52,8-91,8 ; n=16/21) des patients évaluables avaient des anticorps supérieurs au seuil protecteur pour respectivement D, T, Hib et HBV (Figure 18).

L'évolution des titres d'anticorps est représentée figure 19.

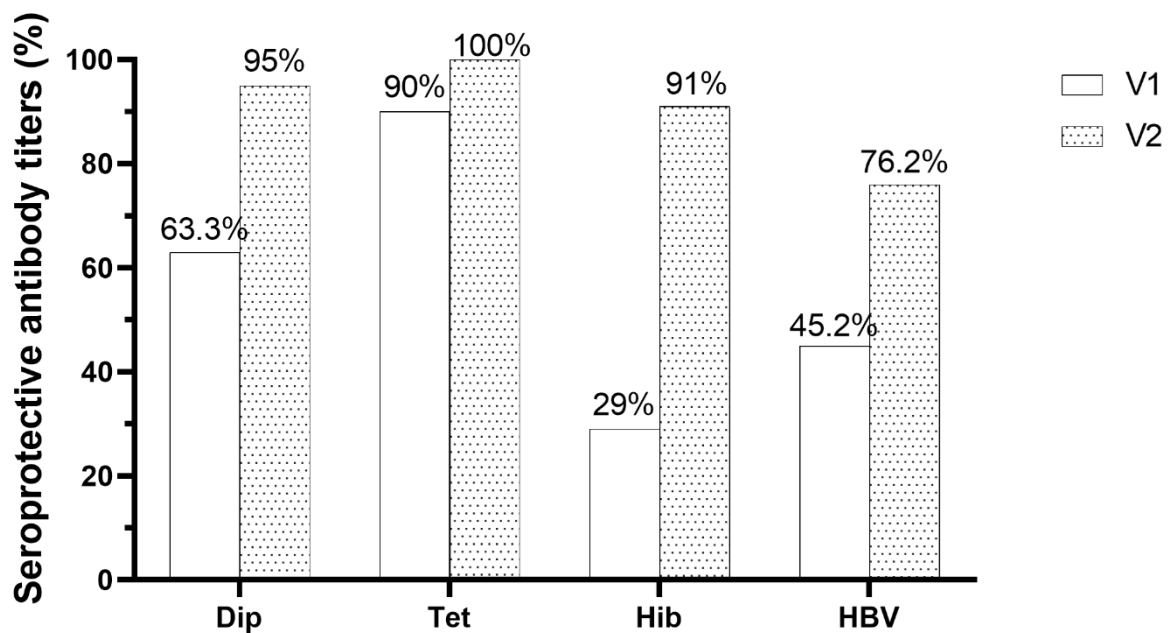


Figure 18. Proportion de receveurs d'autogreffe de CSH séroprotégés à l'inclusion (V1) et lors de la première visite post-vaccinale (V2). Les seuils de séroprotection retenus sont : Dip et Tet, 0,1 UI/mL ; Hib, 1 μ g/mL ; HBV, 10 mUI/mL (236). Abréviations : Dip, diphtérie ; Tet, tétanos ; Hib, Haemophilus influenzae type b ; HBV, hépatite B.

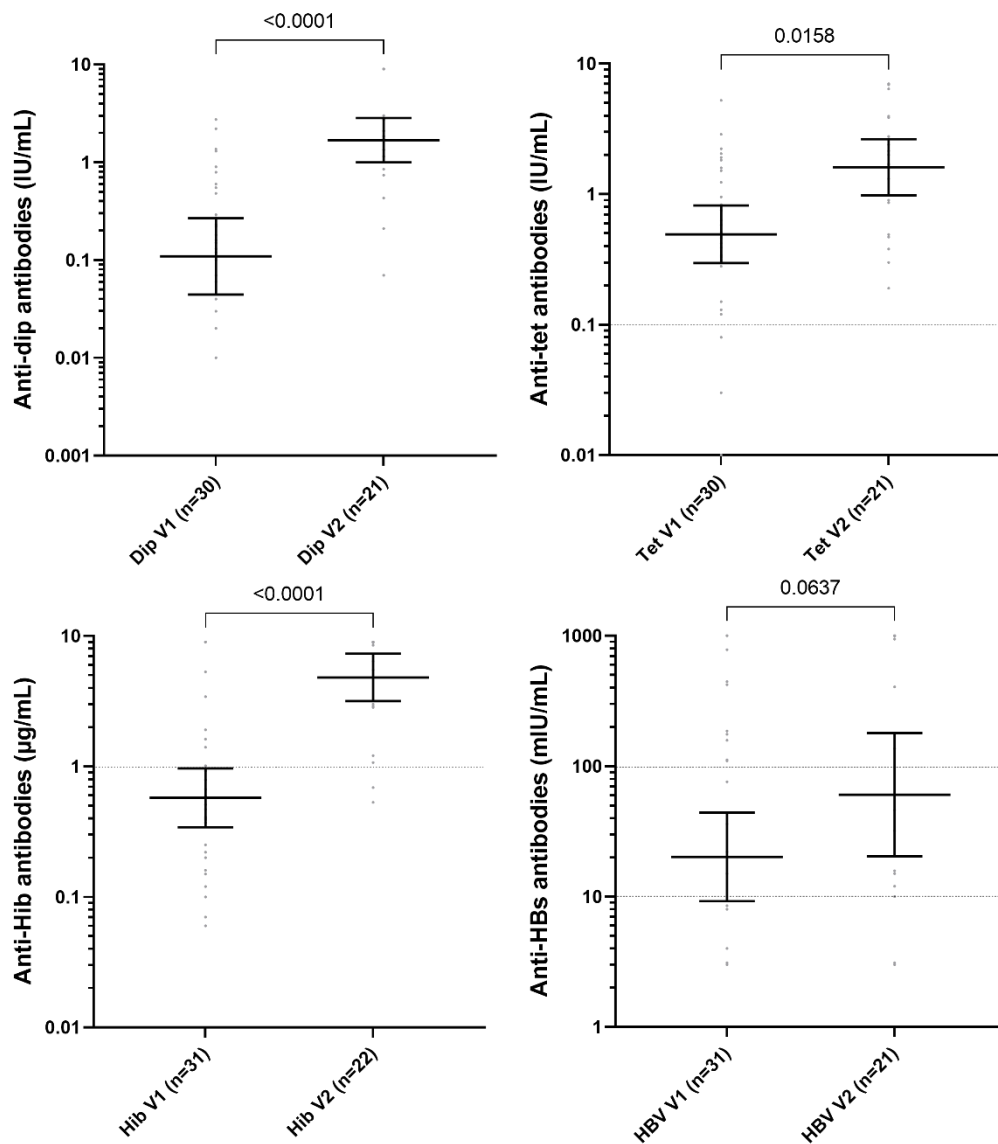


Figure 19. Evolution des concentrations d'anticorps spécifiques chez des receveurs d'auto-CSH vaccinés par 3 doses du vaccin combiné pédiatrique hexavalent. Les concentrations moyennes géométriques et leurs intervalles de confiance à 95% sont indiqués. Les seuils de séroprotection sont identifiés par des lignes horizontales pointillées. Les concentrations d'anticorps à V1 et V2 ont été comparées par le test de Wilcoxon. Abréviations : Dip, diphtérie ; Tet, tétanos ; Hib, Haemophilus influenzae type b ; HBs, antigène de surface du virus de l'hépatite B ; HBV, hépatite B.

Ces résultats obtenus chez des receveurs d'auto-CSH sont donc semblables à ceux observés chez les receveurs d'allo-CSH. Le suivi se poursuit et devrait permettre d'accumuler des données supplémentaires concernant la réponse vaccinale à plus long terme (24 mois). L'adhésion au programme de revaccination était en revanche moindre que dans la population des receveurs d'allo-CSH.

4. Quatrième article : intérêt d'un « IGRA » transcriptomique pour évaluer la reconstitution d'une immunité cellulaire spécifique du VZV après allogreffe de CSH

Titre : A Simple-to-Perform $\text{ifn-}\gamma$ mRNA Gene Expression Assay on Whole Blood Accurately Appraises Varicella Zoster Virus (VZV) Specific Cell-Mediated Immunity after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Auteurs : Mathilde Boccard*, Anne Conrad*, William Mouton*, Florent Valour, Chantal Roure-Sobas, Emilie Frobert, Barbara Rohmer, Vincent Alcazer, Hélène Labussière-Wallet, Hervé Ghesquières, Fabienne Venet, Karen Brengel-Pesce, Sophie Trouillet-Assant, Florence Ader on behalf of the Lyon HemInf study group

*co-premiers auteurs

Revue : Frontiers in Immunology

IF/rang : 7,561/B

Référence : Front Immunol. 2022 Jul 27;13:919806

doi: 10.3389/fimmu.2022.919806

Avant-propos :

Cette publication rapporte les résultats de l'étude de la reconstitution de l'immunité cellulaire spécifique du VZV chez des receveurs d'allo-CSH.

Nous avons choisi d'étudier l'immunité cellulaire spécifique du VZV car (i) plus de 95% des adultes sont infectés de façon latente par le VZV, (ii) les réactivations du VZV, potentiellement graves, sont fréquentes après allo-CSH, touchant jusqu'à un patient sur deux et (iii) la prévention des réactivations ne repose actuellement, en l'absence de disponibilité en France du vaccin contre le zona inactivé sous-unitaire recombinant, que sur la prophylaxie antivirale par valaciclovir, dont la durée de prescription n'est pas codifiée (139).

Le contrôle de l'infection latente par le VZV dépendant principalement de l'immunité cellulaire, disposer d'un biomarqueur, rapide et accessible, de l'immunité cellulaire spécifique du VZV pourrait aider les cliniciens dans leur prise de décision concernant la poursuite ou non de la prophylaxie antivirale chez un receveur d'allo-CSH donné (259).

Méthodes :

Il s'agit d'une étude transversale de la reconstitution de l'immunité cellulaire spécifique du VZV chez 60 receveurs d'allo-CSH (sur les 109 receveurs d'allo-CSH inclus au total dans l'étude VaccHemInf-FIGHT), à l'occasion de la consultation initiale pour mise en place du calendrier vaccinal (V1), vers 6 mois post-greffe.

La reconstitution immunitaire a été évaluée sur le plan quantitatif et fonctionnel, par mesure de la réponse *ex vivo* à la PHA (cf. section III.3). L'immunité spécifique du VZV a été analysée sur le plan humoral (sérologie) et sur le plan cellulaire, au moyen de trois IFA après stimulation *ex vivo* par une préparation commerciale d'antigène VZV ou une préparation antigénique « contrôle ». Ainsi, la sécrétion d'IFN- γ (IGRA) dans le surnageant et la prolifération des LT ont été quantifiées après 7 jours de stimulation antigénique de PBMC, respectivement par Ella et cytométrie en flux. La quantité d'ARNm d'*ifn- γ* a été mesurée par RT-PCR quantitative après 24h de stimulation antigénique d'un échantillon de sang total. L'immunité spécifique du VZV a été évaluée en parallèle par les mêmes méthodes chez 17 adultes volontaires sains, tous VZV-séropositifs, et deux jeunes nourrissons, naïfs pour le VZV.

Le seuil de positivité de l'IGRA a été fixé à 4,83 pg/mL, soit deux fois la valeur maximale de sécrétion d'IFN- γ observée après stimulation de PBMC par la préparation antigénique « contrôle ». Ce seuil a permis de définir deux catégories de receveurs d'allo-CSH : ceux ayant une immunité cellulaire spécifique du VZV (« VZV-répondeurs », si IGRA \geq seuil) et ceux n'ayant pas reconstitué une immunité cellulaire spécifique du VZV (« VZV-non-répondeurs », si IGRA < seuil).

Principaux résultats :

Six mois après l'allogreffe, près d'un tiers des receveurs d'allo-CSH recevaient un traitement immunosuppresseur et 13% présentaient une GvHD chronique. Tous recevaient du valaciclovir au moment de l'étude, et au moins 98% (n=58/59) étaient infectés de façon latente par le VZV (donnée manquante pour un patient et un patient « séronégatif » d'après une sérologie VZV prélevée au moment du bilan pré-greffe, après plusieurs lignes de chimiothérapie, donc potentiellement faussement négative). Les LT étaient quantitativement normaux (nombre absolu moyen 887/ μ L) et capables de répondre à la stimulation par le mitogène (PHA), bien qu'à des niveaux moindres que les volontaires sains.

La stimulation antigénique de PBMC par l'antigène VZV déclenchait une sécrétion d'IFN- γ supérieure au seuil de positivité précédemment défini chez 26% (n=15/57) des receveurs d'allo-CSH, qualifiés « VZV-répondeurs ». Seuls 2 patients parmi ces « VZV-répondeurs » avaient précédemment présenté des manifestations cliniques de réactivation VZV sous forme de zona, suggérant chez les 13 autres patients des réactivations VZV infracliniques. Cette réponse IFN- γ était hautement corrélée (r=0,87) à la prolifération lymphocytaire. Ces « VZV-répondeurs » se distinguaient des « non-répondeurs » par des taux de LT CD4+ naïfs, à mémoire centraux et LT CD8+ naïfs significativement plus élevés en analyse univariée.

De façon intéressante, la sécrétion d'IFN- γ à J7 de stimulation de PBMC était hautement corrélée ($r=0,84$) à la quantité d'ARNm d'*ifn- γ* détectée dès 24h de stimulation dans un échantillon de sang total. Les 15 « VZV-répondeurs » exprimaient à 24h de stimulation des quantités d'ARNm d'*ifn- γ* significativement augmentées (*fold change* ≥ 2) par rapport aux conditions de contrôle, contrairement à la majorité des « VZV-non répondeurs ».

Ceci suggère que la présence ou non d'une immunité cellulaire spécifique du VZV pourrait être estimée à partir de la quantification des transcrits d'ARNm d'*ifn- γ* (« IGRA transcriptomique ») détectés après 24h de stimulation antigénique d'un échantillon de sang total.

Enfin, les « VZV-répondeurs » avaient des titres d'IgG spécifiques du VZV significativement plus élevés que les non-répondeurs, suggérant la reconstitution d'une immunité humorale contre le VZV.

Les contrôles pédiatriques VZV-naïfs, bien que capables de répondre au mitogène, ne montraient pas de réponse cellulaire spécifique dans les trois modalités de tests immunitaires fonctionnels après stimulation antigénique VZV.

Discussion :

A 6 mois post-greffe, un peu plus d'un quart des receveurs d'allo-CSH testés répondaient à une stimulation antigénique VZV *in vitro* par l'expression du gène *ifn- γ* aboutissant à la production d'IFN- γ , suggérant la reconstitution d'une immunité cellulaire spécifique du VZV, probablement à l'occasion de réactivations virales endogènes. En effet, les réactivations endogènes, infracliniques, sont fréquentes chez les personnes immunodéprimées et contribuent à stimuler et/ou entretenir la mémoire immunitaire T et B spécifique du VZV (259–262).

Il est admis que l'immunité cellulaire joue un rôle clé dans la prévention des réactivations (symptomatiques) du VZV, bien que les mécanismes précis ne soient pas encore élucidés, et qu'il n'existe pas de corrélat de protection défini. La population de LT est un acteur déterminant dans le contrôle de la réplication VZV, au cours de la primo-infection et des réactivations VZV. Ainsi, les réactivations VZV sont plus fréquentes et plus graves chez les personnes ayant un déficit lymphocytaire T (en particulier CD4+), quantitatif ou fonctionnel. A l'inverse, des marqueurs d'immunité cellulaire spécifique du VZV élevés chez la personne âgée (vaccinée ou non contre le zona), sont corrélés à des épisodes de zona moins fréquents et moins graves (263,264). Il est à noter que les LT n'interviennent probablement pas tant dans le maintien du VZV à l'état latent dans son site de latence, le ganglion neuronal sensitif, que dans le contrôle

des réactivations VZV lorsqu'elles surviennent. En effet, des études autopsiques ont montré que les ganglions neuronaux sensitifs n'étaient pas infiltrés par des LT spécifiques du VZV (265). Le contrôle de la latence du VZV reposerait sur les cellules de l'immunité innée, et en particulier les cellules NK (259,266).

En attendant une reconstitution immunitaire « suffisante » (sans que cet état ne soit précisément défini), il est recommandé d'administrer aux receveurs de greffe de CSH une prophylaxie antivirale par valaciclovir (81,148). Cette étude transversale apporte des éléments de réponse à la question de la gestion de cette prophylaxie antivirale. Nos données montrent que les seuils quantitatifs d'immunodépression utilisés en pratique courante pour décider de l'arrêt de la prophylaxie, comme le seuil de LT CD4+ $\geq 200/\mu\text{L}$, ne permettent pas *a priori* d'identifier les receveurs d'allo-CSH ayant recouvert une immunité adaptative spécifique du VZV. La numération des sous-populations lymphocytaires T, notamment de phénotype naïf, est plus informative. Disposer d'un outil de type IGRA, accessible en routine et fiable, permettant d'identifier les receveurs d'allo-CSH ayant une immunité cellulaire spécifique du VZV, et chez qui le valaciclovir pourrait être arrêté sans risque, est donc pertinent pour répondre à cette problématique médicale.

Les IGRA sont désormais bien implantés en pratique clinique courante pour le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente (QuantiFERON®-TB Gold Plus, QIAGEN, ou T-SPOT®.TB, Oxford Immunotec Ltd.) et jouissent d'un intérêt croissant pour l'évaluation de l'immunité cellulaire à d'autres pathogènes, en particulier le CMV, notamment par le QuantiFERON®-CMV (QIAGEN) chez les personnes transplantées (267,268).

En ce qui concerne le VZV, il n'y a pas de test « gold standard » évaluant l'immunité cellulaire spécifique. Différentes équipes ont évalué l'immunité cellulaire spécifique du VZV par diverses méthodes : *in vitro*, sur sang total ou PBMC, après stimulation par divers types d'antigène VZV (cf. discussion de l'article complet), par la quantification de la sécrétion d'IFN- γ ou du nombre de cellules productrices d'IFN- γ (par ELISpot ou par cytométrie en flux avec ICS) ; *in vivo* par des tests cutanés (216,263,269–272). Ces techniques ont chacune des avantages et inconvénients, mais surtout, aucun corrélat de protection n'est défini, ces outils n'ayant pas de « seuil » de positivité prédictif d'une immunité VZV fonctionnelle. De plus, il est vraisemblable qu'il existe une « zone grise » entre « présence » et « absence » d'immunité cellulaire spécifique du VZV, plus ou moins importante selon la technique choisie.

Le choix du seuil de positivité dans notre étude peut donc nous être reproché, ce d'autant que nous n'avons pas pu le valider dans une cohorte externe. De plus, la corrélation de l'IGRA avec les résultats de prolifération lymphocytaire T en réponse à la stimulation antigénique VZV n'est pas parfaite, en sachant que la technique de prolifération lymphocytaire, plus lourde à

mettre en œuvre, est également plus sujette à des variations d'interprétation. Le choix du seuil de positivité de l'IGRA aurait pu être affiné à l'aide d'une courbe ROC (pour *receiver operating characteristic*), si la cohorte avait été plus grande et le nombre de réactivations VZV authentifiées plus important.

En cela réside la principale limite de notre étude : nous présentons ici les résultats de l'évaluation de l'immunité cellulaire spécifique du VZV à un instant donné, en l'occurrence 6 mois post-greffe, période charnière après l'allo-CSH. L'exploitation des données de reconstitution immunitaire spécifique à 1 an de l'inclusion est en cours. Nous ne sommes pas en mesure de conclure sur la significativité clinique d'un IGRA VZV « positif » – cela protège-t-il d'une réactivation (symptomatique) ultérieure ? Pour répondre à cette question, il faudrait disposer de données de suivi longitudinal, idéalement dans plusieurs cohortes indépendantes, mesurant l'incidence de zona en fonction de la valeur de l'IGRA à des temps donnés.

De façon innovante, nous avons mesuré la quantité d'ARNm d'*ifn-γ* après 24h de stimulation d'un échantillon de sang total (100 µL) par l'antigène VZV. La quantité d'ARNm d'*ifn-γ* détectée à H24 s'est avérée fortement corrélée à la sécrétion de la protéine IFN-γ après 7 jours de stimulation antigénique de PBMC. Cela ouvre la perspective à une simplification de l'outil de l'IGRA. En effet, au-delà de ne nécessiter que 24h de stimulation antigénique (contre 3 voire 7 jours selon les autres techniques d'IGRA), cette technique permet de s'affranchir de l'étape chronophage d'isolation de PBMC, et peut être réalisée sur un volume de sang très faible. Enfin, la technique de PCR étant largement maîtrisée dans les laboratoires de biologie des centres prenant en charge des patients greffés, l'implémentation d'un tel « IGRA transcriptomique » devrait être relativement simple à mettre en place. A notre connaissance, l'évaluation de l'immunité cellulaire spécifique du VZV au niveau transcriptomique n'a pas été rapportée à ce jour. Les résultats de notre étude, notamment leur significativité clinique concernant la prédiction du risque de réactivation VZV symptomatique, devront être validés de façon prospective dans d'autres cohortes. Comme proposé dans notre article, un essai randomisé contrôlé permettrait d'investiguer l'utilité de ce test dans la gestion personnalisée de la prophylaxie antivirale.

Au-delà de cette limite concernant la significativité clinique, nos méthodes expérimentales, à l'inverse de techniques de type ICS, ne permettent pas de répondre à la question de la source cellulaire de l'IFN-γ mesuré. L'expression du gène *ifn-γ* à 24h pourrait reposer principalement sur les cellules NK, effecteurs de l'immunité innée, alors que la sécrétion d'IFN-γ à 7 jours semble être principalement médiée par les LT, comme le suggère la corrélation avec la prolifération de LT. Certains experts ont d'ailleurs formulé l'hypothèse que la réponse

immunitaire adaptative cellulaire spécifique du VZV pourrait en fait être un marqueur indirect de modifications dans les populations cellulaires immunitaires innées, responsables du contrôle de l'infection virale latente (259).

En conclusion, en attendant la mise à disposition du vaccin contre le zona inactivé sous-unitaire recombinant en France, la prévention des réactivations du VZV après allo-CSH repose sur l'administration d'une prophylaxie antivirale universelle, dont la gestion pourrait être personnalisée grâce à des tests immunologiques simples et rapides évaluant l'immunité cellulaire spécifique du VZV.



A Simple-to-Perform *ifn-γ* mRNA Gene Expression Assay on Whole Blood Accurately Appraises Varicella Zoster Virus-Specific Cell-Mediated Immunity After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation

OPEN ACCESS

Edited by:

Raffaella Greco,
San Raffaele Hospital (IRCCS), Italy

Reviewed by:

Vicki Traina-Dorge,
Tulane University, United States
Varun Mehra,
King's College Hospital NHS
Foundation Trust, United Kingdom

*Correspondence:

Florence Ader
florence.ader@chu-lyon.fr

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

Specialty section:

This article was submitted to
Alloimmunity and Transplantation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 13 April 2022

Accepted: 20 June 2022

Published: 27 July 2022

Citation:

Boccard M, Conrad A, Mouton W,
Valour F, Roure-Sobas C, Frobert E,
Rohmer B, Alcazer V,
Labussière-Wallet H, Ghesquières H,
Venet F, Brengel-Pesce K,
Trouillet-Assant S and Ader F (2022)
A Simple-to-Perform *ifn-γ* mRNA Gene
Expression Assay on Whole Blood
Accurately Appraises Varicella Zoster
Virus-Specific Cell-Mediated Immunity
After Allogeneic Hematopoietic
Stem Cell Transplantation.
Front. Immunol. 13:919806.
doi: 10.3389/fimmu.2022.919806

Mathilde Boccard^{1,2†}, Anne Conrad^{1,2†}, William Mouton^{1,3†}, Florent Valour^{1,2},
Chantal Roure-Sobas⁴, Emilie Frobert^{1,4}, Barbara Rohmer⁵, Vincent Alcazer^{1,6},
Hélène Labussière-Wallet⁶, Hervé Ghesquières^{1,6}, Fabienne Venet^{1,3,7,8},
Karen Brengel-Pesce³, Sophie Trouillet-Assant^{1,3} and Florence Ader^{1,2*}

¹ Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Inserm U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, Lyon, France, ² Département des Maladies infectieuses et tropicales, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, ³ Laboratoire de Recherche Commun (LCR), Hospices Civils de Lyon/BioMérieux, Pierre-Bénite, France, ⁴ Institut des Agents Infectieux, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, ⁵ Service d'Hépatologie Gastro-Entérologie et Nutrition Pédiatriques, Hôpital Femme Mère Enfant, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, ⁶ Département d'Hématologie clinique, Centre Hospitalier Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Bénite, France, ⁷ Laboratoire d'Immunologie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France, ⁸ EA7426 UCBL1-HCL-bioMérieux Pathophysiology of Injury-induced Immunosuppression, Lyon, France

Herpes zoster, which is due to the reactivation of Varicella zoster virus (VZV), is a leading cause of morbidity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). While cell-mediated immunity (CMI) is critical to inhibiting VZV reactivation, CMI is not routinely assessed due to a lack of reliable tests. In this study, we aimed to evaluate VZV-specific CMI among allo-HSCT recipients (n = 60) and healthy individuals (HI, n = 17) through a panel of three immune functional assays after *ex vivo* stimulation by VZV antigen: quantification of (i) IFN- γ release in the supernatants, (ii) T-cell proliferation after a 7-day stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and (iii) measurement of the *ifn-γ* mRNA gene expression level after 24 h of stimulation of a whole-blood sample. VZV responsiveness was defined according to IFN- γ release from VZV-stimulated PBMC. Upon VZV stimulation, we found that allo-HSCT recipients at a median time of 6 [5-8] months post-transplant had lower IFN- γ release (median [IQR], 0.34 [0.12–8.56] vs. 409.5 [143.9–910.2] pg/ml, $P < .0001$) and fewer proliferating T cells (0.05 [0.01–0.57] % vs. 8.74 [3.12–15.05] %, $P < .0001$) than HI. A subset of allo-HSCT recipients (VZV-responders, n = 15/57, 26%) distinguished themselves from VZV-non-responders (n = 42/57, 74%; missing data, n = 3) by higher IFN- γ release (80.45 [54.3–312.8] vs. 0.22 [0.12–0.42] pg/ml, $P < .0001$) and T-cell proliferation (2.22 [1.18–7.56] % vs. 0.002

[0.001–0.11] %, $P < .0001$), suggesting recovery of VZV-specific CMI. Interestingly, VZV responders had a significant fold increase in *ifn- γ* gene expression, whereas *ifn- γ* mRNA was not detected in whole blood of VZV-non-responders ($P < .0001$). This study is the first to suggest that measurement of *ifn- γ* gene expression in 24-h-stimulated whole blood could be an accurate test of VZV-specific CMI. The routine use of this immune functional assay to guide antiviral prophylaxis at an individual level remains to be evaluated.

Keywords: varicella zoster virus, hematopoietic stem cell transplantation, cell-mediated immunity, immune functional assays, interferon gamma, antiviral prophylaxis

INTRODUCTION

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

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

VZV-specific cell-mediated immunity can be assessed by immune functional assays (IFA) which evaluate cellular immune responses to *in vitro* stimulation by VZV antigens. These assays can be performed on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or whole-blood samples, and different readouts of VZV-specific cell-mediated immunity can be used, such as evaluation of lymphocyte proliferative response or quantification of interferon (IFN)- γ secretion (IFN- γ release assay, IGRA) (18–23). Nevertheless, assays on PBMC are cumbersome and time- and resource-consuming, so that they are not routinely performed. A fast, reproducible IFA monitoring VZV-specific immunity out of a small volume of whole-blood sample is of major interest to

discriminate recipients having VZV-specific efficient immune response. We hypothesized that an upstream measurement of *ifn- γ* gene expression in 24-h-stimulated whole blood might correlate with VZV-specific cell-mediated immune status, as determined by standard IFA performed on PBMC. In this proof-of-concept, cross-sectional study, we determined the VZV-specific cell-mediated immune status of a cohort of adult allo-HSCT recipients at approximately 6 months post-transplant using three methods: an innovative *ifn- γ* mRNA gene expression assay from a small whole-blood sample, an automatized enzyme-linked immunosorbent IGRA, and an *ex vivo* lymphocyte proliferation assay, both performed on participant PBMC.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

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

Concomitantly, blood samples from healthy individuals (HI), recruited among adult donors to the Lyon (France) blood bank (*Etablissement Français du Sang*, EFS), were obtained to serve as controls. According to the 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 HI. The blood donors' personal data were anonymized before transfer to the research laboratory. Regulatory authorizations for the handling and conservation of these samples were obtained from the regional review board (*Comité de Protection des Personnes Sud-Est II*) and the French ministry of research (*Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation*, DC-2008–64). Blood samples from children (VZV-naïve controls) were provided as part of a study approved by the regional review board (*Comité de Protection des Personnes Sud-Est III*, 2013-011B), French Data Protection Authority (CNIL, DR-2013-354), and French Advisory Committee on Healthcare Research Data Processing (CCTIRS, 2013.223). Parents' written consent was obtained for each participant.

Quantification of VZV Antibodies

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

IFN- γ Release Assay and T-Cell Proliferation Measured on VZV-Stimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells

As previously described, fresh PBMC were purified from a heparin-coated blood tube (24). Fresh PBMC were plated onto a 96-well plate at 1×10^5 cells per well and incubated at 37°C and 5% of CO₂ overnight. PBMC were then stimulated with either VZV grade 2 antigen, a gamma-irradiated antigen preparation corresponding to the supernatants of a VZV-infected cell line (MRC-5 cells; Microbix Biosystems, Mississauga, Ontario, Canada), or MRC-5 control antigen (supernatants from uninfected MRC-5 cells, CTRL) at 20 μ g/l, or medium alone (non-stimulated control, NUL) for 7 days. A 3-day stimulation with phytohemagglutinin (PHA; Remel, Oxoid, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 4 μ g/l served as mitogen control and medium alone (NUL) as its related negative control condition. Concentrations of stimulants, as well as length of incubation, had been determined by preliminary assays (data not shown).

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

Pellets collected from paired wells were analyzed for T-cell proliferation using the Click-It[™] EdU AF488 flow kit (C10420; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) to measure incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) according to the previously

published protocol (26). Briefly, the percentage of EdU⁺ proliferating cells (among CD3⁺ cells) was obtained by flow cytometry analyses performed on a Navios flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). For each experiment, a minimum of 2.5×10^3 CD3⁺ cells were recorded. Data were analyzed using Kaluza software (version 1.2, Beckman Coulter). Values equal to "zero" proliferation were set to 0.01% to be plottable on a logarithmic scale.

ifn- γ mRNA Gene Expression Assay on VZV-Stimulated Whole Blood

Heparinized whole blood (100 μ l) was distributed into a 96-well plate. VZV antigen at 20 μ g/l (VZV), medium alone (non-stimulated control, NUL), or supernatants from uninfected MRC-5 cells (negative control, CTRL) were added to a single well and incubated for 24 h at 37°C and 5% of CO₂. Total RNA was extracted using the RNeasy Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were harvested and lysed in RLT buffer (lysis buffer) supplemented with β -mercaptoethanol and stored at -80°C until further processing. RNA quantity and quality were determined using NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). For mRNA detection, RNA was retro-transcribed using SuperScript VILO cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher) followed by qPCR performed using commercial TaqMan probes for *ifn- γ* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and normalized using the mean of *PP1B* and *DECR1* housekeeping genes on CFX Connect Real-Time (RT)-PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The relative differential expression of the *ifn- γ* gene was expressed as a fold change using the 2- $\Delta\Delta$ Ct method (27). The first Δ CT is the difference in threshold cycle between the *ifn- γ* gene and the geometric mean of housekeeping in all conditions (VZV, CTRL, or NUL). $\Delta\Delta$ CT is the difference of *ifn- γ* gene Δ CT obtained in stimulated conditions (VZV or CTRL) compared to the unstimulated control condition (NUL).

Post-Transplant T-Cell Immunophenotyping

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

Statistical Analysis

Qualitative variables were expressed as counts (percentages), and quantitative continuous data were expressed as mean and range or as median and interquartile range [IQR]. Quantitative non-gaussian data were compared using the Kruskal–Wallis test or the Mann–Whitney test, where appropriate. Qualitative data were compared between groups using Fisher's exact test. The association between quantitative data was quantified by a non-parametric Spearman rank-correlation coefficient (95%

confidence interval [CI]). Two-sided tests were performed with statistical significance defined by $P < .05$. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism[®] software (version 8.3; GraphPad software, La Jolla, CA, USA) and R (version 3.4.4; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

RESULTS

Participant Characteristics

HI ($n = 17$) and allo-HSCT recipients ($n = 60$) were included. HI and allo-HSCT recipients did not significantly differ in terms of

age (median [IQR], 42 [33–51] vs. 44.5 [34–60] years, $P = .39$) and sex (sex ratio, 1.1 vs. 1.3, $P = .79$). Allo-HSCT recipients were enrolled at a median [IQR] time of 6 [5–8] months post-transplant. All HI were VZV-seropositive, 98% ($n = 58/59$; missing data, $n = 1$), and 75% ($n = 45/60$) of allo-HSCT recipients had positive VZV IgG titers prior to transplantation and at enrollment, respectively. Nineteen (32%) allo-HSCT recipients were on immunosuppressive therapy, and 41 (68%) had received intravenous Ig infusions at a median [IQR] time of 4 [3–6] months before inclusion (**Table 1**). VZV IgG titers at inclusion were not higher among patients having received intravenous Ig infusions ($P = .16$). Pediatric controls ($n = 2$) were VZV-naïve.

TABLE 1 | Baseline characteristics of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients.

		n = 60
Demographics		
	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)
	<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]

(Continued)

TABLE 1 | Continued

	n = 60
Immunophenotyping of lymphocyte subsets (cells/μL), mean (range)	
Lymphocytes (NV, 1,000–2,800/ μ L)	1,601 (410–4,910)
CD3 ⁺ T-lymphocytes (NV, 521–1,772/ μ L)	887 (145–3,406)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-lymphocytes (NV, 336–1,126/ 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 (50–2,779)
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 (0–1,517)
DM CD8 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁺) (NV, 39–212/ μ L)	276 (0–1,500)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio (NV, 0.9–6)	0.97 (0.12–9.07)
CD20 ⁺ B-lymphocytes (NV, 64–593/ μ L)	282 (14–1,439)
NK cells (NV, 70–523/ μ L)	235 (30–2,023)
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)

*Based on 2016 revisions of the World Health Organization classification of myeloid and lymphoid neoplasms (28, 29). [†]Missing value, n = 1. [‡]Immunosuppressive therapies included cyclosporine (n = 9), tacrolimus (n = 4), corticosteroids (n = 8), ruxolitinib (n = 3). Abbreviations: ATG, antithymocyte globulin; CM, central memory; DM, differentiated memory; DLI, donor lymphocyte infusion; EM, effector memory; GvHD, graft-versus-host disease; HLA, human leukocyte antigen; IQR, interquartile range; IS, immunosuppressive; Ig, immunoglobulin; IVIg, intravenous immunoglobulins; MAC, myeloablative conditioning; NK, natural killer; NV, normal values; RIC, reduced intensity conditioning; TBI, total body irradiation; VZV, varicella zoster virus.

Cell-Mediated Immunity Upon Phytohemagglutinin Stimulation

First, to verify that HI and allo-HSCT recipients were able to mount a detectable immune response upon mitogen stimulation, IFN- γ in supernatants and proliferation of PHA-stimulated PBMC were determined. HI and allo-HSCT recipients developed a significantly higher IFN- γ release and percentage of EdU⁺ proliferating cells (among CD3⁺ cells) ($P < .0001$ for both) compared to control conditions, indicating that these tests were appropriate to assess lymphocyte functionality in the study population. However, IFN- γ release (median [IQR], 5863 [1,335–16,602] vs. 74,884 [44,574–89,385] pg/ml, $P = .004$) and proliferation capacity of T-cells (median [IQR], 23.8 [14.6–33.7] % vs. 39.9 [34–48.1] %, $P = .02$) were significantly lower in allo-HSCT recipients than in HI (**Supplementary Figure 1**). Among pediatric controls, IFN- γ release and T-cell proliferation (EdU⁺ CD3⁺ cells) upon PHA stimulation were 52.6–210.3 pg/ml and 38.5%–45.4%, respectively.

VZV-Specific Cell-Mediated Immunity

A 7-day stimulation of PBMC with VZV antigen resulted in a significantly lower IFN- γ release in the supernatant (median [IQR], 0.34 [0.12–8.56] vs. 409.5 [143.9–910.2] pg/ml, $P < .0001$) and a significantly lower percentage of EdU⁺ proliferating cells (among CD3⁺ cells) (0.05 [0.01–0.57] % vs. 8.74 [3.12–15.05] %, $P < .0001$) among allo-HSCT recipients as compared to HI (**Figures 1A, B**). Both were highly correlated (Spearman's correlation coefficient 0.87; 95% CI [0.79–0.92]; **Figure 1C**). Conversely, VZV-specific T-cell proliferation was not correlated with unspecific PHA-induced T-cell proliferation

(Spearman's correlation coefficient, 0.07 [95% CI, -0.2–0.34]). Of note, VZV-naïve controls did not mount any proliferative response (no EdU⁺ proliferating CD3⁺ cells: 0%–0%) and had IFN- γ release below LLOQ (0.104–0.131 pg/ml).

Results indicated that allo-HSCT recipients had an impaired VZV-specific T-cell function based on lower proliferation and IFN- γ release post-stimulation. When focusing on allo-HSCT recipients' results, two subsets were observed and classified as VZV responders (n = 15/57, 26%) or non-responders (n = 42/57, 74%; missing data, n = 3) based on IFN- γ secretion level above the positivity threshold (**Table 2**). Among the VZV-responder group, a significantly higher IFN- γ release was observed, as compared to the VZV-non-responder group (median [IQR], 80.45 [54.3–312.8] vs. 0.22 [0.12–0.42] pg/ml, $P < .0001$). The IFN- γ release among the VZV-responder group was lower than among HI (median [IQR], 409.5 [143.9–910.2] pg/ml), but the difference did not reach statistical significance ($P = .64$). Of note, similar observations were made for the VZV-specific proliferative response, with a significant higher proliferation capacity in the VZV-responder group, as compared to the VZV-non-responder group (median [IQR], 2.22 [1.18–7.56] % vs. 0.002 [0.001–0.11] %, $P < .0001$). Proliferative response among the VZV-responder group was lower than in HI without reaching statistical significance (median [IQR], 8.74 [3.12–15.05] %, $P = .76$).

Interestingly, 13/15 (87%) of VZV responders had a positive VZV-specific humoral response, as depicted by higher IgG titers (median [IQR], 1382 [494.4–1577] mIU/ml), as compared to the VZV-non-responder group, where 29/42 (69%) had a positive titer (median [IQR], 383.1 [141.1–664.2] mIU/ml, $P = .005$).

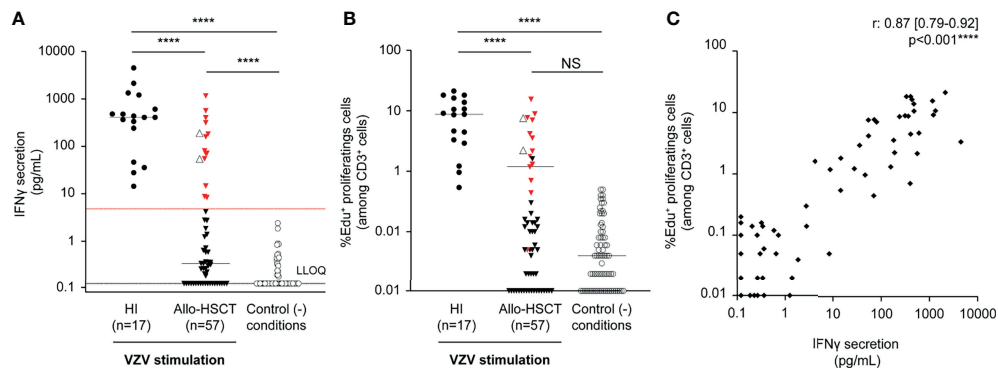


FIGURE 1 | VZV-specific cell-mediated immunity according to immunoassays on peripheral blood mononuclear cells. Peripheral blood mononuclear cells isolated (1×10^5 cells) from healthy individuals (HI, $n = 17$) and allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients (allo-HSCT, $n = 57$) were stimulated by VZV antigen (inactivated supernatants from VZV-infected MRC-5 cells, $20 \mu\text{g/ml}$) or supernatants from VZV-uninfected MRC-5 cells (control condition) and incubated for 7 days in duplicate. **(A)** IFN- γ release (pg/ml) in the supernatants was quantified using the ELLA nanofluidic system. Bars represent median values, black dotted line represents the lower limit of quantification (LLOQ = 0.17 pg/ml), and red dotted line represents the arbitrarily defined threshold of positivity of the assay, i.e., 4.83 pg/ml , corresponding to twice the maximum value observed in the control condition. All values below LLOQ have been set at 0.12 pg/ml corresponding to $\text{LLOQ}/\sqrt{2}$. **(B)** In respective wells, T-cell 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[®]. Groups were compared using Kruskal–Wallis test; **** $P < .0001$, NS: not significant. Red triangles represent recipients defined as VZV-responders, i.e., having recovered a VZV-specific cellular-mediated immunity according to the IFN- γ release assay. Clear triangles represent recipients who developed herpes zoster-related manifestations. **(C)** Correlation analysis between T-cell proliferation and IFN- γ release results obtained from the same well was performed using Spearman rank-correlation test; the P-values and the correlation coefficient are indicated. Data were missing for three VZV-stimulated allo-HSCT recipients.

Altogether, these results suggest an ongoing recovery of VZV-specific immunity in the VZV-responder group. Only 2/15 (13%) had reported HZ-compatible clinical manifestations at 4 and 5 months post-transplant, respectively, while none in the VZV-non-responder group.

***ifn- γ* mRNA Gene Expression in Response to Whole Blood VZV Antigen Stimulation**

To investigate the VZV-specific immune response at the transcriptional level, the relative differential expression (fold change) of *ifn- γ* mRNA at 24 h in VZV-stimulated whole blood was compared to that found in non-stimulated conditions. The VZV responders according to IFN- γ secretion from PBMC ($n = 15$) had a significant fold increase in *ifn- γ* gene expression in whole blood (median [IQR], $12.99 [5.3\text{--}79.79]$), whereas the relative expression of *ifn- γ* mRNA was not detected for other allo-HSCT recipients (median [IQR], $0.85 [0.55\text{--}1.44]$, $P < .0001$) (**Figure 2A**). Moreover, *ifn- γ* gene expression in allo-HSCT recipients and HI was significantly correlated with IFN- γ release and percentage of Edu^+ proliferating cells (among CD3^+ cells) (Spearman's correlation coefficients, 0.84 , 95% CI $[0.75\text{--}0.9]$ and 0.82 , 95% CI $[0.73\text{--}0.89]$, respectively; **Figures 2B, C**). Overall, these results indicate a consistency between upstream *ifn- γ* gene expression at 24 h in VZV-stimulated whole blood and downstream lymphocyte proliferative and IFN- γ -releasing capacities of PBMC at day 7 in response to VZV antigen. In VZV-naïve controls, *ifn- γ* mRNA was not significantly expressed after VZV stimulation (fold change: $0.66\text{--}1.87$). Overall, results of VZV-specific IFA in VZV-naïve pediatric controls confirmed the specificity of these assays.

Post-Transplant T-Cell Immunophenotyping and Correlation With IFN- γ Release

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

DISCUSSION

This study provides insights into VZV-specific immune reconstitution after allo-HSCT. We found that 15/57 (26%) of allo-HSCT recipients had recovered a VZV-specific IFN- γ response by 6 months post-transplant, in the absence of any HZ-related clinical event for the majority of them. Interestingly, the measurement of *ifn- γ* gene expression by qPCR at 24 h on a small-volume whole-blood sample could be as effective and less

TABLE 2 | VZV-specific immune responses of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients.

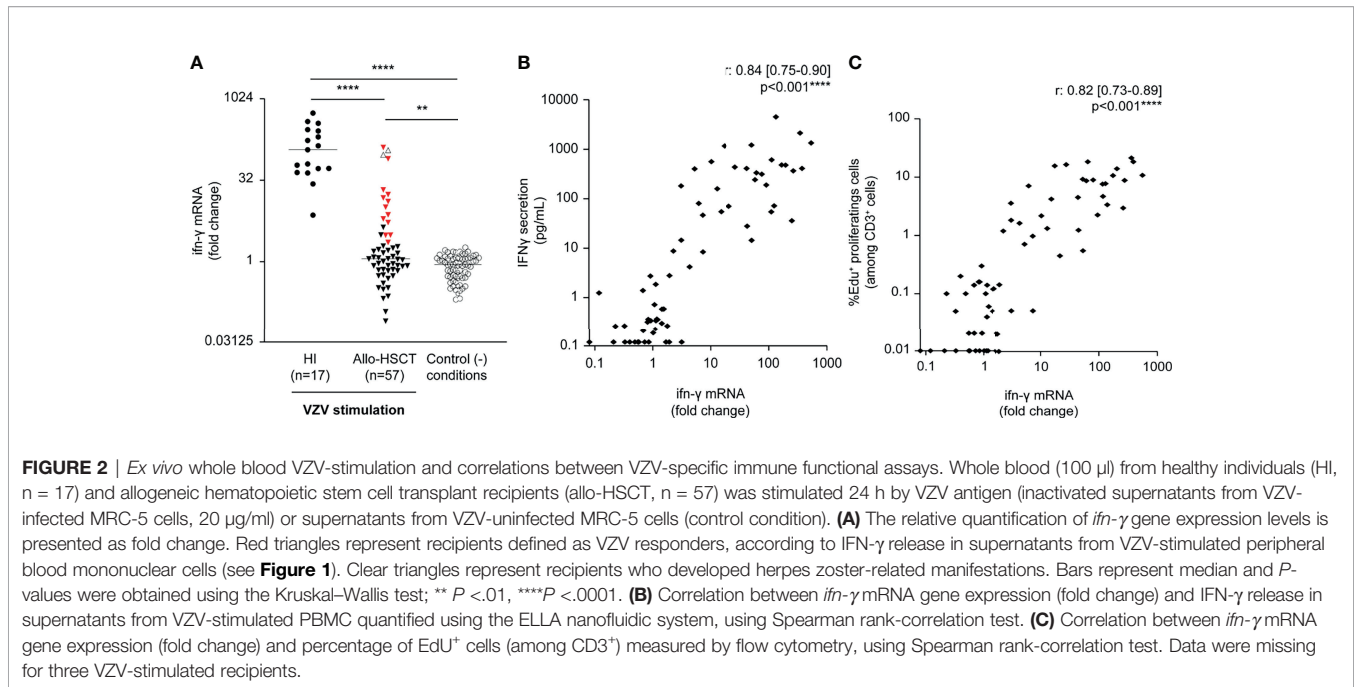
	VZV non-responders (n = 42)*	VZV responders (n = 15)	P
7-day VZV-stimulated PBMC, median [IQR]			
IFN- γ release (pg/mL)	0.22 [0.12–0.42]	80.45 [54.3–312.8]	<.0001
EdU ⁺ proliferating cells among CD3 ⁺ cells (%)	0.002 [0.001–0.11]	2.22 [1.18–7.56]	<.0001
24-h VZV-stimulated whole blood[†], median [IQR]			
<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	1,090 [710–2,460]	1,590 [1,000–2,130]	.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
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

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

time-consuming than standard IFA based on the quantification of lymphocyte proliferation and IFN- γ release upon VZV antigen stimulation to identify allo-HSCT recipients that have recovered VZV-specific cell-mediated immunity. In addition, we found that naïve (CD45RA⁺CCR7⁺) T-cell counts and central memory (CD45RA⁻CCR7⁺) CD4⁺ T-cell counts correlated with the reconstitution of the VZV-specific immune repertoire.

Reconstitution of VZV-specific immunity following allo-HSCT is mostly driven by endogenous VZV reexposure, rather than by exogenous reinfection, and can occur with or without clinical manifestations and despite antiviral prophylaxis (20, 21, 30–32). Subclinical VZV reactivations are well described in immunocompromised patients (18–20, 32). In the present study, the majority (13/15, 87%) of VZV responders had not presented any HZ-compatible manifestation, although *in vitro* assays showed detectable VZV-specific immune cell responses. Relative to the entire cohort of allo-HSCT recipients, this proportion of subclinical VZV reactivations (13/60, 22%) is overall consistent with previous studies that reported 26% to 41% of subclinical VZV reactivations among adult bone marrow transplant recipients (20, 33).

Importantly, unresponsiveness to VZV was not associated with the receipt of immunosuppressive treatment, suggesting that the process of immune reconstitution *per se* is individual. IFN- γ release in response to VZV stimulation was correlated with naïve CD4⁺ and CD8⁺ and central memory CD4⁺ T-cell subsets despite low total CD4⁺ T-cell absolute counts. This suggests that thymopoiesis contributes to the reconstitution of cognate cell-mediated immune responses and an antiviral-specific T-cell repertoire (34), rather than survival of host cells or expansion of donor-derived T-cells. Therefore, detection of VZV-specific cell-mediated immunity might be a surrogate marker of the reconstitution of a thymus-dependent, functional T-cell pool after allo-HSCT, although quantitative naïve T-cell assessment did not strongly correlate with functional response. Importantly, the total CD4⁺ T-cell count did not discriminate VZV responders from VZV non-responders: more than half of VZV non-responders had a total CD4⁺ T-cell count above 200/ μ L, a threshold of the immunosuppressive state validated in the context of human immunodeficiency virus infection, but that many clinicians use to guide antimicrobial prophylaxis strategies in other settings of immunodepression.



Furthermore, no hematological or transplant-related characteristic was associated with VZV responsiveness.

Humoral immunity to VZV, measured by IgG antibody titers, is known not to correlate with immune protection, and infusions of blood-derived products, in particular intravenous Ig, can lead to non-interpretable results (8, 20, 22, 35). Consistently, 29/42 (69%) of VZV non-responders had positive VZV IgG values in this study. Different IFA have been proposed to quantify VZV-specific cell-mediated immunity, but there is no validated “gold standard.” VZV-specific T-cell proliferation assays, performed on PBMC or whole blood (5, 20, 22, 36, 37), have several limitations. The first relates to the various origins of IFN- γ production. The correlation between VZV-specific IFN- γ release and T-cell subsets suggests that IFN- γ is mainly secreted by T-cells. To gain the detection sensitivity of VZV-responsive T-cells at the single-cell level, the IFN- γ enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay has been proposed (9, 31, 32, 38). However, in addition to being labor intensive because of the multiple experimental steps from PBMC preparation to spot detection, enumeration of IFN- γ spot-forming cells proves to be difficult. The second limit relates to the threshold of detection of IFN- γ . Others have reported that IFN- γ release in the supernatant of whole blood incubated with live VZV was not detected before 48 h and peaked at 72 h (22). Consequently, to test the VZV status more rapidly, we formulated the hypothesis that measuring upstream *ifn- γ* gene expression in 24-h-stimulated whole blood would predict the VZV status as effectively as downstream synthesized IFN- γ protein at day 7. qPCR on whole blood is relatively simple to perform, in comparison to various cell-based IFA. To the best of our knowledge, this is the first study assessing the *ifn- γ* gene expression level as a marker of VZV-specific cell-mediated immunity. As PCR techniques are widely used during routine

post-transplant care, the implementation of the VZV-specific *ifn- γ* gene expression assay on whole blood at a lab experienced in the follow-up of allo-HSCT recipients should be relatively easy. The main advantages of PCR assays are their time- and resource-sparing nature, their relative technical ease, and their reproducibility.

Taken together and considering that one quarter of allo-HSCT recipients had detectable VZV-specific cell-mediated immunity by the time of study initiation (6 months post-transplant), measuring the VZV-specific *ifn- γ* gene expression level in whole blood once every trimester after allo-HSCT could help to monitor kinetics of specific immune reconstitution. If assumed as a surrogate marker of VZV-specific immunity, this assay, combined to T-cell immunophenotyping, could ultimately guide antiviral prophylaxis in a personalized manner. This would provide the basis for an interventional, randomized, controlled trial vs. standard of care to test the hypothesis that it is safe to stop antiviral prophylaxis based on a personalized approach using the *ifn- γ* gene expression assay. The primary endpoint would be the absence of HZ reactivation following prophylaxis interruption. An earlier interruption of antiviral prophylaxis could avoid overtreatment and emergence of HSV cross-resistance to acyclovir and limit compliance issues. Other useful applications of the *ifn- γ* gene expression assay could be proposed such as determining VZV-specific immunity status in other patient groups at risk of VZV reactivation (i.e., solid organ transplant recipients, multiple myeloma patients, elderly people) or evaluating cellular response to VZV vaccination.

Beyond antiviral prophylaxis, VZV-related disease can be prevented by vaccination. The inactivated RZV has demonstrated a clinical efficacy of 68.2% to prevent HZ after autologous HSCT and has been recently shown in a prospective cohort study to be safe after allo-HSCT, although immunogenicity data in this setting are

lacking (39, 40). The RZV has been recently recommended to immunocompromised adults, including allo-HSCT recipients, in the USA, but is not currently available in France (41).

This study has limitations. The results of this proof-of-concept study require a validation cohort. We report VZV-specific immunity at a single time point (approximately 6 months post-transplant, due to the design of the VaccHemInf study which aims to study response to the inactivated vaccines which are recommended in this timeframe). The time of 6-month post-transplant corresponds to a pivotal period, when allo-HSCT recipients are usually off immunosuppressive therapy and when immune reconstitution is well underway from a quantitative point of view. We did not assess in this study kinetics of antiviral immune reconstitution. Due to the high seroprevalence of VZV (>95%) among adults in France, the specificity of VZV IFA was confirmed on pediatric samples (42, 43). The choice of VZV antigen (supernatants from VZV-infected MRC-5 cells, inactivated by gamma irradiation), although widely used, can be criticized due to cross-reactivity with other herpesvirus, especially herpes simplex virus-1, as previously reported *in vivo* (44, 45). Peptides based on VZV glycoprotein gE and immediate-early 63 might be more suitable antigens. It would also have been of interest to compare the assay with the intracellular cytokine staining method or the histocompatibility complex-tetramer technology such as previously described for CMV reactivation (46, 47); similarly, for thymopoiesis after allo-HSCT, quantitative assessment of T-cell receptor rearrangement excision circles (TRECs) could have been used as an informative surrogate marker for recipients, as previously described in the setting of viral reactivation (48).

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

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this article are not readily available because no patient-level data can be made available, in accordance with data protection laws. Upon reasonable request, aggregate data with different levels of resolution may be possible to provide. Requests to access the datasets should be directed to florence.ader@chu-lyon.fr.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Comité de Protection des Personnes Sud-Est V, Grenoble, France (69HCL17_0769). The patients/participants

provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MB contributed to the conception and design of the study and to the acquisition and interpretation of the data and drafted the manuscript. AC and WM contributed to the acquisition and interpretation of the data and drafted the manuscript. CR-S and EF performed the VZV serology assays and contributed to the revision of the paper for important intellectual content. BR provided pediatric control samples and contributed to the revision of the paper for important intellectual content. FVa, VA, HL-W, HG, and KB-P contributed to the interpretation of the data and to the revision of the paper for important intellectual content. FVe contributed to the acquisition of the data of immune functional assays, to the interpretation of the data, and to the revision of the paper for important intellectual content. ST-A contributed to the conception and design of the study, to the acquisition and interpretation of the data, and to the revision of the paper for important intellectual content. FA conceived and designed the study, participated in the analyses and interpretation of the data, and drafted the manuscript. All authors have read and have approved the final version of the manuscript.

FUNDING

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

The authors are grateful to the Direction de la Recherche en Santé (DRS) des Hospices Civils de Lyon, as well as to the Région Auvergne-Rhône-Alpes for supporting the VaccHemInf-FIGHT cohort. The authors would like to thank Philip Robinson for the helpful reviewing of the manuscript and Fabien Subtil and Maxime Bodinier for help in statistical analysis. The authors gratefully acknowledge Pr Etienne Javouhey and Dr Solène Rémy for their help to recruit pediatric controls, the staff of the Centre

de Ressources Biologiques Sud and Dr Pierre Sujobert for biobanking of samples from the VaccHemInf-FIGHT cohort, and the Centre de Recherche Clinique Hématologie Sud and the nurses from the hematology department of the Hospices Civils de Lyon for their assistance during the entire study.

REFERENCES

- Han CS, Miller W, Haake R, Weisdorf D. Varicella Zoster Infection After Bone Marrow Transplantation: Incidence, Risk Factors and Complications. *Bone Marrow Transplant* (1994) 13(3):277–83.
- Leung TF, Chik KW, Li CK, Lai H, Shing MMK, Chan PKS, et al. Incidence, Risk Factors and Outcome of Varicella-Zoster Virus Infection in Children After Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant* (2000) 25(2):167–72. doi: 10.1038/sj.bmt.1702119
- Berman JN, Wang M, Berry W, Neuberg DS, Guinan EC. Herpes Zoster Infection in the Post-Hematopoietic Stem Cell Transplant Pediatric Population may be Preceded by Transaminitis: An Institutional Experience. *Bone Marrow Transplant* (2006) 37(1):73–80. doi: 10.1038/sj.bmt.1705191
- Koc Y, Miller KB, Schenkein DP, Griffith J, Akhtar M, Desjardin J, et al. Varicella Zoster Virus Infections Following Allogeneic Bone Marrow Transplantation: Frequency, Risk Factors, and Clinical Outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* (2000) 6(1):44–9. doi: 10.1016/S1083-8791(00)70051-6
- Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Cell-Mediated Immunity to Varicella-Zoster Virus After Allogeneic Marrow Transplant. *J Infect Dis* (1980) 141(4):479–87. doi: 10.1093/infdis/141.4.479
- 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* (2009) 43(10):757–70. doi: 10.1038/bmt.2008.386
- Su SH, Martel-Laferrriere V, Labbe AC, Snyderman DR, Kent D, Laverdiere M, et al. High Incidence of Herpes Zoster in Nonmyeloablative Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* (2011) 17(7):1012–7. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.10.025
- Arvin AM, Moffat JF, Redman R. Varicella-Zoster Virus: Aspects of Pathogenesis and Host Response to Natural Infection and Varicella Vaccine. *Adv Virus Res* (1996) 46:263–309. doi: 10.1016/S0065-3527(08)60074-3
- Levin MJ, Oxman MN, Zhang JH, Johnson GR, Stanley H, Hayward AR, et al. Varicella-Zoster Virus-Specific Immune Responses in Elderly Recipients of a Herpes Zoster Vaccine. *J Infect Dis* (2008) 197(6):825–35. doi: 10.1086/528696
- Levin MJ, Smith JG, Kaufhold RM, Barber D, Hayward AR, Chan CY, et al. Decline in Varicella-Zoster Virus (VZV)-Specific Cell-Mediated Immunity With Increasing Age and Boosting With a High-Dose VZV Vaccine. *J Infect Dis* (2003) 188(9):1336–44. doi: 10.1086/379048
- Laing KJ, Ouwendijk WJD, Koelle DM, Verjans GMGM. Immunobiology of Varicella-Zoster Virus Infection. *J Infect Dis* (2018) 218(suppl_2):S68–74. doi: 10.1093/infdis/jiy403
- Arvin AM. Humoral and Cellular Immunity to Varicella-Zoster Virus: An Overview. *J Infect Dis* (2008) 197 Suppl 2:S58–60. doi: 10.1086/522123
- Blennow O, Fjaertoft G, Winiarski J, Ljungman P, Mattsson J, Remberger M. Varicella-Zoster Reactivation After Allogeneic Stem Cell Transplantation Without Routine Prophylaxis—the Incidence Remains High. *Biol Blood Marrow Transplant* (2014) 20(10):1646–9. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.06.002
- Geddes M, Storek J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. 20(2):329–48. doi: 10.1016/j.beha.2006.09.009
- 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* (2016) 7:507. doi: 10.3389/fimmu.2016.00507
- Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications Among Hematopoietic Cell Transplant Recipients: A Global Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant* (2009) 15(10):1143–238. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.06.019
- Jamani K, MacDonald J, Lavoie M, Williamson TS, Brown CB, Chaudhry A, et al. Zoster Prophylaxis After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Using Acyclovir/Valacyclovir Followed by Vaccination. *Blood Adv* (2016) 1(2):152–9. doi: 10.1182/bloodadvances.2016000836
- Luby JP, Ramirez-Ronda C, Rinner S, Hull A, Vergne-Marini P. A Longitudinal Study of Varicella-Zoster Virus Infections in Renal Transplant Recipients. *J Infect Dis* (1977) 135(4):659–63. doi: 10.1093/infdis/135.4.659
- Malavige GN, Rohanachandra LT, Jones L, Crack L, Perera M, Fernando N, et al. IE63-Specific T-Cell Responses Associate With Control of Subclinical Varicella Zoster Virus Reactivation in Individuals With Malignancies. *Br J Cancer* (2010) 102(4):727–30. doi: 10.1038/sj.bjc.6605542
- 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(5):840–7. doi: 10.1093/infdis/153.5.840
- Boeckh M, Kim HW, Flowers MED, Meyers JD, Bowden RA. Long-Term Acyclovir for Prevention of Varicella Zoster Virus Disease After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation—a Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Blood* (2006) 107(5):1800–5. doi: 10.1182/blood-2005-09-3624
- Otani N, Baba K, Okuno T. Interferon-Gamma Release Assay: A Simple Method for Detection of Varicella-Zoster Virus-Specific Cell-Mediated Immunity. *J Immunol Methods* (2009) 351(1–2):71–4. doi: 10.1016/j.jim.2009.09.010
- Terada K, Itoh Y, Fujii A, Kitagawa S, Ogita S, Ouchi K. Varicella-Zoster Virus-Specific, Cell-Mediated Immunity With Interferon-Gamma Release Assay After Vaccination of College Students With No or Intermediate IgG Antibody Response. *J Med Virol* (2015) 87(2):350–6. doi: 10.1002/jmv.24031
- Conrad A, Boccard M, Valour F, Alcazer V, Tovar Sanchez AT, Chidiac C, et al. 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* (2019) 9(2):e026093. doi: 10.1136/bmjopen-2018-026093
- Maple P A C, Rathod P, Smit E, Gray J, Brown D, Boxall EH. Comparison of the Performance of the LIAISON VZV-IgG and VIDAS Automated Enzyme Linked Fluorescent Immunoassays With Reference to a VZV-IgG Time-Resolved Fluorescence Immunoassay and Implications of Choice of Cut-Off for LIAISON Assay. *J Clin Virol* (2009) 44(1):9–14. doi: 10.1016/j.jcv.2008.08.012
- 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* (2014) 415:71–9. doi: 10.1016/j.jim.2014.10.006
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* (2001) 25(4):402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. *Blood* (2016) 127(20):2391–405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544
- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Lymphoid Neoplasms. *Blood* (2016) 127(20):2375–90. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569
- Redman RL, Nader S, Zerboni L, Liu C, Wong RM, Brown BW, et al. Early Reconstitution of Immunity and Decreased Severity of Herpes Zoster in Bone

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.919806/full#supplementary-material>

- Marrow Transplant Recipients Immunized With Inactivated Varicella Vaccine. *J Infect Dis* (1997) 176(3):578–85. doi: 10.1086/514077
31. 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(12):1417–24. doi: 10.1016/j.bbmt.2008.09.004
 32. 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* (2012) 189(10):5016–28. doi: 10.4049/jimmunol.1201759
 33. Wilson A, Sharp M, Koropchak CM, Ting SF, Arvin AM. Subclinical Varicella-Zoster Virus Viremia, Herpes Zoster, and T Lymphocyte Immunity to Varicella-Zoster Viral Antigens After Bone Marrow Transplantation. *J Infect Dis* (1992) 165(1):119–26. doi: 10.1093/infdis/165.1.119
 34. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, Brenchley JM, Hill BJ, Zhang L, et al. Assessment of Thymic Output in Adults After Haematopoietic Stem-Cell Transplantation and Prediction of T-Cell Reconstitution. *Lancet* (2000) 355(9218):1875–81. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02293-5
 35. Webster A, Grint P, Brenner MK, Prentice HG, Griffiths PD. Titration of IgG Antibodies Against Varicella Zoster Virus Before Bone Marrow Transplantation is Not Predictive of Future Zoster. *J Med Virol* (1989) 27(2):117–9. doi: 10.1002/jmv.1890270209
 36. Hayashida K, Ozaki T, Nishimura N, Gotoh K, Funahashi K, Nakane K, et al. Evaluation of Varicella Zoster Virus-Specific Cell-Mediated Immunity by Using an Interferon- γ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Immunol Methods* (2015) 426:50–5. doi: 10.1016/j.jim.2015.07.011
 37. Yang P, Chen Z, Zhang J, Li W, Zhu C, Qiu P, et al. Evaluation of Varicella-Zoster Virus-Specific Cell-Mediated Immunity by Interferon- γ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Adults ≥ 50 Years of Age Administered a Herpes Zoster Vaccine. *J Med Virol* (2019) 91(5):829–35. doi: 10.1002/jmv.25391
 38. Salem Fourati I, Grenier AJ, Jolette É, Merindol N, Ovetchkine P, Soudeyns H. Development of an IFN- γ ELISpot Assay to Assess Varicella-Zoster Virus-Specific Cell-Mediated Immunity Following Umbilical Cord Blood Transplantation. *J Vis Exp* (2014) (89):51643. doi: 10.3791/51643
 39. Bastidas A, de la Serna J, El Idrissi M, Oostvogels L, Quittet P, López-Jiménez J, et al. Effect of Recombinant Zoster Vaccine on Incidence of Herpes Zoster After Autologous Stem Cell Transplantation: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* (2019) 322(2):123–33. doi: 10.1001/jama.2019.9053
 40. Baumrin E, Izaguirre NE, Bausk B, Feeley MM, Bay CP, Yang Q, et al. Safety and Reactogenicity of the Recombinant Zoster Vaccine After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Blood Adv* (2021) 5(6):1585–93. doi: 10.1182/bloodadvances.2020003749
 41. Anderson TC, Masters NB, Guo A, Shepersky L, Leidner AJ, Lee GM, et al. Use of Recombinant Zoster Vaccine in Immunocompromised Adults Aged ≥ 19 Years: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices - United States, 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2022) 71(3):80–4. doi: 10.15585/mmwr.mm7103a2
 42. Khoshnood B, Debruyne M, Lançon F, Emery C, Fagnani F, Durand I, et al. Seroprevalence of Varicella in the French Population. *Pediatr Infect Dis J* (2006) 25(1):41–4. doi: 10.1097/01.inf.0000195636.43584.bb
 43. Saadatian-Elahi M, Mekki Y, Del Signore C, Lina B, Derrough T, Caulin E, et al. Seroprevalence of Varicella Antibodies Among Pregnant Women in Lyon-France. *Eur J Epidemiol* (2007) 22(6):405–9. doi: 10.1007/s10654-007-9136-z
 44. 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* (2016) 196(5):2205–18. doi: 10.4049/jimmunol.1502366
 45. Chiu C, McCausland M, Sidney J, Duh FM, Roupheal N, Mehta A, et al. Broadly Reactive Human CD8 T Cells That Recognize an Epitope Conserved Between VZV, HSV and EBV. *PLoS Pathog* (2014) 10(3):e1004008. doi: 10.1371/journal.ppat.1004008
 46. Gratama JW, van Esser JW, Lamers CH, Tournay C, Löwenberg B, Bolhuis RL, et al. Tetramer-Based Quantification of Cytomegalovirus (CMV)-Specific CD8+ T Lymphocytes in T-Cell-Depleted Stem Cell Grafts and After Transplantation may Identify Patients at Risk for Progressive CMV Infection. *Blood* (2001) 98(5):1358–64. doi: 10.1182/blood.V98.5.1358
 47. Raeeszadeh M, Pachnio A, Begum J, Craddock C, Moss P, Chen FE. Characterization of CMV-Specific CD4+ T-Cell Reconstitution Following Stem Cell Transplantation Through the Use of HLA Class II-Peptide Tetramers Identifies Patients at High Risk of Recurrent CMV Reactivation. *Haematologica* (2015) 100(8):e318–22. doi: 10.3324/haematol.2015.123687
 48. Brown JA, Stevenson K, Kim HT, Cutler C, Ballen K, McDonough S, et al. Clearance of CMV Viremia and Survival After Double Umbilical Cord Blood Transplantation in Adults Depends on Reconstitution of Thymopoiesis. *Blood* (2010) 115(20):4111–9. doi: 10.1182/blood-2009-09-244145

Conflict of Interest: WM has a PhD grant CIFRE 2019 (conventions industrielles de formation par la recherche, Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, Paris, France) half-funded by Lyon University and half-funded by bioMérieux SA. KB-P is an employee of bioMérieux SA, an *in vitro* diagnostic company.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Boccard, Conrad, Mouton, Valour, Roure-Sobas, Frobert, Rohmer, Alcazer, Labussière-Wallet, Ghesquière, Venet, Brengel-Pesce, Trouillet-Assant and Ader. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

IV. Discussion générale

Ce travail translationnel mené sur une cohorte prospective longitudinale a pour but de répondre à des questions pratiques que se posent les cliniciens impliqués au quotidien dans la prise en charge des receveurs d'allo-CSH : quelles sont l'efficacité et la tolérance du schéma de revaccination recommandé après allo-CSH ? L'approche « *one-fits-all* » est-elle adaptée à la revaccination des receveurs d'allo-CSH dès 6 mois post-greffe ? Des outils d'immunomonitoring permettent-ils de prédire voire d'optimiser la réponse vaccinale dans une approche personnalisée ? Et comment *in fine* mieux protéger ces patients contre les maladies à prévention vaccinale ?

Les deux études VaccHemInf ont inclus au total plus de 200 adultes receveurs d'allo-CSH, ce qui en font les cohortes les plus importantes jamais publiées concernant la vaccination après allo-CSH (hors COVID-19). Grâce à ces données, nous sommes en mesure d'apporter des premiers éléments de réponse aux questions formulées ci-dessus concernant le vaccin combiné pédiatrique et de proposer des conclusions pratiques.

La revaccination des adultes receveurs d'allo-CSH par un schéma comportant 3+1 doses du vaccin combiné pédiatrique, dont l'utilisation est conforme aux recommandations françaises mais hors autorisation de mise sur le marché, s'est avérée immunogène, et ce dès 6 mois post-greffe. En effet, les taux de réponse au vaccin combiné pédiatrique étaient bons (>85-90% de séroprotection) pour la valence polysaccharidique conjuguée Hib voire excellents (>90-95% de séroprotection) pour les valences protéiques D et T à moyen terme. Par ailleurs, nous n'avons pas observé une réactogénicité accrue, y compris chez les patients avec une GvHD.

L'utilisation du vaccin combiné pédiatrique, comportant les valences D et Ca fortement dosées, apparaît donc adaptée à la revaccination des adultes receveurs d'allo-CSH en cours de reconstitution immunitaire, dans les délais recommandés.

Nos données confirment notre hypothèse que les caractéristiques hématologiques et liées à la transplantation (type de donneur, source cellulaire, GvHD etc.) ou à la reconstitution immunitaire influencent l'*amplitude* de la réponse humorale à la primovaccination (3 doses). Les effectifs et la puissance statistique ne nous ont pas permis de systématiquement mettre en évidence une association significative, mais les tendances observées sont cliniquement pertinentes.

En particulier, les patients allogreffés recevant un traitement immunosuppresseur étaient capables de répondre à la vaccination. De même, la présence d'une GvHD chronique et/ou d'un traitement par photochimiothérapie extracorporelle n'empêchait pas la réponse au vaccin combiné pédiatrique mais était associée à des niveaux d'anticorps spécifiques post-vaccination plus faibles, en particulier pour les valences T et HBV.

Concernant la photochimiothérapie extracorporelle, son impact sur la réponse vaccinale est très peu documenté : une seule étude avait précédemment été menée chez des patients atteints de sclérodémie et avait permis de montrer l'absence d'impact significatif de ce traitement immunomodulateur sur les réponses immunitaires humorale et cellulaire, tant à un néo-antigène qu'à un antigène de rappel (273). D'un point de vue physiopathologique, la photochimiothérapie extracorporelle, dans le cadre du traitement de la GvHD, induirait *via* différents mécanismes des LT régulateurs, sans supprimer les lymphocytes à fonction effectrice et mémoire (274,275).

Une question pertinente à étudier pourrait être de diminuer la primovaccination à deux au lieu de trois doses de vaccin combiné pédiatrique, de façon similaire au nourrisson.

Une information importante apportée par nos données est la nécessité d'une dose de rappel de vaccin combiné pédiatrique, à distance de la primovaccination, telle que recommandée par le HCSP (mais non recommandée par exemple par l'ECIL).

En effet, nos résultats indiquent que cette dose de rappel « gomme » l'effet des caractéristiques associées à une moins bonne réponse vaccinale. D'un point de vue chronologique, elle intervient quand la reconstitution lymphocytaire B a bien progressé (>18 mois post-greffe). Elle permet sans doute d'augmenter le pool de LB mémoire et plasmocytes longue vie sécréteurs d'anticorps, d'assurer le maintien de titres d'anticorps « protecteurs » à long terme, outre son intérêt pour la maturation d'affinité des anticorps. Cette dose de rappel (voire des doses de rappel ultérieures, selon l'évolution des titres d'anticorps) nous semble d'autant plus importante d'un point de vue physiopathologique que la GvHD est associée à une diminution du pool de LB mémoire CD27+, à une suppression du pool de plasmocytes issus du receveur (effet « *graft-versus-plasma cell* ») et à une altération de l'homéostasie lymphocytaire B en général (67–69,101,276–278).

Ces conclusions doivent être nuancées pour la réponse à la valence HBV. Alors que le vaccin combiné pédiatrique a des propriétés immunogènes satisfaisantes pour cinq valences et convainc par sa praticité, le dosage à 10 µg d'antigène HBs ne permet pas d'obtenir une réponse optimale avec seulement environ 80% de séroprotection (anti-HBs ≥10 mUI/mL) à l'issue des quatre doses. La dose d'antigène HBs est connue pour être l'un des principaux déterminants de l'immunogénicité de la vaccination hépatite B, à côté de l'âge du sujet vacciné

et possiblement l'état fonctionnel du thymus, comme le suggère l'association que nous avons observé entre la numération de LT CD4 naïfs et la réponse à la vaccination HBV. La dose habituelle d'antigène HBs recombinant dans les vaccins HBV destinés à l'adulte est de 20 µg, et le schéma vaccinal à 3x20 µg permet d'obtenir une réponse vaccinale chez 90-95% des adultes immunocompétents (279).

Par conséquent, nous concluons qu'il est nécessaire de dissocier la valence HBV et d'appliquer aux receveurs adultes d'allo-CSH un schéma vaccinal comportant au moins 3 doses « adulte » d'antigène HBs. Une autre question pertinente à étudier sera de définir le meilleur schéma vaccinal, en optimisant la dose d'antigène HBs unitaire et totale administrée, tel que testé dans d'autres situations d'immunodépression (VIH, greffe d'organe solide) et récemment dans une cohorte de receveurs d'allo-CSH (250,252).

Au total, nos conclusions pratiques concernant la revaccination D, T, Hib et HBV peuvent être résumées ainsi :

- (i) bonne réponse vaccinale obtenue dès 6-12 mois post-greffe ;**
- (ii) intérêt à utiliser le vaccin combiné pédiatrique (pentavalent), immunogène et sûr, à raison de 3 doses au titre de la primovaccination suivies d'une dose de rappel à distance ;**
- (iii) dissocier la vaccination HBV des autres valences et utiliser des doses unitaires d'antigène HBs ≥20 µg.**

L'originalité du deuxième volet de notre projet, la cohorte VaccHemInf-FIGHT, est de développer une approche translationnelle centrée sur l'évaluation de la réponse cellulaire T. En effet, l'approche traditionnelle basée sur la mesure des seuls titres d'anticorps ne permet pas d'appréhender la réponse vaccinale dans son ensemble. Les avancées majeures des méthodes permettant d'identifier des signatures liées à la réponse cellulaire T et B doivent progressivement être intégrées dans l'analyse des profils de réponse immunitaire dans une optique de stratégie personnalisée.

Un premier intérêt des IFA réside dans leur valeur prédictive potentielle de la réponse vaccinale, en émettant l'hypothèse qu'il existe des transferts d'immunité de cellules mémoires du donneur au receveur.

Pour la réponse cellulaire T, plusieurs études ont suggéré qu'une réponse à un antigène vaccinal *in vitro* avant la vaccination était prédictive d'une meilleure réponse humorale à la vaccination. Pour exemple, dans une étude récente évaluant le vaccin contre l'encéphalite à tiques (TBE, pour *tick-born encephalitis*) après allo-CSH (n=17) en Autriche, zone endémique pour la TBE avec une couverture vaccinale élevée, une importante réponse proliférative des

LT à une stimulation par l'antigène vaccinal avant vaccination était prédictive d'une meilleure réponse humorale au schéma de primovaccination (280). Ceci suggère que l'interconnexion (« cross-talk ») des réponses T et B est importante pour maximiser la réponse adaptative dans la qualité et la durée. De plus, les receveurs d'allo-CSH greffés avec un donneur intrafamilial avaient une probabilité plus élevée de répondre à la vaccination TBE que les receveurs d'allo-CSH greffés avec un donneur non apparenté, suggérant un transfert d'immunité.

Dans l'étude VaccHemInf-FIGHT, 13% des receveurs d'allo-CSH testés avaient une réponse IFN- γ proche des volontaires sains à la stimulation par le vaccin antitétanique, avant toute vaccination, compatible avec un transfert d'immunité cellulaire T. Ces résultats devront être consolidés par une étude ultérieure.

Pour la réponse B, une autre étude récente a évalué la réponse précoce (J7), en postulant que des LB mémoire contenus dans le greffon pouvaient répondre à la primovaccination par le vaccin combiné pédiatrique pentavalent à minimum 6 mois après l'allo-CSH (n=27). Cette réponse était comparée à celle de volontaires sains recevant une dose de rappel vaccinal (243). A J7 après vaccination, une expansion des plasmablastes circulants était observée chez les volontaires sains, significativement plus importante que chez les receveurs d'allo-CSH, en cohérence avec une réponse de type secondaire, et dont la spécificité était confirmée en ELISpot B. Néanmoins, certains receveurs d'allo-CSH avaient une fréquence de cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques de l'antigène vaccinal similaire aux volontaires sains, attestant de la persistance d'une réponse secondaire chez certains allogreffés.

En dépit du fait que ces données indiquent un transfert de mémoire immunitaire (LT et LB mémoire) au moment de l'allo-CSH, il existe cependant une importante variabilité interindividuelle. Un transfert de cellules mémoire est plus probable à l'occasion des greffes de CSP, non T-déplétées, qu'à l'occasion des greffes de moelle osseuse ou d'USP, moins riches en LT.

La mise en évidence de la possibilité d'un transfert d'immunité T et/ou B ouvre la voie à une optimisation des stratégies de prévention contre les maladies infectieuses chez les patients immunodéprimés :

- D'une part, il pourrait être mis à profit par la vaccination ciblée des donneurs de CSH (intrafamiliaux) peu de temps avant la greffe, pour induire un transfert adoptif de lymphocytes mémoire spécifiques enrichissant le greffon. Cela pourrait être particulièrement pertinent pour les maladies responsables d'une importante morbi-mortalité chez les receveurs d'allo-CSH, telles que les infections virales respiratoires.
- D'autre part, le schéma de revaccination du receveur d'allo-CSH pourrait être adapté de façon individuelle, en fonction de l'existence ou non d'une réponse cellulaire

mémoire : ainsi, un receveur ayant une réponse cellulaire T *ex vivo* préexistante à la revaccination et/ou ayant une réponse B précoce avec des caractéristiques de réponse anamnestic pourrait ne nécessiter qu'une seule dose de rappel, au lieu d'un schéma de revaccination complet. Ces deux stratégies d'optimisation vaccinale devront bien évidemment être validées par des études spécifiques.

- Enfin, dans la situation des auto-CSH ou d'immunothérapie CAR-T cells, où la lymphodéplétion B est la plus fréquente en raison du type de maladie sous-jacente (hémopathies lymphoïdes), la question de la stimulation vaccinale préalable à la cytophérèse mérite d'être posée.

Nos travaux montrent que la réponse vaccinale est étroitement liée aux paramètres de reconstitution immunitaire. Nous avons pu mettre en évidence une association significative entre la numération de LT CD4+ naïfs avant vaccination et la séroprotection hépatite B obtenue après 3 doses de vaccin combiné pédiatrique hexavalent.

Le suivi régulier de la numération des différentes sous-populations de LT est utile et souhaitable, tant la reconstitution de ces populations est indicative de la progression de la reconstitution immunitaire et liée au pronostic post-greffe, et pourrait être utilement complété par une caractérisation du phénotype des LB.

Dans ce contexte, plusieurs équipes ont souligné le caractère prédictif de l'avancée numérique de la reconstitution lymphocytaire B (CD19+) et/ou lymphocytaire T (en particulier des contingents naïfs) et du dosage pondéral d'IgG et/ou A, vis-à-vis de la réponse vaccinale humorale (207,241,245,252). Haynes et al. ont récemment publié les résultats de leur programme de revaccination individualisée, guidé par des critères principalement quantitatifs de reconstitution immunitaire, chez des enfants receveurs de greffe de CSH (n=112) : des taux excellents de séroprotection étaient obtenus pour D, T, rubéole (respectivement 100%) et Hib (98%), au prix cependant d'une revaccination débutée environ 8 mois plus tard que recommandé (244). En revanche, cette stratégie de revaccination ne permettait pas d'améliorer de façon significative les taux de séroprotection obtenus après vaccination contre le VZV (25% après une dose), la rougeole (76% après une dose de ROR), et, dans une moindre mesure, contre l'hépatite B (87%) (244). La supériorité d'une telle conduite à tenir sur un programme de revaccination « universel » reste à démontrer par des essais cliniques prospectifs randomisés contrôlés à large échelle (196).

Au-delà de la mesure statique d'une *quantité* d'effecteurs, un outil mesurant la *fonctionnalité* immunitaire « globale » (par opposition aux IFA spécifiques d'un antigène donné), pourrait permettre de mieux cerner les interactions entre cellules immunitaires et possiblement de prédire la réponse vaccinale.

Afin d'approcher la fonctionnalité immunitaire, nous avons choisi d'étudier la réponse à la stimulation par un mitogène ubiquitaire (PHA). La capacité de réponse à la PHA était caractérisée dans notre cohorte par une importante hétérogénéité interindividuelle et progressait entre la première visite (autour de 6 mois post-greffe) et la deuxième visite (autour de 13 mois post-greffe). Cette grande hétérogénéité de réponse à la PHA après allo-CSH a été précédemment rapportée par Sato et al. (281). Nous n'avons pas mis en évidence de lien significatif entre la réponse à la PHA à l'initiation de la revaccination et la réponse humorale à la vaccination D, T, Hib et HBV, ce qui est possiblement lié à un manque de puissance statistique. L'équipe du Memorial Sloan Kettering Cancer Center (New York, Etats-Unis) a, quant à elle, rapporté que la capacité de prolifération lymphocytaire en réponse à la PHA pouvait, en association à d'autres critères quantitatifs de reconstitution immunitaire, contribuer à prédire la réponse au VPC-7 ou au vaccin contre le SARS-CoV-2 (207,241).

De façon plus générale, une réponse lymphocytaire T abaissée, déduite du niveau de sécrétion d'IFN- γ après stimulation par la PHA, a été associée dans une cohorte prospective de receveurs d'allo-CSH (n=73) à une moindre probabilité de survie globale (282). Néanmoins, la « fonction immunitaire » ne saurait être réduite à la prolifération lymphocytaire et/ou à la sécrétion d'IFN- γ en réponse à une stimulation mitogène indifférenciée. Différents phénotypes de réponses lymphocytaires T dysfonctionnelles ont été décrits – exhaustion, anergie et sénescence – tous caractérisés par une capacité de prolifération lymphocytaire réduite mais se distinguant par l'expression de divers marqueurs de surface, molécules de co-inhibition et par leurs profils transcriptomiques (283). Le phénotype d'exhaustion a par exemple été associé au risque de rechute de leucémie aiguë myéloblastique après allo-CSH (284).

D'autres outils mesurant la fonctionnalité immunitaire « globale » ont été proposés dans divers contextes d'immunodépression.

Parmi les IFA sur sang total commercialisés, citons le test ImmuKnow® (Eurofins-Viracor), quantifiant l'adénosine triphosphate intracellulaire dans les LT CD4+ après stimulation par la PHA, et le QuantiFERON Monitor® (QIAGEN), mesurant la sécrétion d'IFN- γ après stimulation par un cocktail de deux stimulants de l'immunité innée (resiquimod, agoniste des TLR-7/-8) et adaptative (anticorps anti-CD3). Le test ImmuKnow®, approuvé par la FDA (pour *U.S. Food and Drug Administration*) pour estimer la fonction immunitaire après transplantation d'organe solide, pourrait aider à prédire le risque de rejet ou d'infection et aider à l'adaptation du niveau

d'immunosuppression pharmacologique en conséquence (285,286). Le test QuantiFERON Monitor® avait également des performances encourageantes pour prédire le risque de rejet ou d'infection dans des cohortes de transplantés d'organes solides (287–290). Une étude prospective a évalué le test QuantiFERON Monitor® dans le contexte spécifique de l'allo-CSH (n=40), indiquant une valeur prédictive de ce test vis-à-vis du risque d'infection, notamment à CMV, et suggérant son utilité pour adapter les prophylaxies anti-infectieuses après allo-CSH (291). Sa valeur prédictive de la réponse vaccinale après allo-CSH n'a pas été étudiée à ce jour.

Avoir accès à des outils simples, utilisables en routine (donc idéalement sur sang total, par opposition aux PBMC), informatifs sur le niveau d'immunodépression (« *the net state of immunosuppression* ») d'un individu donné à un moment donné permettant d'établir une cartographie immunitaire, constitue le « *Graal* » des cliniciens prenant en charge des patients immunodéprimés. En ce qui concerne la capacité à prédire la réponse aux vaccinations, la limite des IFA commercialisés cités ci-dessus est représentée par le fait qu'ils évaluent principalement la réponse cellulaire T, sans donner d'informations spécifiques sur la capacité de réponse humorale, impliquant la voie des LB.

D'autres approches pour évaluer la fonctionnalité immunitaire « globale » ont été étudiées après allo-CSH. Gjaerde et al. ont récemment publié leur étude prospective descriptive de la fonction immunitaire au cours du premier mois après l'allo-CSH, estimée à partir du dosage de différentes cytokines après stimulation du sang total dans des tubes TruCulture® (RBM), révélant une grande hétérogénéité des receveurs d'allo-CSH (115). Le dispositif des tubes TruCulture®, permettant la stimulation d'un échantillon de sang total par divers stimulants d'intérêt en conditions standardisées, est particulièrement prometteur pour évaluer la fonction immunitaire, y compris la réponse vaccinale, au niveau protéomique (dosages de cytokines dans le surnageant) et transcriptomique (extraction d'ARN du culot cellulaire) (257,258). Nous avons analysé le profil transcriptomique d'un panel de 144 gènes liés à la réponse immunitaire après stimulation de sang total par du LPS ou du SEB en tube TruCulture®, et avons pu identifier trois profils transcriptomiques distincts parmi les receveurs d'allo-CSH de notre cohorte : un profil proche de celui de volontaires sains, un profil distinct pour les receveurs d'allo-CSH recevant une immunosuppression pharmacologique, et un profil intermédiaire (cf. manuscrit en cours de préparation, présenté en Annexe 1).

Une autre approche de la fonctionnalité immunitaire « globale » consiste à mesurer la virémie des TTV, virus appartenant au virome humain circulant dont la quantité détectée au niveau sanguin, étroitement liée au niveau d'immunodépression, pourrait être un biomarqueur

prédictif du pronostic des patients transplantés (292). Dans le cadre de l'étude VaccHemInf-FIGHT, nous avons quantifié la virémie TTV chez 41 receveurs d'allo-CSH lors de la première visite et avons pu mettre en évidence une corrélation inverse entre le niveau de virémie TTV et la capacité de prolifération lymphocytaire T en réponse à la PHA (cf. publication présentée en Annexe 2).

En plus d'outils informatifs sur la fonctionnalité immunitaire « globale », disposer d'outils de mesure de la réponse immunitaire cellulaire (type IGRA) capables de prédire le risque infectieux à un pathogène opportuniste donné (CMV, polyomavirus, *Pneumocystis jirovecii*, *Cryptococcus* spp etc.) ou la réponse à un vaccin spécifique, serait d'une grande aide pour les cliniciens pour permettre une gestion individualisée du risque infectieux.

Avant l'implantation de ce type d'IFA spécifique en routine clinique quotidienne, de nombreux paramètres doivent être optimisés : choix de l'échantillon biologique, idéalement sur sang total (simplicité) ; choix de l'antigène, suffisamment spécifique pour éviter les phénomènes de cross-réactivité ; optimisation des paramètres expérimentaux. Surtout, la pertinence clinique de ce type d'outil devra être validée dans de larges cohortes prospectives, permettant également de définir un seuil de positivité vis-à-vis de la prédiction d'un évènement clinique donné.

L'IGRA transcriptomique, tel que nous l'avons développé pour l'évaluation de la réponse cellulaire spécifique du VZV, nous semble être un outil prometteur en raison de sa simplicité de mise en œuvre.

Ses performances pronostiques devront être validées, et on peut imaginer de décliner cet outil pour d'autres pathogènes opportunistes. De plus, l'IGRA transcriptomique pourrait être utile à l'évaluation de la réponse cellulaire à un antigène vaccinal donné, à large échelle, évaluation actuellement limitée par la nécessité de recourir à des PBMC.

Enfin, au-delà de s'intéresser au nombre et à la fonction des différents types de cellules immunitaires, il paraît pertinent d'étudier la composition des microbiotes humains pour apprécier la fonctionnalité immunitaire.

En effet, comme indiqué précédemment, un nombre croissant d'études suggère un lien entre composition du microbiote intestinal et reconstitution immunitaire après greffe de CSH (44,46,86,90,91). De même, il existe de plus en plus de données suggérant que la composition du microbiote (intestinal, autre) influence l'immunogénicité des vaccins, ouvrant la perspective à des interventions thérapeutiques au niveau du microbiote pour améliorer l'efficacité vaccinale (293–295).

En somme, nos travaux :

- (i) confirment l'existence de phénomènes de transfert de cellules mémoire entre donneur et receveur d'allo-CSH ;**
- (ii) soulignent l'intérêt d'un immunomonitoring des receveurs d'allo-CSH, au niveau quantitatif mais aussi fonctionnel, vis-à-vis d'antigènes d'intérêt.**

Pris ensemble, ces données pourraient contribuer à optimiser les stratégies de prévention anti-infectieuse après allo-CSH, au niveau individuel.

Les principales forces de notre travail résident en la taille et la relative homogénéité des cohortes étudiées. L'originalité de notre deuxième étude consiste en l'approche translationnelle de la réponse vaccinale et anti-infectieuse et de la reconstitution immunitaire des receveurs d'allo-CSH qui pose les bases d'une approche que nous allons poursuivre sur le long terme au sein de notre collectif de recherche médico-scientifique. Plusieurs limites à notre travail doivent cependant être soulignées.

Premièrement, les conclusions du volet clinique de nos études concernant la réponse vaccinale se basent sur les résultats des dosages d'anticorps par sérologie. Or, chez le receveur d'allo-CSH, la réponse vaccinale peut être surestimée par les techniques de sérologie en raison de la persistance initiale des anticorps issus des réponses immunitaires à un vaccin et/ou pathogène rencontrés avant la greffe, le conditionnement n'ayant que peu d'impact sur les plasmocytes sécréteurs d'anticorps. De plus, près de deux tiers des patients inclus dans nos deux cohortes avaient reçu des IgIV avant la vaccination, et pour quelques rares patients, après vaccination. Nous ne pouvons donc affirmer avec certitude que les anticorps dosés après vaccination sont bien le reflet d'une réponse immunitaire au stimulus vaccinal, engageant LB et LT au niveau des centres germinatifs, même si l'augmentation des titres d'anticorps (GMFR) observés le suggère pour la majorité des patients. En particulier, la réponse vaccinale au vaccin de l'hépatite B est susceptible d'avoir été surestimée, comme le suggèrent les taux d'anticorps anti-HBs plus élevés chez les receveurs d'allo-CSH recevant des IgIV. De plus, définir la réponse vaccinale en termes de « séroprotection » est discutable, dans la mesure où nous nous sommes basés sur des corrélats de protection définis dans la population immunocompétente, dont la pertinence chez les personnes immunodéprimées n'a pas été évaluée.

Deuxièmement, le dosage des anticorps n'est possiblement pas intervenu au pic attendu de la réponse humorale, mais à environ 3 mois de la dernière dose vaccinale du schéma de primovaccination (plutôt que 4 semaines, temps de mesure usuel dans les essais vaccinaux),

temps de mesure qui peut être critiqué car pouvant conduire au contraire à une sous-estimation de la réponse humorale.

Enfin, afin de caractériser au mieux la réponse cellulaire à un antigène vaccinal donné, dans le cadre de futures études, nous prévoyons de recourir à des ELISpot T et B plutôt qu'à la technique de prolifération lymphocytaire, qui, au-delà d'être fastidieuse, s'est avérée sujette à des aléas techniques et des difficultés d'interprétation. Le dosage d'IFN- γ dans les surnageants de PBMC stimulés ne donne pas d'indication sur le type cellulaire produisant l'IFN- γ , information qui pourrait être utilement tirée de techniques complémentaires de type ICS, caractérisant simultanément le type cellulaire et sa fonctionnalité. De plus, les IFA que nous avons employés n'explorent pas la réponse cellulaire B, pourtant primordiale au cours de la réponse vaccinale, mais uniquement la réponse cellulaire T, qui participe à la réponse immunitaire T-dépendante aux antigènes vaccinaux protéiques.

V. Conclusion et perspectives

Ce travail, qui a porté sur plus de 200 receveurs d'allo-CSH au total, est un des plus vastes dans le domaine de la vaccination après allo-CSH, apportant une importante contribution au corps d'évidence sous-tendant les recommandations vaccinales spécifiques chez ces patients, dont une réactualisation est prévue dans les années à venir.

Le vaccin combiné pédiatrique, contenant les valences D et Ca fortement dosées, est adapté à la revaccination des adultes receveurs d'allo-CSH en cours de reconstitution immunitaire. Cette formulation est bien tolérée et permet d'obtenir une (très) bonne réponse aux valences D, T et Hib chez les adultes receveurs d'allo-CSH, lorsque le schéma de primovaccination est débuté entre 6 et 12 mois post-greffe. Eu égard à l'impact des caractéristiques hématologiques sur l'immunogénicité vaccinale, et à la situation d'extrême immunodépression suivie d'une reconstitution immunitaire progressive qui caractérise ces patients, la recommandation française d'une dose de rappel à distance des trois premières doses vaccinales semble pertinente pour assurer une protection vaccinale efficace et durable. Nos données suggèrent en revanche de dissocier la vaccination hépatite B des valences D, T, P, Ca et Hib, et d'utiliser des schémas vaccinaux contre l'hépatite B adaptés à l'âge et à l'état d'immunodépression de ces patients.

L'exploitation des données de l'étude VacHemInf-FIGHT se poursuit en ce qui concerne la réponse sérologique à long terme au vaccin combiné pédiatrique et la réponse à la vaccination antipneumococcique.

Nous rejoignons de précédents appels de la communauté médicale à mettre en place de larges études longitudinales ou registres multicentriques dédiés à la documentation de l'efficacité et de la tolérance vaccinale dans cette population d'immunodéprimés. Des données robustes sont nécessaires pour identifier précisément les déterminants de la réponse vaccinale, envisager une optimisation des stratégies vaccinales et préciser la nécessité et les modalités de rappels vaccinaux pour entretenir la mémoire immunitaire à long terme. Au-delà de la mesure du titre d'anticorps spécifiques à intervalles réguliers au cours du suivi, le développement d'outils évaluant la mémoire immunitaire, utilisables idéalement en routine, est souhaitable.

Dans un avenir proche, nous prévoyons d'étudier les vaccins vivants atténués (ROR, VZV) après greffe de CSH, pour lesquels la couverture vaccinale est trop faible en raison d'un manque de données d'immunogénicité et de sécurité d'emploi. La mise à disposition en France et l'intégration aux recommandations vaccinales du vaccin contre le zona inactivé sous-

unitaire recombinant nous semble hautement souhaitable, tant le zona est responsable d'une morbidité importante chez les patients immunodéprimés. L'avènement des nouvelles plateformes vaccinales promet la mise au point de vaccins efficaces contre des pathogènes responsables d'une importante morbi-mortalité après allo-CSH mais pour lesquels il n'existe pas à ce jour de vaccin efficace (VRS, CMV etc.) ou contre des pathogènes pour lesquels les stratégies vaccinales actuelles sont insuffisantes (virus influenza etc.).

Enfin, il existe à l'évidence un transfert de cellules immunitaires mémoire à partir du donneur qui pourrait être opportunément mis à profit par la vaccination des donneurs intrafamiliaux, dans un contexte d'augmentation des greffes haplo-identiques, et ouvre la voie à une optimisation des stratégies vaccinales dans une approche personnalisée.

Une meilleure prévention des complications infectieuses chez les receveurs d'allo-CSH passera enfin par la mise au point d'outils performants d'immunomonitoring. Notre vision est qu'à l'avenir, la caractérisation précise des réponses humorale et cellulaire à des antigènes vaccinaux ou microbiens, en fonction de données quantitatives et fonctionnelles (protéomique, transcriptomique etc.) de reconstitution immunitaire, devrait aboutir à l'identification de signatures immunitaires prédictives de la réponse à un stimulus vaccinal et/ou microbien. Ces outils de médecine de précision et personnalisée pourraient bénéficier à l'ensemble des patients immunodéprimés, population toujours croissante, pour améliorer les stratégies d'immunoprophylaxie vaccinale et la gestion des prophylaxies anti-infectieuses non vaccinales, et contribuer ainsi à la diminution de la morbi-mortalité infectieuse.

VI. Bibliographie

1. Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, Basak GW, de la Cámara R, Corbacioglu S, et al. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and trends over 30 years. *Bone Marrow Transplant*. 2021 Jul;56(7):1651–64.
2. Osgood EE, Riddle MC, Mathews TJ. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report. *Ann Intern Med*. 1939 Aug;13(2):357–67.
3. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957 Sep 12;257(11):491–6.
4. Granot N, Storb R. History of hematopoietic cell transplantation: challenges and progress. *Haematologica*. 2020 Oct 9;105(12):2716–29.
5. Bach F, Albertini R, Joo P, Anderson J, Bortin M. BONE-MARROW TRANSPLANTATION IN A PATIENT WITH THE WISKOTT-ALDRICH SYNDROME. *The Lancet*. 1968 Dec 28;292(7583):1364–6.
6. Gatti R, Meuwissen H, Allen H, Hong R, Good R. IMMUNOLOGICAL RECONSTITUTION OF SEX-LINKED LYMPHOPENIC IMMUNOLOGICAL DEFICIENCY. *The Lancet*. 1968 Dec 28;292(7583):1366–9.
7. Thomas E, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, et al. Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N Engl J Med*. 1975 Apr 17;292(16):832–43.
8. Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, et al. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med*. 1975 Apr 24;292(17):895–902.
9. Graw RG, Lohrmann HP, Bull MI, Decter J, Herzig GP, Bull JM, et al. Bone-marrow transplantation following combination chemotherapy immunosuppression (B.A.C.T.) in patients with acute leukemia. *Transplant Proc*. 1974 Dec;6(4):349–54.
10. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1990 [Internet]. NobelPrize.org. [cited 2022 Apr 20]. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1990/summary/>
11. Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J*. 1956 Sep 15;2(4993):626–7.
12. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M, Devries MJ, et al. SUCCESSFUL ALLOGENIC BONE MARROW TRANSPLANTATION IN MAN: CHIMERISM, INDUCED SPECIFIC TOLERANCE AND POSSIBLE ANTI-LEUKEMIC EFFECTS. *Blood*. 1965 Feb;25:179–96.
13. Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res*. 1965 Oct;25(9):1525–31.
14. Niederwieser D, Baldomero H, Bazuaye N, Bupp C, Chaudhri N, Corbacioglu S, et al. One and a half million hematopoietic stem cell transplants: continuous and differential improvement in worldwide access with the use of non-identical family donors. *Haematologica*. 2022 May 1;107(5):1045–53.
15. Agence de la Biomédecine. Activité nationale de greffe de CSH, 2020 [Internet]. [cited 2022 Jun 26]. Available from: <https://rams.agence-biomedecine.fr/activite-nationale-de-greffe-de-csh-0>

16. Goldsmith SR, Ghobadi A, DiPersio JF. Hematopoietic Cell Transplantation and CAR T-Cell Therapy: Complements or Competitors? *Front Oncol.* 2020;10:608916.
17. Bortin MM. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation.* 1970 Jun;9(6):571–87.
18. Penack O, Peczynski C, Mohty M, Yakoub-Agha I, Styczynski J, Montoto S, et al. How much has allogeneic stem cell transplant–related mortality improved since the 1980s? A retrospective analysis from the EBMT. *Blood Adv.* 2020 Dec 17;4(24):6283–90.
19. Hahn T, McCarthy PL, Hassebroek A, Bredeson C, Gajewski JL, Hale GA, et al. Significant improvement in survival after allogeneic hematopoietic cell transplantation during a period of significantly increased use, older recipient age, and use of unrelated donors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2013 Jul 1;31(19):2437–49.
20. Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorrow ML, Boeckh M, et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2010 Nov 25;363(22):2091–101.
21. Auletta J.J., Kou J., Chen M., Shaw B.E. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR US summary slides - HCT trends and survival data, 2021 [Internet]. [cited 2022 Apr 21]. Available from: <https://www.cibmtr.org/ReferenceCenter/SlidesReports/SummarySlides/pages/index.aspx>
22. Wingard JR, Majhail NS, Brazauskas R, Wang Z, Sobocinski KA, Jacobsohn D, et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2011 Jun 1;29(16):2230–9.
23. Majhail NS, Tao L, Bredeson C, Davies S, Dehn J, Gajewski JL, et al. Prevalence of Hematopoietic Cell Transplant Survivors in the United States. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2013 Oct;19(10):1498–501.
24. Bhatia S, Dai C, Landier W, Hageman L, Wu J, Schlichting E, et al. Trends in Late Mortality and Life Expectancy After Allogeneic Blood or Marrow Transplantation Over 4 Decades: A Blood or Marrow Transplant Survivor Study Report. *JAMA Oncol.* 2021 Nov 1;7(11):1626–34.
25. Geddes M, Storek J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007 Jun 1;20(2):329–48.
26. Storek J. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation - its relation to the contents of the graft. *Expert Opin Biol Ther.* 2008 May;8(5):583–97.
27. Storek J, Geddes M, Khan F, Huard B, Helg C, Chalandon Y, et al. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin Immunopathol.* 2008 Dec;30(4):425–37.
28. Bosch M, Khan FM, Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Hematol.* 2012 Jul;19(4):324–35.
29. Zimmerli W, Zarth A, Gratwohl A, Speck B. Neutrophil function and pyogenic infections in bone marrow transplant recipients. *Blood.* 1991 Jan 15;77(2):393–9.

30. Sosa R, Weiden PL, Storb R, Syrotuck J, Thomas ED. Granulocyte function in human allogeneic marrow graft recipients. *Exp Hematol*. 1980 Nov;8(10):1183–9.
31. Ramaprasad C, Pouch S, Pitrak DL. Neutrophil function after bone marrow and hematopoietic stem cell transplant. *Leuk Lymphoma*. 2010 May;51(5):756–67.
32. de Koning C, Plantinga M, Besseling P, Boelens JJ, Nierkens S. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Children. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Feb 1;22(2):195–206.
33. Bartelink IH, Belitser SV, Knibbe CAJ, Danhof M, de Pagter AJ, Egberts TCG, et al. Immune Reconstitution Kinetics as an Early Predictor for Mortality using Various Hematopoietic Stem Cell Sources in Children. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Feb 1;19(2):305–13.
34. Ando T, Tachibana T, Tanaka M, Suzuki T, Ishiyama Y, Koyama S, et al. Impact of graft sources on immune reconstitution and survival outcomes following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Adv*. 2020 Jan 28;4(2):408–19.
35. Ando T, Suzuki T, Ishiyama Y, Koyama S, Tachibana T, Tanaka M, et al. Impact of Cytomegalovirus Reactivation and Natural Killer Reconstitution on Outcomes after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Single-Center Analysis. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2020 Jan;26(1):171–7.
36. Bühlmann L, Buser AS, Cantoni N, Gerull S, Tichelli A, Gratwohl A, et al. Lymphocyte subset recovery and outcome after T-cell replete allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2011 Oct;46(10):1357–62.
37. Booth C, Lawson S, Veys P. The current role of T cell depletion in paediatric stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2013;162(2):177–90.
38. Dekker L, de Koning C, Lindemans C, Nierkens S. Reconstitution of T Cell Subsets Following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Cancers*. 2020 Jul 20;12(7):E1974.
39. Minculescu L, Marquart HV, Ryder LP, Andersen NS, Schjoedt I, Friis LS, et al. Improved Overall Survival, Relapse-Free-Survival, and Less Graft-vs.-Host-Disease in Patients With High Immune Reconstitution of TCR Gamma Delta Cells 2 Months After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2019;10:1997.
40. Moss P, Rickinson A. Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2005 Jan;5(1):9–20.
41. Mackall CL, Bare CV, Granger LA, Sharrow SO, Titus JA, Gress RE. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J Immunol*. 1996 Jun 15;156(12):4609–16.
42. Toubert A, Glauzy S, Douay C, Clave E. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again. *Tissue Antigens*. 2012 Feb;79(2):83–9.
43. 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*. 2016;7:507.

44. Miltiados O, Waters NR, Andrlová H, Dai A, Nguyen CL, Burgos da Silva M, et al. Early intestinal microbial features are associated with CD4 T-cell recovery after allogeneic hematopoietic transplant. *Blood*. 2022 May 5;139(18):2758–69.
45. Yanir A, Schulz A, Lawitschka A, Nierkens S, Eyrich M. Immune Reconstitution After Allogeneic Haematopoietic Cell Transplantation: From Observational Studies to Targeted Interventions. *Front Pediatr*. 2021;9:786017.
46. Andrlová H, van den Brink MRM, Markey KA. An Unconventional View of T Cell Reconstitution After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Oncol*. 2020;10:608923.
47. Storek J, Dawson MA, Storer B, Stevens-Ayers T, Maloney DG, Marr KA, et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood*. 2001 Jun 1;97(11):3380–9.
48. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology E-Book. 8th Edition. Elsevier Health Sciences; 2014. 547 p.
49. Quinnan GV, Kirmani N, Rook AH, Manischewitz JF, Jackson L, Moreschi G, et al. Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med*. 1982 Jul 1;307(1):7–13.
50. Khandelwal P, Lane A, Chaturvedi V, Owsley E, Davies SM, Marmer D, et al. Peripheral Blood CD38 Bright CD8+ Effector Memory T Cells Predict Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2015 Jul;21(7):1215–22.
51. Waller EK, Logan BR, Fei M, Lee SJ, Confer D, Howard A, et al. Kinetics of immune cell reconstitution predict survival in allogeneic bone marrow and G-CSF-mobilized stem cell transplantation. *Blood Adv*. 2019 Aug 13;3(15):2250–63.
52. Storek J, Joseph A, Espino G, Dawson MA, Douek DC, Sullivan KM, et al. Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2001 Dec 15;98(13):3505–12.
53. Wils EJ, Holt B van der, Broers AEC, Sluijs SJP van, Gratama JW, Braakman E, et al. Insufficient recovery of thymopoiesis predicts for opportunistic infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Haematologica*. 2011 Dec 1;96(12):1846–54.
54. Matsuoka K ichi, Kim HT, McDonough S, Bascug G, Warshauer B, Koreth J, et al. Altered regulatory T cell homeostasis in patients with CD4+ lymphopenia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest*. 2010 May;120(5):1479–93.
55. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, Kilical Y, Savani BN, Zeilah J, et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood*. 2006 Aug 15;108(4):1291–7.
56. Magenau JM, Qin X, Tawara I, Rogers CE, Kitko C, Schlough M, et al. Frequency of CD4(+)CD25(hi)FOXP3(+) regulatory T cells has diagnostic and prognostic value as a biomarker for acute graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2010 Jul;16(7):907–14.

57. Li Q, Zhai Z, Xu X, Shen Y, Zhang A, Sun Z, et al. Decrease of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. *Leuk Res.* 2010 Sep;34(9):1158–68.
58. Williams KM, Gress RE. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008 Sep;21(3):579–96.
59. van der Maas NG, Berghuis D, van der Burg M, Lankester AC. B Cell Reconstitution and Influencing Factors After Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children. *Front Immunol.* 2019;10:782.
60. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, Green A, Perdrix A, Boyer O, et al. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2008 Apr;127(1):14–25.
61. Bemark M, Holmqvist J, Abrahamsson J, Mellgren K. Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation - revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes. *Clin Exp Immunol.* 2012 Jan;167(1):15–25.
62. Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, et al. Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood.* 2004 Dec 1;104(12):3647–54.
63. Weller S, Descatoire M. [IgM+IgD+CD27+ B cells in human: an essential role in the protection against encapsulated bacteria]. *Med Sci MS.* 2015 Jul;31(6–7):647–53.
64. Storek J, Witherspoon RP, Storb R. Reconstitution of Membrane IgD– (mIgD–) B Cells After Marrow Transplantation Lags Behind the Reconstitution of mIgD+ B Cells. *Blood.* 1997 Jan 1;89(1):350–1.
65. Scarselli A, Di Cesare S, Capponi C, Cascioli S, Romiti ML, Di Matteo G, et al. Longitudinal Evaluation of Immune Reconstitution and B-cell Function After Hematopoietic Cell Transplantation for Primary Immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2015 May;35(4):373–83.
66. Abdel-Azim H, Elshoury A, Mahadeo KM, Parkman R, Kapoor N. Humoral Immune Reconstitution Kinetics after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children: A Maturation Block of IgM Memory B Cells May Lead to Impaired Antibody Immune Reconstitution. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2017 Sep;23(9):1437–46.
67. D’Orsogna LJ, Wright MP, Krueger RG, McKinnon EJ, Buffery SI, Witt CS, et al. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients Have Defects of Both Switched and IgM Memory B Cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Jul 1;15(7):795–803.
68. van Tol MJ, Gerritsen EJ, de Lange GG, van Leeuwen AM, Jol-van der Zijde CM, Oudeman-Gruber NJ, et al. The origin of IgG production and homogeneous IgG components after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 1996 Jan 15;87(2):818–26.

69. Mielcarek M, Leisenring W, Torok-Storb B, Storb R. Graft-versus-host disease and donor-directed hemagglutinin titers after ABO-mismatched related and unrelated marrow allografts: evidence for a graft-versus-plasma cell effect. *Blood*. 2000 Aug 1;96(3):1150–6.
70. Gerritsen EJ, van Tol MJ, Lankester AC, van der Weijden-Ragas CP, Jol-van der Zijde CM, Oudemans-Gruber NJ, et al. Immunoglobulin levels and monoclonal gammopathies in children after bone marrow transplantation. *Blood*. 1993 Dec 1;82(11):3493–502.
71. Zeiser R, Sarantopoulos S, Blazar BR. B-cell targeting in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2018 Mar 29;131(13):1399–405.
72. Sale GE, Alavaikko M, Schaefers KM, Mahan CT. Abnormal CD4:CD8 ratios and delayed germinal center reconstitution in lymph nodes of human graft recipients with graft-versus-host disease (GVHD): an immunohistological study. *Exp Hematol*. 1992 Sep;20(8):1017–21.
73. Moens L, Wuyts M, Meyts I, De Boeck K, Bossuyt X. Human memory B lymphocyte subsets fulfill distinct roles in the anti-polysaccharide and anti-protein immune response. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Oct 15;181(8):5306–12.
74. Glas AM, van Montfort EH, Storek J, Green EG, Drissen RP, Bechtold VJ, et al. B-cell-autonomous somatic mutation deficit following bone marrow transplant. *Blood*. 2000 Aug 1;96(3):1064–9.
75. Cuthbert RJ, Iqbal A, Gates A, Toghil PJ, Russell NH. Functional hyposplenism following allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Pathol*. 1995 Mar 1;48(3):257–9.
76. Le Goff M, Jaffuel S. Splénectomie : risque infectieux et prévention. *Lett Infect*. 2018 Aug;XXXIII(4):5.
77. Krueztzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter HH, et al. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med*. 2003 Apr 7;197(7):939–45.
78. Engelhard D, Cordonnier C, Shaw PJ, Parkalli T, Guenther C, Martino R, et al. Early and late invasive pneumococcal infection following stem cell transplantation: a European Bone Marrow Transplantation survey. *Br J Haematol*. 2002 May;117(2):444–50.
79. Kumar D, Humar A, Plevneshi A, Siegal D, Franke N, Green K, et al. Invasive pneumococcal disease in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: a decade of prospective population-based surveillance. *Bone Marrow Transplant*. 2008 Apr;41(8):743–7.
80. Corre E, Carmagnat M, Busson M, Latour RP de, Robin M, Ribaud P, et al. Long-term immune deficiency after allogeneic stem cell transplantation: B-cell deficiency is associated with late infections. *Haematologica*. 2010 Jun 1;95(6):1025–9.
81. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplant Recipients: A Global Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2009 Oct;15(10):1143–238.
82. Giebink GS, Warkentin PI, Ramsay NK, Kersey JH. Titers of antibody to pneumococci in allogeneic bone marrow transplant recipients before and after vaccination with pneumococcal vaccine. *J Infect Dis*. 1986 Oct;154(4):590–6.

83. Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, Agura E, Hill BJ, Smogorzewska M, et al. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2001 Mar 1;97(5):1458–66.
84. Castermans E, Hannon M, Dutrieux J, Humblet-Baron S, Seidel L, Cheynier R, et al. Thymic recovery after allogeneic hematopoietic cell transplantation with non-myeloablative conditioning is limited to patients younger than 60 years of age. *Haematologica*. 2011 Feb 1;96(2):298–306.
85. Heesters BA, Myers RC, Carroll MC. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jul;14(7):495–504.
86. Peled JU, Gomes ALC, Devlin SM, Littmann ER, Taur Y, Sung AD, et al. Microbiota as Predictor of Mortality in Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med*. 2020 Feb 27;382(9):822–34.
87. Rashidi A, Kaiser T, Holtan SG, Weisdorf DJ, Khoruts A, Staley C. Pre-transplant recovery of microbiome diversity without recovery of the original microbiome. *Bone Marrow Transplant*. 2019 Jul;54(7):1115–7.
88. Zhou W, Longmate J, Lacey SF, Palmer JM, Gallez-Hawkins G, Thao L, et al. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood*. 2009 Jun 18;113(25):6465–76.
89. Itzykson R, Robin M, Moins-Teisserenc H, Delord M, Busson M, Xhaard A, et al. Cytomegalovirus shapes long-term immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2015 Jan;100(1):114–23.
90. Bejanyan N, Rashidi A. A gut-graft axis mediated by microbiota. *Blood*. 2022 May 5;139(18):2727–8.
91. Fiorenza S, Turtle CJ. Associations between the Gut Microbiota, Immune Reconstitution, and Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Immunometabolism*. 2021;3(1):e210004.
92. Szabolcs P, Park KD, Reese M, Marti L, Broadwater G, Kurtzberg J. Coexistent naïve phenotype and higher cycling rate of cord blood T cells as compared to adult peripheral blood. *Exp Hematol*. 2003 Aug;31(8):708–14.
93. Arakawa-Hoyt J, Dao MA, Thiemann F, Hao QL, Ertl DC, Weinberg KI, et al. The number and generative capacity of human B lymphocyte progenitors, measured in vitro and in vivo, is higher in umbilical cord blood than in adult or pediatric bone marrow. *Bone Marrow Transplant*. 1999 Dec;24(11):1167–76.
94. Chung B, Barbara-Burnham L, Barsky L, Weinberg K. Radiosensitivity of thymic interleukin-7 production and thymopoiesis after bone marrow transplantation. *Blood*. 2001 Sep 1;98(5):1601–6.
95. van den Brink MRM, Velardi E, Perales MA. Immune reconstitution following stem cell transplantation. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2015;2015:215–9.

96. Bosch M, Dhadda M, Hoegh-Petersen M, Liu Y, Hagel LM, Podgorny P, et al. Immune Reconstitution After Antithymocyte Globulin-Conditioned Hematopoietic Cell Transplantation. *Cytotherapy*. 2012 Nov;14(10):1258–75.
97. Törlén J, Gaballa A, Remberger M, Mörk LM, Sundberg B, Mattsson J, et al. Effect of Graft-versus-Host Disease Prophylaxis Regimens on T and B Cell Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2019 Jun;25(6):1260–8.
98. Makanga DR, Guillaume T, Willem C, Legrand N, Gagne K, Cesbron A, et al. Posttransplant Cyclophosphamide and Antithymocyte Globulin versus Posttransplant Cyclophosphamide as Graft-versus-Host Disease Prophylaxis for Peripheral Blood Stem Cell Haploidentical Transplants: Comparison of T Cell and NK Effector Reconstitution. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2020 Sep 1;205(5):1441–8.
99. Müller AMS, Linderman JA, Florek M, Miklos D, Shizuru JA. Allogeneic T cells impair engraftment and hematopoiesis after stem cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 17;107(33):14721–6.
100. Clave E, Busson M, Douay C, Peffault de Latour R, Berrou J, Rabian C, et al. Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2009 Jun 18;113(25):6477–84.
101. Hilgendorf I, Mueller-Hilke B, Kundt G, Holler E, Hoffmann P, Edinger M, et al. The lack of memory B cells including T cell independent IgM+ IgD+ memory B cells in chronic graft-versus host disease is associated with susceptibility to infection. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2012 Jan;25(1):87–96.
102. Suessmuth Y, Mukherjee R, Watkins B, Koura DT, Finstermeier K, Desmarais C, et al. CMV reactivation drives posttransplant T-cell reconstitution and results in defects in the underlying TCR β repertoire. *Blood*. 2015 Jun 18;125(25):3835–50.
103. Shono Y, Docampo MD, Peled JU, Perobelli SM, Velardi E, Tsai JJ, et al. Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. *Sci Transl Med*. 2016 May 18;8(339):339ra71.
104. Boelens JJ, Hosszu KK, Nierkens S. Immune Monitoring After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Toward Practical Guidelines and Standardization. *Front Pediatr*. 2020;8:454.
105. Bertaina A, Abraham A, Bonfim C, Cohen S, Purtill D, Ruggeri A, et al. An ISCT Stem Cell Engineering Committee Position Statement on Immune Reconstitution: the importance of predictable and modifiable milestones of immune reconstitution to transplant outcomes. *Cytotherapy*. 2022 Apr;24(4):385–92.
106. Bejanyan N, Brunstein CG, Cao Q, Lazaryan A, Luo X, Curtsinger J, et al. Delayed immune reconstitution after allogeneic transplantation increases the risks of mortality and chronic GVHD. *Blood Adv*. 2018 Apr 24;2(8):909–22.
107. de Koning C, Prockop S, van Roessel I, Kernan N, Klein E, Langenhorst J, et al. CD4+ T-cell reconstitution predicts survival outcomes after acute graft-versus-host-disease: a dual-center validation. *Blood*. 2021 Feb 11;137(6):848–55.

108. van Roessel I, Prockop S, Klein E, Boulad F, Scaradavou A, Spitzer B, et al. Early CD4+ T cell reconstitution as predictor of outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cytotherapy*. 2020 Sep;22(9):503–10.
109. Admiraal R, Chiesa R, Lindemans CA, Nierkens S, Bierings MB, Versluijs AB, et al. Leukemia-free survival in myeloid leukemia, but not in lymphoid leukemia, is predicted by early CD4+ reconstitution following unrelated cord blood transplantation in children: a multicenter retrospective cohort analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2016 Oct;51(10):1376–8.
110. Admiraal R, de Koning CCH, Lindemans CA, Bierings MB, Wensing AMJ, Versluys AB, et al. Viral reactivations and associated outcomes in the context of immune reconstitution after pediatric hematopoietic cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Dec;140(6):1643-1650.e9.
111. de Koning C, Langenhorst J, van Kesteren C, Lindemans CA, Huitema ADR, Nierkens S, et al. Innate Immune Recovery Predicts CD4+ T Cell Reconstitution after Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2019 Apr;25(4):819–26.
112. Hattori N, Saito B, Sasaki Y, Shimada S, Murai S, Abe M, et al. Status of Natural Killer Cell Recovery in Day 21 Bone Marrow after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Predicts Clinical Outcome. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2018 Sep;24(9):1841–7.
113. Mensen A, Ochs C, Stroux A, Wittenbecher F, Szyska M, Imberti L, et al. Utilization of TREC and KREC quantification for the monitoring of early T- and B-cell neogenesis in adult patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Transl Med*. 2013 Aug 14;11:188.
114. Naik S, Vasileiou S, Aguayo-Hiraldo P, Mukhi S, Sasa G, Martinez C, et al. Toward Functional Immune Monitoring in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2020 May;26(5):911–9.
115. Gjaerde LK, Brooks PT, Andersen NS, Friis LS, Kornblit B, Petersen SL, et al. Functional immune reconstitution early after allogeneic haematopoietic cell transplantation: A comparison of pre- and post-transplantation cytokine responses in stimulated whole blood. *Scand J Immunol*. 2021 Jul;94(1):e13042.
116. Mellgren K, Nierop AFM, Abrahamsson J. Use of Multivariate Immune Reconstitution Patterns to Describe Immune Reconstitution after Allogeneic Stem Cell Transplantation in Children. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2019 Oct;25(10):2045–53.
117. 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*. 2018;9:2367.
118. Boccard M, Albert-Vega C, Mouton W, Durieu I, Brengel-Pesce K, Venet F, et al. [Functional immunoassays in the setting of infectious risk and immunosuppressive therapy of non-HIV immunocompromised patients]. *Rev Med Interne*. 2020 Aug;41(8):545–51.
119. Wagner-Drouet E, Teschner D, Wolschke C, Janson D, Schäfer-Eckart K, Gärtner J, et al. Standardized monitoring of cytomegalovirus-specific immunity can improve risk stratification of recurrent cytomegalovirus reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2021;106(2):363–74.

120. Stern L, McGuire H, Avdic S, Rizzetto S, Fazekas de St Groth B, Luciani F, et al. Mass Cytometry for the Assessment of Immune Reconstitution After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2018;9:1672.
121. Robin M, Porcher R, De Castro Araujo R, de Latour RP, Devergie A, Rocha V, et al. Risk Factors for Late Infections after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation from a Matched Related Donor. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Nov 1;13(11):1304–12.
122. Servais S, Lengline E, Porcher R, Carmagnat M, Peffault de Latour R, Robin M, et al. Long-Term Immune Reconstitution and Infection Burden after Mismatched Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Apr;20(4):507–17.
123. Sy A, Chanson D, Berano Teh J, Wong FL, Nakamura R, Dadwal S, et al. Late-occurring infections in a contemporary cohort of hematopoietic cell transplantation survivors. *Cancer Med*. 2021 May;10(9):2956–66.
124. Atilla E, Atilla PA, Bozdağ SC, Demirer T. A review of infectious complications after haploidentical hematopoietic stem cell transplantations. *Infection*. 2017 Aug 1;45(4):403–11.
125. Styczynski J, Czyzewski K, Wysocki M, Gryniewicz-Kwiatkowska O, Kolodziejczyk-Gietka A, Salamowicz M, et al. Increased risk of infections and infection-related mortality in children undergoing haematopoietic stem cell transplantation compared to conventional anticancer therapy: a multicentre nationwide study. *Clin Microbiol Infect*. 2016 Feb;22(2):179.e1-179.e10.
126. Esquirol A, Pascual MJ, Kwon M, Pérez A, Parody R, Ferra C, et al. Severe infections and infection-related mortality in a large series of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with post-transplant cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant*. 2021 Oct;56(10):2432–44.
127. Foord AM, Cushing-Haugen KL, Boeckh MJ, Carpenter PA, Flowers MED, Lee SJ, et al. Late infectious complications in hematopoietic cell transplantation survivors: a population-based study. *Blood Adv*. 2020 Apr 14;4(7):1232–41.
128. Chow EJ, Cushing-Haugen KL, Cheng GS, Boeckh M, Khera N, Lee SJ, et al. Morbidity and Mortality Differences Between Hematopoietic Cell Transplantation Survivors and Other Cancer Survivors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2017 Jan 20;35(3):306–13.
129. Gratwohl A, Brand R, Frasson F, Rocha V, Niederwieser D, Reusser P, et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Sep 5;36(9):757–69.
130. Malard F, Chevallier P, Guillaume T, Delaunay J, Riolland F, Harousseau JL, et al. Continuous Reduced Nonrelapse Mortality after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Single-Institution's Three Decade Experience. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Aug;20(8):1217–23.
131. Martin PJ, Counts GW, Appelbaum FR, Lee SJ, Sanders JE, Deeg HJ, et al. Life expectancy in patients surviving more than 5 years after hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Feb 20;28(6):1011–6.
132. Wingard JR, Hsu J, Hiemenz JW. Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infection risks and epidemiology. *Infect Dis Clin North Am*. 2010 Jun;24(2):257–72.

133. Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies [Internet]. 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019 [cited 2022 May 15]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553942/>
134. Gil L. Infections after stem cell transplantation [Internet]. EBMT, Lisbon, Portugal. 2018 [cited 2022 May 15]. Available from: https://www.ebmt.org/sites/default/files/2018-05/Infections%20after%20H SCT_Lidia%20Gil_EBMT%202018%20DM.pdf
135. Teira P, Battiwalla M, Ramanathan M, Barrett AJ, Ahn KW, Chen M, et al. Early cytomegalovirus reactivation remains associated with increased transplant-related mortality in the current era: a CIBMTR analysis. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2427–38.
136. Boeckh M, Nichols WG. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood*. 2004 Mar 15;103(6):2003–8.
137. Bergeron A, Porcher R, Sulahian A, de Bazelaire C, Chagnon K, Raffoux E, et al. The strategy for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis should depend on both the underlying condition and the leukocyte count of patients with hematologic malignancies. *Blood*. 2012 Feb 23;119(8):1831–7; quiz 1956.
138. Torda A, Chong Q, Lee A, Chen S, Dodds A, Greenwood M, et al. Invasive pneumococcal disease following adult allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2014 Oct 1;16(5):751–9.
139. Koc Y, Miller KB, Schenkein DP, Griffith J, Akhtar M, DesJardin J. Varicella zoster virus infections following allogeneic bone marrow transplantation: frequency, risk factors, and clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transpl J Am Soc Blood Marrow Transpl*. 2000;6(1):44–9.
140. Sheshadri A, Chemaly RF, Alousi AM, Shah PK, Rondon G, Bashoura L, et al. Pulmonary Impairment after Respiratory Viral Infections Is Associated with High Mortality in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *Biol Blood Marrow Transpl J Am Soc Blood Marrow Transpl*. 2019 Apr;25(4):800–9.
141. 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)*. 2006 Sep;85(5):278–87.
142. Versluys AB, Rossen JWA, van Ewijk B, Schuurman R, Bierings MB, Boelens JJ. Strong Association between Respiratory Viral Infection Early after Hematopoietic Stem Cell Transplantation and the Development of Life-Threatening Acute and Chronic Alloimmune Lung Syndromes. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2010 Jun 1;16(6):782–91.
143. Erard V, Chien JW, Kim HW, Nichols WG, Flowers ME, Martin PJ, et al. Airflow Decline after Myeloablative Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: The Role of Community Respiratory Viruses. *J Infect Dis*. 2006 Jun 15;193(12):1619–25.
144. Bucaneve G. Fluoroquinolone prophylaxis in neutropenic patients. 1st European Conference on Infections in Leukemia. [Internet]. 2005 [cited 2022 Jun 28]. Available from: https://www.ecil-leukaemia.com/images/resources/2005/2_ECIL1_2005_Fluoroquinolones_G_Bucaneve.pdf

145. Mikulska M, Averbuch D, Tissot F, Cordonnier C, Akova M, Calandra T, et al. Fluoroquinolone prophylaxis in haematological cancer patients with neutropenia: ECIL critical appraisal of previous guidelines. *J Infect.* 2018 Jan;76(1):20–37.
146. Mikulska M, Cordonnier C. Fluoroquinolone prophylaxis during neutropenia: what can we expect nowadays? *Clin Microbiol Infect.* 2018 Jul 1;24(7):678–9.
147. Jamani K, MacDonald J, Lavoie M, Williamson TS, Brown CB, Chaudhry A, et al. Zoster prophylaxis after allogeneic hematopoietic cell transplantation using acyclovir/valacyclovir followed by vaccination. *Blood Adv.* 2016 Dec 13;1(2):152–9.
148. 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).* 2020 Jan;107(1):S1–6.
149. Ljungman P, de la Camara R, Robin C, Crocchiolo R, Einsele H, Hill JA, et al. Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis.* 2019 Aug;19(8):e260–72.
150. Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, et al. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med.* 2017 Dec 21;377(25):2433–44.
151. Maertens JA, Girmenia C, Brüggemann RJ, Duarte RF, Kibbler CC, Ljungman P, et al. European guidelines for primary antifungal prophylaxis in adult haematology patients: summary of the updated recommendations from the European Conference on Infections in Leukaemia. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Dec 1;73(12):3221–30.
152. Maertens J, Cesaro S, Maschmeyer G, Einsele H, Donnelly JP, Alanio A, et al. ECIL guidelines for preventing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(9):2397–404.
153. Gajurel K, Dhakal R, Montoya JG. Toxoplasma prophylaxis in haematopoietic cell transplant recipients: a review of the literature and recommendations. *Curr Opin Infect Dis.* 2015 Aug;28(4):283–92.
154. Sullivan KM, Storek J, Kopecky KJ, Jocom J, Longton G, Flowers M, et al. A controlled trial of long-term administration of intravenous immunoglobulin to prevent late infection and chronic graft-vs.-host disease after marrow transplantation: clinical outcome and effect on subsequent immune recovery. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 1996 Feb;2(1):44–53.
155. Raanani P, Gafter-Gvili A, Paul M, Ben-Bassat I, Leibovici L, Shpilberg O. Immunoglobulin prophylaxis in hematological malignancies and hematopoietic stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Oct 8;(4):CD006501.
156. Compagno N, Malipiero G, Cinetto F, Agostini C. Immunoglobulin replacement therapy in secondary hypogammaglobulinemia. *Front Immunol.* 2014;5:626.

157. Ohmoto A, Fuji S, Shultes KC, Savani BN, Einsele H. Controversies about immunoglobulin replacement therapy in HSCT recipients with hypogammaglobulinemia. *Bone Marrow Transplant.* 2022 Jun;57(6):874–80.
158. Clark AL, Pozotrigo M, Mathew S, Liu D, Prockop SE, Ruggiero JM, et al. Retrospective Evaluation of Palivizumab Efficacy and Safety for RSV Prophylaxis in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Patients: A Single Center Experience. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016 Mar 1;22(3):S161.
159. Conseil d'Orientation de la Stratégie Vaccinale. Recommandations pour la protection des personnes sévèrement immunodéprimées contre le Covid-19 (Vaccination et prophylaxie primaire) [Internet]. 2021 [cited 2022 May 26]. Available from: https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/cosv_-_recommandations_pour_la_protection_des_personnes_severement_immunodeprimees_-_19_novembre_2021.pdf
160. Majhail NS, Rizzo JD, Lee SJ, Aljurf M, Atsuta Y, Bonfim C, et al. Recommended Screening and Preventive Practices for Long-term Survivors after Hematopoietic Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2012 Mar;47(3):337–41.
161. Battiwalla M, Tichelli A, Majhail NS. Long-Term Survivorship after Hematopoietic Cell Transplantation: Roadmap for Research and Care. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2017 Feb;23(2):184–92.
162. Li Volti S, Mauro L, Di Gregorio F, Romeo MA, Lupo L, Pizzarelli G, et al. Immune status and immune response to diphtheria-tetanus and polio vaccines in allogeneic bone marrow-transplanted thalassemic patients. *Bone Marrow Transplant.* 1994 Aug;14(2):225–7.
163. Parkkali T, Ruutu T, Stenvik M, Kuronen T, Käyhty H, Hovi T, et al. Loss of protective immunity to polio, diphtheria and Haemophilus influenzae type b after allogeneic bone marrow transplantation. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 1996 May;104(5):383–8.
164. Parkkali T, Olander RM, Ruutu T, Vuontela K, Volin L, Eskola J, et al. A randomized comparison between early and late vaccination with tetanus toxoid vaccine after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant.* 1997 May;19(9):933–8.
165. Ljungman P, Aschan J, Gustafsson B, Lewensohn-Fuchs I, Winiarski J, Ringdén O. Long-term immunity to poliovirus after vaccination of allogeneic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2004 Dec;34(12):1067–9.
166. Garcia Garrido HM, van Aalst M, Schinkel J, Koen G, Defoer JM, Hazenberg MD, et al. Early loss of immunity against measles following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol.* 2019 Oct;94(10):E270–2.
167. Kawamura K, Wada H, Nakasone H, Akahoshi Y, Kawamura S, Takeshita J, et al. Immunity and Vaccination Against Measles, Mumps, and Rubella in Adult Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Transplant Cell Ther.* 2021 May;27(5):436.e1-436.e8.
168. 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 Jun 1;19(6):e200–12.

169. Pergam SA, Englund JA, Kamboj M, Gans HA, Young JAH, Hill JA, et al. Preventing Measles in Immunosuppressed Cancer and Hematopoietic Cell Transplantation Patients: A Position Statement by the American Society for Transplantation and Cellular Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2019 Nov;25(11):e321–30.
170. HCSP. Vaccination des personnes immunodéprimées ou aspléniques. Recommandations actualisées. [Internet]. Paris: Haut Conseil de la Santé Publique; 2014 Nov [cited 2019 Nov 6]. Available from: <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=504>
171. Rubin LG, Levin MJ, Ljungman P, Davies EG, Avery R, Tomblyn M, et al. 2013 IDSA clinical practice guideline for vaccination of the immunocompromised host. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2014 Feb;58(3):309–18.
172. Muhsen IN, Aljurf M, Wingard JR, Poland GA, Komanduri KV, Whitaker JA, et al. Vaccinating donors for hematopoietic cell transplantation: A systematic review and future perspectives. *Vaccine*. 2018 Oct 1;36(41):6043–52.
173. Parkkali T, Käyhty H, Hovi T, Olander RM, Roivainen M, Volin L, et al. A randomized study on donor immunization with tetanus-diphtheria, Haemophilus influenzae type b and inactivated poliovirus vaccines to improve the recipient responses to the same vaccines after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Feb;39(3):179–88.
174. Storek J, Dawson MA, Lim LCL, Burman BE, Stevens-Ayers T, Viganego F, et al. Efficacy of donor vaccination before hematopoietic cell transplantation and recipient vaccination both before and early after transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Feb;33(3):337–46.
175. Lausen BF, Hougs L, Schejbel L, Heilmann C, Barington T. Human memory B cells transferred by allogeneic bone marrow transplantation contribute significantly to the antibody repertoire of the recipient. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Mar 1;172(5):3305–18.
176. Ilan Y, Nagler A, Shouval D, Ackerstein A, Or R, Kapelushnik J, et al. Development of antibodies to hepatitis B virus surface antigen in bone marrow transplant recipient following treatment with peripheral blood lymphocytes from immunized donors. *Clin Exp Immunol*. 1994 Aug;97(2):299–302.
177. Kumar D, Chen MH, Welsh B, Siegal D, Cobos I, Messner HA, et al. A randomized, double-blind trial of pneumococcal vaccination in adult allogeneic stem cell transplant donors and recipients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2007 Dec 15;45(12):1576–82.
178. Harris AE, Styczynski J, Bodge M, Mohty M, Savani BN, Ljungman P. Pretransplant vaccinations in allogeneic stem cell transplantation donors and recipients: an often-missed opportunity for immunoprotection? *Bone Marrow Transplant*. 2015 Jul;50(7):899–903.
179. Leclerc M, Redjoul R, Le Bouter A, Beckerich F, Robin C, Parinet V, et al. Impact of donor vaccination on recipient response to early SARS-CoV-2 mRNA vaccination after allogeneic HSCT. *Lancet Haematol*. 2022 May;9(5):e318–21.
180. Majeed A, Harris Z, Brucks E, Hinchman A, Farooqui AA, Tariq MJ, et al. Revisiting Role of Vaccinations in Donors, Transplant Recipients, Immunocompromised Hosts, Travelers, and Household Contacts of Stem Cell Transplant Recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020 Feb;26(2):e38–50.

181. Conrad A, Alcazer V, Valour F, Ader F, Lyon HEMINF Study Group. Vaccination post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: what is feasible? *Expert Rev Vaccines*. 2018 Apr;17(4):299–309.
182. Agence de la Santé Publique du Canada. Immunisation des sujets immunodéprimés : Guide canadien d'immunisation [Internet]. 2022 [cited 2022 May 28]. Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/publications/vie-saine/guide-canadien-immunisation-partie-3-vaccination-populations-particulieres/page-8-immunisation-sujets-immunodeprimes.html>
183. BC Centre for Disease Control. Immunization of Adult Hematopoietic Stem Cell Transplant (HSCT) Recipients [Internet]. 2020 [cited 2022 May 28]. Available from: <http://www.bccdc.ca/resource-gallery/Documents/Guidelines%20and%20Forms/Guidelines%20and%20Manuals/Epid/CD%20Manual/Chapter%20-%20Imms/Part2/HSCT.pdf>
184. Australian Government, Department of Health. Recommendations for revaccination after haematopoietic stem cell transplant in children and adults [Internet]. The Australian Immunisation Handbook. [cited 2022 May 28]. Available from: <https://immunisationhandbook.health.gov.au/resources/tables/table-recommendations-for-revaccination-after-haematopoietic-stem-cell-transplant-in-children-and-adults>
185. Laws HJ, Baumann U, Bogdan C, Burchard G, Christopeit M, Hecht J, et al. Impfen bei Immundefizienz: Anwendungshinweise zu den von der Ständigen Impfkommission empfohlenen Impfungen. (III) Impfen bei hämatologischen und onkologischen Erkrankungen (antineoplastische Therapie, Stammzelltransplantation), Organtransplantation und Asplenie. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 2020 May;63(5):588–644.
186. Office fédéral de la santé publique (OFSP) et Commission fédérale pour les vaccinations (CFV). Recommandations pour la vaccination des patients receveurs de cellules souches hématopoïétiques [Internet]. 2012 [cited 2022 May 28]. Available from: <https://www.infovac.ch/docs/public/fs/receveurs-de-cellules-souches-hematopoiétiques.pdf>
187. Meijer E, Goorhuis B, Hazenberg M, Schoordijk MCE. Revaccinatie programma Versie 7.0 [Internet]. *Vademecum Hematologie*. 2022 [cited 2022 May 28]. Available from: <https://vademecum.hematologie.nl/artikelen/allogene-hpc-transplantatie/revaccinatie-programma/>
188. Dyer G, Gilroy N, Brice L, Kabir M, Gottlieb D, Huang G, et al. A survey of infectious diseases and vaccination uptake in long-term hematopoietic stem cell transplant survivors in Australia. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc*. 2019 Apr;21(2):e13043.
189. Ryan AL, Kerr F, Gough H, Carter TL, Kotecha RS. Vaccine-preventable disease following allogeneic haematopoietic stem cell transplant in Western Australia. *J Paediatr Child Health*. 2019 Mar;55(3):343–8.
190. Danino D, Stanek JR, Rangarajan H, Ardura MI. Hospitalizations for vaccine-preventable infections among pediatric hematopoietic cell transplantation recipients in the first 5 years after transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2021 Nov;56(11):2656–63.
191. Gouveia-Alves F, Gouveia R, Ginani VC, Seber A, Kuramoto DA, Murad GFA, et al. Adherence and immune response to revaccination following hematopoietic stem cell transplantation at a

- pediatric onco-hematology reference center. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* 2018 Aug;20(4):e12903.
192. Lerchenfeldt SM, Cronin SM, Chandrasekar PH. Vaccination adherence in hematopoietic stem cell transplant patients: a pilot study on the impact of vaccination cards and reminder telephone calls. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* 2013 Dec;15(6):634–8.
 193. Wyplosz B, Fernandes J, Raguideau F, Leboucher C, Goussiaume G, Moïsi J. COVARISQ (estimation de la COuverture VAccinale des adultes à RISQues) : taux de vaccination des immunodéprimés en France en 2017. *Journ Natl Infect 2020 Poitiers [Internet].* 2020 Aug 22 [cited 2022 May 29]; Available from: <https://www.em-consulte.com/article/1383294/article/covarisq-estimation-de-la-couverture-vaccinale-des>
 194. Ljungman P. Infectious complications and vaccines. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2021 Dec 10;2021(1):587–91.
 195. Ariza-Heredia EJ, Gulbis AM, Stolar KR, Kebriaei P, Shah DP, McConn KK, et al. Vaccination guidelines after hematopoietic stem cell transplantation: practitioners' knowledge, attitudes, and gap between guidelines and clinical practice. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* 2014 Dec;16(6):878–86.
 196. Carpenter PA, Englund JA. Commentary: Is Immune Recovery-Based Post-Transplantation Vaccination in Children Better Than Time-Based Revaccination? *Transplant Cell Ther.* 2021 Apr;27(4):281–3.
 197. Roberts MB, Bak N, Wee LYA, Chhetri R, Yeung DT, Lewis I, et al. Clinical Effectiveness of Conjugate Pneumococcal Vaccination in Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2020 Feb;26(2):421–7.
 198. Miller PDE, Forster AS, de Silva TI, Leonard H, Anthias C, Mayhew M, et al. Sociodemographic and psychological determinants of influenza vaccine intention among recipients of autologous and allogeneic haematopoietic stem cell transplant: a cross-sectional survey of UK transplant recipients using a modified health belief model. *BMJ Open.* 2018 08;8(8):e021222.
 199. Gea-Banacloche J, Komanduri KV, Carpenter P, Paczesny S, Sarantopoulos S, Young JA, et al. National Institutes of Health Hematopoietic Cell Transplantation Late Effects Initiative: The Immune Dysregulation and Pathobiology Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017 Jun 1;23(6):870–81.
 200. Kennedy LB, Li Z, Savani BN, Ljungman P. Measuring Immune Response to Commonly Used Vaccinations in Adult Recipients of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2017 Oct;23(10):1614–21.
 201. Janssen M, Bruns A, Kuball J, Raijmakers R, van Baarle D. Vaccine Responses in Adult Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: A Comprehensive Review. *Cancers.* 2021 Dec 6;13(23):6140.
 202. Avanzini MA, Locatelli F, Dos Santos C, Maccario R, Lenta E, Oliveri M, et al. B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: functional immaturity and slow recovery of memory CD27+ B cells. *Exp Hematol.* 2005 Apr;33(4):480–6.
 203. Cordonnier C, Labopin M, Chesnel V, Ribaud P, De La Camara R, Martino R, et al. Randomized study of early versus late immunization with pneumococcal conjugate vaccine after allogeneic

- stem cell transplantation. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2009 May 15;48(10):1392–401.
204. Cordonnier C, Labopin M, Robin C, Ribaud P, Cabanne L, Chadelat C, et al. Long-term persistence of the immune response to antipneumococcal vaccines after Allo-SCT: 10-year follow-up of the EBMT-IDWP01 trial. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Jul;50(7):978–83.
205. Carpenter PA, Englund JA. How I vaccinate blood and marrow transplant recipients. *Blood*. 2016 Jun 9;127(23):2824–32.
206. Chou JF, Kernan NA, Prockop S, Heller G, Scaradavou A, Kobos R, et al. Safety and immunogenicity of the live attenuated varicella vaccine following T replete or T cell depleted related and unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation (alloHCT). *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2011 Nov;17(11):1708–13.
207. Tamari R, Politikos I, Knorr DA, Vardhana SA, Young JC, Marcello LT, et al. Predictors of Humoral Response to SARS-CoV-2 Vaccination after Hematopoietic Cell Transplantation and CAR T-cell Therapy. *Blood Cancer Discov*. 2021 Nov;2(6):577–85.
208. Langedijk AC, van Aalst M, Meek B, van Leeuwen EMM, Zeerleder S, Meijer E, et al. Long-term pneumococcal vaccine immunogenicity following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Vaccine*. 2019 Jan 14;37(3):510–5.
209. Robin C, Bahuaud M, Redjoul R, Jeljeli M, Leclerc M, Cabanne L, et al. Antipneumococcal Seroprotection Years After Vaccination in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2020 Nov 5;71(8):e301–7.
210. Piñana JL, Pérez A, Montoro J, Giménez E, Gómez MD, Lorenzo I, et al. Clinical Effectiveness of Influenza Vaccination After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Cross-sectional, Prospective, Observational Study. *Clin Infect Dis*. 2019 May 17;68(11):1894–903.
211. Engelhard D, Nagler A, Hardan I, Morag A, Aker M, Baciu H, et al. Antibody response to a two-dose regimen of influenza vaccine in allogeneic T cell-depleted and autologous BMT recipients. *Bone Marrow Transplant*. 1993 Jan;11(1):1–5.
212. Karras NA, Weeres M, Sessions W, Xu X, Defor T, Young JAH, et al. A randomized trial of one versus two doses of influenza vaccine after allogeneic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2013 Jan;19(1):109–16.
213. Natori Y, Humar A, Lipton J, Kim DD, Ashton P, Hoschler K, et al. A pilot randomized trial of adjuvanted influenza vaccine in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2017 Jul;52(7):1016–21.
214. Halasa NB, Savani BN, Asokan I, Kassim A, Simons R, Summers C, et al. Randomized Double-Blind Study of the Safety and Immunogenicity of Standard-Dose Trivalent Inactivated Influenza Vaccine versus High-Dose Trivalent Inactivated Influenza Vaccine in Adult Hematopoietic Stem Cell Transplantation Patients. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2016 Mar;22(3):528–35.
215. Chun JY, Kim K, Lee MK, Kang CK, Koh Y, Shin DY, et al. Immunogenicity and safety of a live herpes zoster vaccine in hematopoietic stem cell transplant recipients. *BMC Infect Dis*. 2021 Dec;21(1):1–7.

216. Bastidas A, de la Serna J, El Idrissi M, Oostvogels L, Quittet P, López-Jiménez J, et al. Effect of Recombinant Zoster Vaccine on Incidence of Herpes Zoster After Autologous Stem Cell Transplantation: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2019 Jul 9;322(2):123–33.
217. Baumrin E, Izaguirre NE, Bausk B, Feeley MM, Bay CP, Yang Q, et al. Safety and reactogenicity of the recombinant zoster vaccine after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood Adv*. 2021 Mar 23;5(6):1585–93.
218. Anderson TC. Use of Recombinant Zoster Vaccine in Immunocompromised Adults Aged ≥19 Years: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices — United States, 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2022 [cited 2022 Jun 5];71. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/71/wr/mm7103a2.htm>
219. Pabst C, Benning L, Liebers N, Janssen M, Caille L, Speer C, et al. Humoral Responses and Chronic GVHD Exacerbation after COVID-19 Vaccination Post Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Vaccines*. 2022 Feb 18;10(2):330.
220. Sherman AC, Desjardins M, Cheng CA, Bausk B, Izaguirre N, Zhou G, et al. SARS-CoV-2 mRNA Vaccines in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Immunogenicity and Reactogenicity. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2021 Nov 2;ciab930.
221. Shem-Tov N, Yerushalmi R, Danylesko I, Litachevsky V, Levy I, Olmer L, et al. Immunogenicity and safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in haematopoietic stem cell transplantation recipients. *Br J Haematol*. 2021 Oct 28;
222. Ram R, Hagin D, Kikozashvili N, Freund T, Amit O, Bar-On Y, et al. Safety and Immunogenicity of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine in Patients after Allogeneic HCT or CD19-based CART therapy-A Single-Center Prospective Cohort Study. *Transplant Cell Ther*. 2021 Sep;27(9):788–94.
223. Bergman P, Blennow O, Hansson L, Mielke S, Nowak P, Chen P, et al. Safety and efficacy of the mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 in five groups of immunocompromised patients and healthy controls in a prospective open-label clinical trial. *EBioMedicine*. 2021 Dec;74:103705.
224. Piñana JL, López-Corral L, Martino R, Montoro J, Vazquez L, Pérez A, et al. SARS-CoV-2-reactive antibody detection after SARS-CoV-2 vaccination in hematopoietic stem cell transplant recipients: Prospective survey from the Spanish Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cell Therapy Group. *Am J Hematol*. 2022 Jan 1;97(1):30–42.
225. Trunk AD, Shewan SK, Lee CJ, Parker CJ, Couriel DR. Chronic graft-versus-host disease exacerbation after SARS-CoV-2 vaccination. *Bone Marrow Transplant*. 2022 Mar;57(3):502–3.
226. Ali H, Ngo D, Aribi A, Arslan S, Dadwal S, Marcucci G, et al. Safety and Tolerability of SARS-CoV2 Emergency-Use Authorized Vaccines for Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Transplant Cell Ther*. 2021 Nov;27(11):938.e1-938.e6.
227. Cordonnier C, Labopin M, Chesnel V, Ribaud P, Camara RDL, Martino R, et al. Immune response to the 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine after the 7-valent conjugate vaccine in allogeneic stem cell transplant recipients: results from the EBMT IDWP01 trial. *Vaccine*. 2010 Mar 24;28(15):2730–4.

228. Issa NC, Marty FM, Gagne LS, Koo S, Verrill KA, Alyea EP, et al. Seroprotective Titers against 2009 H1N1 Influenza A Virus after Vaccination in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Mar 1;17(3):434–8.
229. Mohty B, Bel M, Vukicevic M, Nagy M, Levrat E, Meier S, et al. Graft-versus-host disease is the major determinant of humoral responses to the AS03-adjuvanted influenza A/09/H1N1 vaccine in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Haematologica*. 2011 Jun;96(6):896–904.
230. Dhédin N, Krivine A, Le Corre N, Mallet A, Lioure B, Bay JO, et al. Comparable humoral response after two doses of adjuvanted influenza A/H1N1pdm2009 vaccine or natural infection in allogeneic stem cell transplant recipients. *Vaccine*. 2014 Jan 23;32(5):585–91.
231. Roll D, Ammer J, Holler B, Salzberger B, Schweiger B, Jilg W, et al. Vaccination against pandemic H1N1 (2009) in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis. *Infection*. 2012 Apr;40(2):153–61.
232. Fukatsu Y, Nagata Y, Adachi M, Yagyu T, Ono T. Serum IgM levels independently predict immune response to influenza vaccine in long-term survivors vaccinated at >1 year after undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2017 May;105(5):638–45.
233. Linnik J, Syedbasha M, Kaltenbach HM, Vogt D, Hollenstein Y, Kaufmann L, et al. Association of host factors with antibody response to seasonal influenza vaccination in allogeneic hematopoietic stem cell transplant (HSCT) patients. *J Infect Dis*. 2021 Aug 20;jiab391.
234. Maillard A, Redjoul R, Klemencie M, Labussière Wallet H, Le Bourgeois A, D’Aveni M, et al. Antibody response after 2 and 3 doses of SARS-CoV-2 mRNA vaccine in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*. 2022 Jan 6;139(1):134–7.
235. Huang A, Cicin-Sain C, Pasin C, Epp S, Audigé A, Müller NJ, et al. Antibody Response to SARS-CoV-2 Vaccination in Patients following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Transplant Cell Ther*. 2022 Apr;28(4):214.e1-214.e11.
236. Plotkin SA. Correlates of Protection Induced by Vaccination. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Jul 1;17(7):1055–65.
237. Inaba H, Hartford CM, Pei D, Posner MJ, Yang J, Hayden RT, et al. Longitudinal analysis of antibody response to immunization in paediatric survivors after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2012 Jan;156(1):109–17.
238. Shah GL, Shune L, Purtill D, Devlin S, Lauer E, Lubin M, et al. Robust Vaccine Responses in Adult and Pediatric Cord Blood Transplantation Recipients Treated for Hematologic Malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2015 Dec;21(12):2160–6.
239. Patel SR, Ortín M, Cohen BJ, Borrow R, Irving D, Sheldon J, et al. Revaccination of children after completion of standard chemotherapy for acute leukemia. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2007 Mar 1;44(5):635–42.
240. Meerveld-Eggink A, van der Velden AMT, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA, Biesma DH, Rijkers GT. Antibody response to polysaccharide conjugate vaccines after nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2009 Dec;15(12):1523–30.

241. Pao M, Papadopoulos EB, Chou J, Glenn H, Castro-Malaspina H, Jakubowski AA, et al. Response to Pneumococcal (PNCRM7) and Haemophilus Influenzae Conjugate Vaccines (HIB) in Pediatric and Adult Recipients of an Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation (alloHCT). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Sep 1;14(9):1022–30.
242. Barra A, Cordonnier C, Preziosi MP, Intrator L, Hessel L, Fritzell B, et al. Immunogenicity of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine in allogeneic bone marrow recipients. *J Infect Dis*. 1992 Nov;166(5):1021–8.
243. Winkler J, Tittlbach H, Schneider A, Buchstaller C, Mayr A, Vasova I, et al. Measuring the cellular memory B cell response after vaccination in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol*. 2020 Aug;99(8):1895–906.
244. Haynes AS, Curtis DJ, Campbell K, Giller RH, Quinones RR, Verneris MR, et al. An Immune Recovery-Based Revaccination Protocol for Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Revaccination Outcomes Following Pediatric HSCT. *Transplant Cell Ther*. 2021 Apr;27(4):317–26.
245. Sattler C, Hoffmann P, Herzberg PY, Weber D, Holler B, Fehn U, et al. Primary vaccination in adult patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation - A single center retrospective efficacy analysis. *Vaccine*. 2021 Jul 30;39(33):4742–50.
246. Jaffe D, Papadopoulos EB, Young JW, O'reilly RJ, Prockop S, Kernan NA, et al. Immunogenicity of recombinant hepatitis B vaccine (rHBV) in recipients of unrelated or related allogeneic hematopoietic cell (HC) transplants. *Blood*. 2006 Oct 1;108(7):2470–5.
247. Takahata M, Hashino S, Onozawa M, Shigematsu A, Sugita J, Fujimoto K, et al. Hepatitis B virus (HBV) reverse seroconversion (RS) can be prevented even in non-responders to hepatitis B vaccine after allogeneic stem cell transplantation: long-term analysis of intervention in RS with vaccine for patients with previous HBV infection. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc*. 2014 Oct;16(5):797–801.
248. Nishikawa K, Kimura K, Kanda Y, Sugiyama M, Kakihana K, Doki N, et al. A prospective trial of vaccine to prevent hepatitis B virus reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2020 Jul;55(7):1388–98.
249. Chaichotjinda K, Anurathapan U, Boonsathorn S, Chaisavaneeyakorn S, Treepongkaruna S, Techasaensiri C, et al. Immune responses to hepatitis B vaccination after hematopoietic stem cell transplantation in pediatric and young adult patients. *Clin Transplant*. 2020 Oct;34(10):e14024.
250. Launay O, van der Vliet D, Rosenberg AR, Michel ML, Piroth L, Rey D, et al. Safety and immunogenicity of 4 intramuscular double doses and 4 intradermal low doses vs standard hepatitis B vaccine regimen in adults with HIV-1: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2011 Apr 13;305(14):1432–40.
251. Lefebure AF, Verpooten GA, Couttenye MM, De Broe ME. Immunogenicity of a recombinant DNA hepatitis B vaccine in renal transplant patients. *Vaccine*. 1993;11(4):397–9.
252. Piekarska A, Wisniewski P, Lewandowski K, Gil L, Trzonkowski P, Bieniaszewska M, et al. Immune Status Against Hepatitis B in Patients After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation-Factors Affecting Early and Long-Lasting Maintenance of Protective Anti-HBs Titers. *Front Immunol*. 2020;11:586523.

253. Bosi A, De Majo E, Guidi S, Parri F, Saccardi R, Vannucchi AM, et al. Kinetics of anti-CMV antibodies after administration of intravenous immunoglobulins to bone marrow transplant recipients. *Haematologica*. 1990 Apr;75(2):109–12.
254. Rand KH, Houck H, Ganju A, Babington RG, Elfenbein GJ. Pharmacokinetics of cytomegalovirus specific IgG antibody following intravenous immunoglobulin in bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplant*. 1989 Nov;4(6):679–83.
255. Haeney M. Intravenous immune globulin in primary immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 1994 Jul;97 Suppl 1:11–5.
256. Mankarious S, Lee M, Fischer S, Pyun KH, Ochs HD, Oxelius VA, et al. The half-lives of IgG subclasses and specific antibodies in patients with primary immunodeficiency who are receiving intravenously administered immunoglobulin. *J Lab Clin Med*. 1988 Nov;112(5):634–40.
257. 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*. 2014 Mar 20;40(3):436–50.
258. 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 Sep 6;16(10):2777–91.
259. Laing KJ, Ouwendijk WJD, Koelle DM, Verjans GMGM. Immunobiology of Varicella-Zoster Virus Infection. *J Infect Dis*. 2018 Sep 22;218(suppl_2):S68–74.
260. Luby JP, Ramirez-Ronda C, Rinner S, Hull A, Vergne-Marini P. A longitudinal study of varicella-zoster virus infections in renal transplant recipients. *J Infect Dis*. 1977;Apr;135(4):659–63.
261. 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;May;153(5):840–7.
262. Wilson A, Sharp M, Koropchak CM, Ting SF, Arvin AM. Subclinical varicella-zoster virus viremia, herpes zoster, and T lymphocyte immunity to varicella-zoster viral antigens after bone marrow transplantation. *J Infect Dis*. 1992 Jan;165(1):119–26.
263. Asada H. VZV-specific cell-mediated immunity, but not humoral immunity, correlates inversely with the incidence of herpes zoster and the severity of skin symptoms and zoster-associated pain: The SHEZ study. *Vaccine*. 2019 Oct 16;37(44):6776–81.
264. 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*. 2009 Oct 1;200(7):1068–77.
265. Verjans GMGM, Hintzen RQ, van Dun JM, Poot A, Milikan JC, Laman JD, et al. Selective retention of herpes simplex virus-specific T cells in latently infected human trigeminal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 27;104(9):3496–501.
266. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 2009 Jan 29;457(7229):557–61.

267. Krawczyk A, Ackermann J, Goitowski B, Trenchel R, Ditschkowski M, Timm J, et al. Assessing the risk of CMV reactivation and reconstitution of antiviral immune response post bone marrow transplantation by the QuantiFERON-CMV-assay and real time PCR. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2018 Mar;99–100:61–6.
268. 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 Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2009 May;9(5):1214–22.
269. Otani N, Baba K, Okuno T. Interferon-gamma release assay: a simple method for detection of varicella-zoster virus-specific cell-mediated immunity. *J Immunol Methods*. 2009 Dec;31;351(1–2):71–4.
270. Hayashida K, Ozaki T, Nishimura N, Gotoh K, Funahashi K, Nakane K. Evaluation of varicella zoster virus-specific cell-mediated immunity by using an interferon- γ enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods*. 2015;(v;426:50–5).
271. Weinberg A, Canniff J, Roupheal N, Mehta A, Mulligan M, Whitaker JA, et al. Varicella-Zoster Virus-Specific Cellular Immune Responses to the Live Attenuated Zoster Vaccine in Young and Older Adults. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2017 Jul 15;199(2):604–12.
272. 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*. 2009 Oct 1;200(7):1068–77.
273. Suchin KR, Cassin M, Washko R, Nahass G, Berkson M, Stouch B, et al. Extracorporeal photochemotherapy does not suppress T- or B-cell responses to novel or recall antigens. *J Am Acad Dermatol*. 1999 Dec 1;41(6):980–6.
274. Drexler B, Buser A, Infanti L, Stehle G, Halter J, Holbro A. Extracorporeal Photopheresis in Graft-versus-Host Disease. *Transfus Med Hemotherapy*. 2020 Jun;47(3):214–25.
275. Hsieh A, Cortés B. Photophérèse extracorporelle. *Rev Med Suisse*. 2018;14:699–702.
276. Greinix HT, Pohlreich D, Kouba M, Körmöczy U, Lohmann I, Feldmann K, et al. Elevated Numbers of Immature/Transitional CD21– B Lymphocytes and Deficiency of Memory CD27+ B Cells Identify Patients with Active Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Feb;14(2):208–19.
277. Khoder A, Alsuliman A, Basar R, Sobieski C, Kondo K, Alousi AM, et al. Evidence for B Cell Exhaustion in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Front Immunol*. 2017;8:1937.
278. McManigle W, Youssef A, Sarantopoulos S. B cells in chronic graft-versus-host disease. *Hum Immunol*. 2019 Jun;80(6):393–9.
279. Zajac BA, West DJ, McAleer WJ, Scolnick EM. Overview of clinical studies with hepatitis B vaccine made by recombinant DNA. *J Infect*. 1986 Jul;13 Suppl A:39–45.
280. Harrison N, Grabmeier-Pfistershammer K, Graf A, Trapin D, Tauber P, Aberle JH, et al. Tick-Borne Encephalitis Specific Lymphocyte Response after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Predicts Humoral Immunity after Vaccination. *Vaccines*. 2021 Aug 15;9(8):908.

281. Sato T, Goto M, Ohbiki M, Goto T, Morishita T, Seto A, et al. Assessment of cellular response to mitogens in long-term allogeneic hematopoietic stem cell transplantation survivors. *Int J Hematol.* 2021 Dec;114(6):682–90.
282. Yong MK, Cameron PU, Slavin MA, Cheng AC, Morrissey CO, Bergin K, et al. Low T-Cell Responses to Mitogen Stimulation Predicts Poor Survival in Recipients of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol.* 2017;8:1506.
283. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.* 2015 Aug;15(8):486–99.
284. Noviello M, Manfredi F, Ruggiero E, Perini T, Oliveira G, Cortesi F, et al. Bone marrow central memory and memory stem T-cell exhaustion in AML patients relapsing after HSCT. *Nat Commun.* 2019 Mar 25;10(1):1065.
285. Ravaioli M, Neri F, Lazzarotto T, Bertuzzo VR, Di Gioia P, Stacchini G, et al. Immunosuppression Modifications Based on an Immune Response Assay: Results of a Randomized, Controlled Trial. *Transplantation.* 2015 Aug;99(8):1625–32.
286. Ling X, Xiong J, Liang W, Schroder PM, Wu L, Ju W, et al. Can immune cell function assay identify patients at risk of infection or rejection? A meta-analysis. *Transplantation.* 2012 Apr 15;93(7):737–43.
287. 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 Apr 17;66(9):1392–7.
288. Margeta I, Mareković I, Pešut A, Zelenika M, Dorotić M, Mrnjec I, et al. Evaluation of cell-mediated immune response by QuantiFERON Monitor Assay in kidney transplant recipients presenting with infective complications. *Medicine (Baltimore).* 2020 Jul 2;99(27):e21010.
289. 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.* 2021 Jun;23(3):e13550.
290. Sood S, Haifer C, Yu L, Pavlovic J, Churilov L, Gow PJ, et al. A novel immune function biomarker identifies patients at risk of clinical events early following liver transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 2017 Apr;23(4):487–97.
291. Douglas AP, Yu L, Sundararajan V, Szer J, Ritchie D, Slavin MA, et al. The QuantiFERON Monitor® assay is predictive of infection post allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* 2020 Jun;22(3):e13260.
292. Redondo N, Navarro D, Aguado JM, Fernández-Ruiz M. Viruses, friends, and foes: The case of Torque Teno Virus and the net state of immunosuppression. *Transpl Infect Dis.* 2022;24(2):e13778.
293. Lynn DJ, Benson SC, Lynn MA, Pulendran B. Modulation of immune responses to vaccination by the microbiota: implications and potential mechanisms. *Nat Rev Immunol.* 2022 Jan;22(1):33–46.
294. Gonçalves JIB, Borges TJ, de Souza APD. Microbiota and the Response to Vaccines Against Respiratory Virus. *Front Immunol.* 2022;13:889945.

295. Ciabattini A, Olivieri R, Lazzeri E, Medaglini D. Role of the Microbiota in the Modulation of Vaccine Immune Responses. *Front Microbiol.* 2019;10:1305.

VII. Annexes

L'étude de cohorte VaccHemInf-FIGHT a généré de nombreuses données dont l'analyse est en cours.

Deux autres articles ont d'ores et déjà été rédigés, l'un a été publié, l'autre manuscrit est en cours de resoumission :

- Le premier article, en cours de resoumission, présente l'intérêt d'une analyse transcriptomique de la fonctionnalité immunitaire post-allogreffe de CSH.
- Le deuxième article, publié dans *Viruses*, a étudié l'apport de la quantification de la charge virale sanguine des TTV comme marqueur de reconstitution immunitaire après allo-CSH.

1. Annexe 1 : Transcriptomic analysis reveals distinct profiles of functional immune reconstitution at six-months after allo-HSCT



Allogeneic – Adult

Distinct Immune Reconstitution Profiles Captured by Immune Functional Assays at 6 Months Post Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation

William Mouton^{1,2,a}, Anne Conrad^{3,4,5,a}, Vincent Alcazer^{6,7}, Mathilde Boccard^{1,3,4}, Maxime Bodinier¹, Guy Oriol¹, Fabien Subtil^{8,9}, Hélène Labussière-Wallet⁶, Sophie Ducastelle-Lepretre⁶, Fiorenza Barraco⁶, Marie Balsat⁶, Gaëlle Fossard⁶, Karen Brengel-Pesce¹, Florence Ader^{3,4,5,*}, Sophie Trouillet-Assant^{1,2}

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

² Virology and Human Pathology - Virpath Team, International Centre for Research in Infectiology (CIRI), Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, France

³ Legionella Pathogenesis Team, International Centre for Research in Infectiology (CIRI), Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, France

⁴ Infectious and Tropical Diseases Department, Hospices Civils de Lyon, Croix-Rousse Hospital, Lyon, France

⁵ Claude Bernard Lyon 1 University, Villeurbanne, France

⁶ Clinical Hematology Department, Hospices Civils de Lyon, Lyon Sud Hospital, Pierre-Bénite, France

⁷ LIB TEAM, International Centre for Research in Infectiology (CIRI), Oullins, France

⁸ Biostatistics Department, Hospices Civils de Lyon, Lyon France, Lyon 1 University, Villeurbanne, France

⁹ CNRS, Biometrics and Evolutionary Biology Laboratory UMR, Villeurbanne, France

Article history:

Received 20 July 2022

Accepted 27 October 2022

Key Words:

Hematopoietic stem cell transplantation
Allogeneic
Immune functional assay
Gene expression
Herpesviridae reactivation

A B S T R A C T

Immune reconstitution after allogeneic-hematopoietic-stem-cell transplantation (allo-HSCT) is a complex and individual process. In this cross-sectional study, whole-blood (WB) immune functional assay (IFA) was used to characterize immune function by assessing immune-related gene/pathway alterations. The usefulness of this tool in the context of infection, 6 months after transplantation, was evaluated. Sixty allo-HSCT recipients at 6 months after transplantation and 10 healthy volunteers (HV) were included. WB was stimulated in standardized TruCulture tubes using lipopolysaccharides and *Staphylococcal* enterotoxin B. Gene expression was quantified using a custom 144-gene panel using NanoString nCounter technology and analyzed using Ingenuity Pathway Analysis. The relationships between immune function and clinical characteristics, immune cell counts, and post-transplantation infections were assessed. Allo-HSCT recipients were able to activate similar networks of the innate and adaptive immune response compared to HV, with, nevertheless, a lower intensity. A reduced number and a lower expression of genes associated with immunoregulatory and inflammatory processes were observed in allo-HSCT recipients. The use of immunosuppressive treatments was associated with a protracted immune reconstitution revealed by transcriptomic immunoprofiling. No difference in immune cell counts was observed among patients receiving or not receiving immunosuppressive treatments using a large immunophenotyping panel. Moreover, the expression of a set of genes, including *CCL3/CCL4*, was significantly lower in patients with *Herpesviridae* reactivation (32%, 19/60), which once again was not identified using classical immune cell counts. Transcriptional IFA revealed the heterogeneity among allo-HSCT recipients with a reduced immune function, a result that could not be captured by circulating immune cell counts. This highlights the potential added value of this tool for the personalized care of immunocompromised patients.

© 2022 The American Society for Transplantation and Cellular Therapy. 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/>)

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a cellular therapy aiming at curing malignant and

nonmalignant hematological diseases or primary immunodeficiencies [1,2]. From an immunological point of view, allo-HSCT recipients are a complex and heterogeneous population who undergo a state of complete immunosuppression followed by an individual and gradual immune reconstitution. This dynamic process is routinely monitored by cell count measurements, mainly through TCD4⁺ and TCD8⁺ cell counts in clinical settings [3–8]. Several underlying conditions and post-transplantation

*Correspondence and reprint requests: Florence Ader, Département des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, 103 Grande-Rue de la Croix-Rousse, 69317, Lyon cedex 04, France.

E-mail address: florence.ader@chu-lyon.fr (F. Ader).

^a W.M. and A.C. are co-first authors.

complications such as graft-versus-host disease (GvHD) and associated immunosuppressive treatments can impact immune reconstitution and lead to immune deficiency and/or dysregulation. Protracted immune reconstitution is associated with an increased infectious risk that represents a major cause of morbidity and mortality [9–14].

A recent study found a 23.8% mortality rate related to infections, from a wide spectrum of infectious agents which can be specific to the post-transplant period [15]. The spectrum of infections after allo-HSCT appears to be related to the kinetics of immune reconstitution notably during the late phase post-engraftment where a close relationship is suggested between infections and the recovery of immune function [12]. In case of deficient or altered immune system, the reactivation of latent viruses mainly belonging to the *Herpesviridae* family (cytomegalovirus [CMV], human herpesvirus-6 [HHV-6], or Epstein-Barr virus [EBV]) may result in symptomatic infections that can lead to fatal complications [16–18].

In the post-transplantation time-course, a better comprehension of the relationship between immune cell function and the occurrence of infections would thus be essential. Despite the routine use of traditional biological markers, only limited information is available regarding the functionality of immune cells. Indeed, immune reconstitution is mainly monitored through static readouts such as quantitative cell counts or soluble/surface marker measurements that do not reflect functional alterations. An assessment using reproducible and standardized tools is thus needed [19–25].

The contribution of whole-blood immune functional assays (IFA) to characterize immune functionality has been assessed in healthy volunteers (HV) [26] and in septic patients [27]. To date, a single study has investigated pre- and post-allo-HSCT cytokine responses [28]. We intended to further describe the functionality of innate and adaptive immune cells using whole-blood IFA, combining transcriptomic and proteomic readouts. In this proof-of-concept study, we took advantage of the initiation of the vaccination schedule at 6 months after transplantation to differentially characterize the immune reconstitution of allo-HSCT recipients in comparison with HV.

The immune response of allo-HSCT recipients was hypothesized to be different than that of HV. This hypothesis led to 2 objectives: first, to get further insights of the heterogeneity of immune reconstitution, and second to assess immune profiles according to clinical characteristics and transplantation-related events, including GvHD. For that purpose, we used standardized whole-blood stimulation assays (TruCulture; Rules Based Medicine, Austin, TX) after stimulation by lipopolysaccharides (LPS), a toll-like receptor-4 and -2 ligand, which triggers the innate immunity [29,30], or *Staphylococcal* enterotoxin B (SEB), a superantigen binding simultaneously the major histocompatibility complex class II and the T cell receptor, initiating the adaptive response [31,32]. TruCulture has been described as a reliable monitoring tool, which enables the classification of inflammatory and host immune responses by evaluating the variance in poststimulation immune responses between healthy donors and patients [27,28].

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Sixty adult (≥ 18 years old) allo-HSCT recipients who underwent transplantation at the hematology department of the Lyon University Hospital (France) were included in the prospective, single-center cohort study “VacHemInF” between May 2018 and August 2020 [33] at 6 months after transplantation (interquartile interval [IQR], 5–8 months), before the initiation of the recommended vaccination schedule [34]. The exclusion criteria applied were post-transplantation relapse of the hematological underlying disease or death [33].

The cohort was approved by the regional ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Est V, Grenoble, France, number 69HCL17_0769) and is registered in ClinicalTrials.gov (NCT03659773). At inclusion, demographics (age, sex), hematological and transplantation-related characteristics (underlying disease, conditioning regimen, stem cell source, donor type), as well as post-transplantation characteristics (GvHD, immunosuppressive treatment, post-transplantation infections) were retrieved from medical records through an electronic case report form. All infectious episodes occurring either 14 days before or 14 days after blood sampling were retained, and no specific additional microbiological investigation was performed for the study. Regarding reactivations of *Herpesviridae*, whole-blood CMV and EBV DNA-emia was monitored at least weekly up to 100 days after transplantation, then monthly during the first year after transplantation, and on demand (as for HHV-6) in case of clinical symptoms compatible with viral disease. In the absence of consensual cutoff values for viral DNA-emia, viral reactivations were deemed significant and recorded in case of attributable symptoms or based on the viral load in the absence of symptoms (≥ 3 log copies IU/mL for CMV once or more, ≥ 3 log copies IU/mL for EBV twice or more, ≥ 4 log copies IU/mL for HHV-6 twice or more). CMV DNA-emia ≥ 3 log copies IU/mL prompted pre-emptive treatment, whereas EBV and HHV-6 reactivations were handled according to the rate of increase of EBV copy number or the presence of HHV-6 related clinical symptoms [35–38].

Concomitantly, 10 HV were recruited among donors at the Lyon Blood Bank Center (Etablissement Français du Sang) and were evaluated as a control group. According to the Etablissement Français du Sang standardized procedures for blood donation and the provisions of article R.1243–49, and following one of the French public health codes, a written non-opposition to the use of donated blood for research purposes was obtained from the HV. The personal data from the blood donors were anonymized before being transferred to our research laboratory. Regulatory authorizations for the handling and conservation of these samples were obtained from the regional ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Est II) and the French ministry of research (Ministère de l’Enseignement supérieur, de la Recherche et de l’Innovation, DC-2008–64).

Post-transplantation T-cell Immunophenotyping

Extensive immunophenotyping by flow cytometry on whole blood was performed at the immunology laboratory of the Lyon university hospital. Counts of white blood cells, polynuclear neutrophils, monocytes, natural killer cells, total T-cell, naive CD4⁺ and CD8⁺ (CD45RA⁺CCR7⁺) T cells, central memory (CD45RA⁺CCR7⁺) CD4⁺ and CD8⁺ T cells, effector memory (CD45RA⁺CCR7⁻) CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, differentiated memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cells (CD45RA⁺CCR7⁻) were determined (cells/ μ L) as previously described [33].

Immune Functional Assays: Truculture Stimulation

Blood from patients and HV was drawn on site, and heparinized whole-blood (1 mL) was subsequently distributed within 1.5 hours (± 30 minutes) after sampling into prewarmed, standardized, ready-to-use tubes (TruCulture) containing the medium alone (NUL) or the medium with LPS (100 ng/mL) or the medium with SEB (400 ng/mL). As previously described, tubes were then inserted into a dry block incubator and maintained at 37°C for 24 hours [26]. After incubation, cellular pellets were harvested and re-suspended in 2 mL TRI Reagent LS (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO), vortexed for 2 minutes, and rested for 10 minutes at room temperature before storage at -80°C .

RNA Extraction

For TruCulture cell pellet handling and RNA processing and detection, the protocol was carried out according to the study by Urrutia et al. [39]. Cell pellets from TruCulture stimulations kept in TRI Reagent LS (Sigma-Aldrich) were thawed under agitation. Before processing, thawed samples were spun in a centrifuge (3000g for 5 minutes at 4°C) to pellet cellular debris generated during the Trizol lysis. For extraction, a modified protocol of the NucleoSpin 96 RNA tissue kit (Macherey-Nagel) was followed using a vacuum system. Briefly, 600 μ L of clarified Trizol lysate was transferred to a tube preloaded with 900 μ L of 100% ethanol. The mixture was transferred into the columns, washed with buffers MW1 and MW2 ($\times 2$) and RNA was eluted using 30 μ L RNase-free water. Aliquots for gene expression analysis were prepared and frozen at -80°C until use. RNA concentration was estimated using the NanoDrop One spectrophotometer (Thermo Scientific, Swedesboro, NJ) according to the process provided by the manufacturer.

Gene Expression Analysis

The NanoString nCounter technology [40], a hybridization-based multiplex assay characterized by its amplification-free step, was used for mRNA detection of a 144-gene panel (Supplementary Table S1, online) designed with genes from a previous publication [39] and genes known to be crucial in the immune response. According to manufacturer’s instructions, 300 ng of

RNA were hybridized to the probes at 67°C for 18 hours using a thermocycler. After removal of excessive probes, samples were loaded into the nCounter Prep Station (NanoString Technologies, Seattle, WA) for purification and immobilization onto the internal surface of a sample cartridge for 2 to 3 hours. The sample cartridge was then transferred and imaged on the nCounter Digital Analyzer (NanoString Technologies) where color codes were counted and tabulated for the 144 genes. Data treatment and normalization were next performed using nSolver analysis software (version 4.0, NanoString technologies). Each sample was analyzed in a separate multiplexed reaction, each including 8 negative probes and 6 serial concentrations of positive control probes.

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

To do so, we calculated for all samples the background level as the median +3 standard deviations across the 6 negative probe counts (obtained threshold: 30). Every sample under the background level was fixed to this value. Next, we calculated for each sample the geometric mean of the positive probe counts. A scaling factor for a sample was a ratio of the geometric mean of the sample and the average across all geometric means. For each sample, we divided all gene counts by the corresponding scaling factor. To normalize for differences in RNA input we used the same method as in the positive control normalization, except that geometric means were calculated over 3 housekeeping genes (DECR1 (NM_001359.1), HPRT1 (NM_000194.1) and POLR2A (NM_000937.2)). The 3 housekeeping genes were selected using NormFinder, GeNorm, BestKeeper, and DeltaCT methods; an established approach for the identification of stable housekeeping genes within and between groups, from the 6 candidate genes included in the custom panel [41–44].

Gene Expression Interpretation

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

Biological network enrichment was performed using the “core analysis” function of the Ingenuity Pathway Analysis software (IPA, QIAGEN) by adding the list of DEG [False discovery rate FDR (adjusted $P < .05$ and $FC > 2$), with identifiers and corresponding expression values (FC)]. The Fisher’s exact test P value was used as a readout for the assessment of biological network activation. The different algorithms used have been previously described [45,46]. Activation score for each biological networks was calculated as previously described [47]; for details please refer to the supplementary methods.

Protein Detection

Interleukin (IL)-6, IL10, CXCL10 and interferon gamma (IFN- γ) protein from healthy volunteers and allo-HSCT recipients in TruCulture supernatant was quantified on Simple/Multi-plex cartridges (ProteinSimple, San Jose, CA) using ELLA nanofluidic system (Biotechnie, Minneapolis, MN), according to the manufacturers’ instructions. Results are expressed in pg/mL.

Statistical Analysis

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

Principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering was carried out using Partek Genomics Suite software (version 7.0; Partek Inc., St. Louis, MO). The analysis according to the administration of immunosuppressive treatments was conducted using Linear Discriminant Analysis applied on the 5 first component of the PCA to get 80% of the explained variability using “adegetnet” R package [48]. The impact on gene expression of clinical characteristics known to determine speed and quality of immune reconstitution (age, sex, underlying disease, parameters of T-cell reconstitution, parameters of allo-HSCT procedure, GvHD, ongoing immunosuppressive treatment) was

analyzed using Wilcoxon test [3,49]. Heatmap was generated by scaling and centering log10-transformed gene expressions, and the dendrogram was drawn based on hierarchical clustering analysis (Euclidean distance matrix with Ward’s method). Statistical analyses were conducted using R (version 3.6.2.). P values and adjusted P values (P adj) $< .05$ were considered significant.

RESULTS

Participant Characteristics

Overall, 60 patients who underwent allo-HSCT were included at a median (IQR) time of 6 (5–8) months after transplantation. Acute myeloid leukemia was the most common underlying disease (52%, $n = 31$). Before inclusion, manifestations of acute and chronic GvHD (aGvHD and cGvHD) were reported in 70% ($n = 42$) and 13% ($n = 8$) of allo-HSCT recipients, respectively. At the time of inclusion, 27% ($n = 16$) of patients had not experience any GvHD, 38% ($n = 23$) had a resolved GvHD, and 35% ($n = 21$) still presented an active GvHD, independently of the form (acute or chronic). A total of 32% ($n = 19$) of recipients were on immunosuppressive therapy (Table 1). Concomitantly, 10 HV were included, matched for age (median [IQR]: 49.0 [33.5–56] versus 44.5 [34–60] years for allo-HSCT; $P = .98$) and sex (sex ratio, 0.7 versus 1.3 for allo-HSCT, $P = .50$).

Allo-HSCT Recipients and HV are able to Activate Similar Biological Networks on SEB and LPS Whole-Blood Stimulation

First, an unsupervised analysis of the full gene-panel transcriptomic data using PCA showed a robust space aggregation of each experimental condition (i.e., NUL, SEB, and LPS stimulation) in both populations with an explained variance of 81.6% and 68.0% for HV and allo-HSCT recipients, respectively (Figure 1A,B). Combining the HV and allo-HSCT populations, the variance was mainly explained by stimulation (PC1 46.7%) and by the stimulant-related effect (PC2 14.8%; Figure 1C). Next, in both populations, the activation of biological networks represented by the top 5 activated canonical pathways, upstream regulators, and disease and functions upon SEB (Figure 1D) and LPS (Figure 1E) stimulation was assessed. Among the 15 biological networks described, 11 were induced both by LPS and SEB stimulation, among which 4 canonical pathways, 3 upstream regulators and 4 diseases and functions (Figure 1D,E). The other biological networks activated were stimulant-dependent. Complete results of the IPA analysis are available in supplementary data (Supplementary Data S1). Interestingly, the biological networks activated in HV were also activated in allo-HSCT recipients, suggesting that both stimulants induced similar canonical pathways in both populations, driven by common upstream regulators, and leading to the activation of similar diseases and biological functions. Taken together, these results suggest that allo-HSCT recipients are able to activate immune responses similarly to HV in response to stimulation, without taking into account activation levels.

Allo-HSCT Patients Harbor Alterations in Inflammation and Regulation Processes

We then evaluated the variation in global gene expression post-stimulation (full gene panel per stimulant). Upon SEB stimulation (Figure 2A), 97/138 (70.3%) and 84/138 (60.9%) genes were differentially expressed compared to the control condition, in HV and allo-HSCT recipients, respectively. After LPS stimulation (Figure 2B), 85/134 (64.9%) and 64/134 (47.8%) genes were differentially expressed in HV and allo-HSCT recipients, respectively. Of note, all genes differentially expressed

Table 1
Characteristics of Allo-HSCT Recipients

	Allo-HSCT recipients (n = 60)
Demographics	
Age (yr), median [IQR]	44.5 [34-60]
Male	34 (57%)
Time from transplantation, months, median [IQR]	6.6 [5.8-8.3]
Hematological and transplant-related characteristics	
Underlying hematological disease*	
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%)
CR before the engraftment	53 (88%)
Donor type	
Matched related donor	18 (30%)
Matched unrelated donor	23 (38%)
Mismatched unrelated donor	6 (10%)
Haploidentical donor	12 (20%)
Umbilical cord blood	1 (2%)
Stem cell source	
Peripheral blood cells	48 (80%)
Bone marrow	11 (18%)
Conditioning regimen	
MAC	22 (37%)
RIC	38 (63%)
TBI	18 (30%)
Donor and recipient CMV status before transplantation	
D+/R-	9 (15%)
D+/R+	21 (35%)
D-/R-	14 (23%)
D-/R+	16 (27%)
Donor and recipient EBV status before transplantation	
D+/R-	1 (2%)
D+/R+	52 (87%)
D-/R-	2 (3%)
D-/R+	5 (8%)
GvHD	
GvHD prophylaxis	
ATG	34 (57%)
Calcineurin inhibitors	59 (98%)
Mycophenolate mofetil	33 (55%)
Corticosteroids	0 (0%)
Methotrexate	14 (23%)
Post-transplantation cyclophosphamide	23 (38%)
History of GvHD between transplantation and inclusion, n (%)	
Acute GvHD	42 (70%)
Grade I	28
Grade II	12
Grade III	2
Chronic GvHD	8 (13)

(continued)

Table 1 (Continued)

	Allo-HSCT recipients (n = 60)
Grade I	3
Grade II	3
Grade III	2
GvHD status at inclusion	
No history of GvHD	16 (27%)
Resolved GvHD	23 (38%)
Active GvHD (acute or chronic)	21 (35%)
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-transplantation immunomodulatory therapy at inclusion	
IS therapy at inclusion#	19 (32%)
IVIIG infusion(s)	41 (68%)
Time since last IVIG infusion (mo), median [IQR]	4 [3-6]
DLI	8 (13%)

* Based on 2016 revisions of the World Health Organization classification of myeloid and lymphoid neoplasms; #Immunosuppressive therapies included ciclosporin (n = 9), tacrolimus (n = 4), corticosteroids (n = 8), and ruxolitinib (n = 3).

ATG indicates antithymocyte globulin; CM, central memory; CR, complete remission; D, donor; DM, differentiated memory; DLI, donor lymphocyte infusion; EM, effector memory; IVIG, intravenous immunoglobulins; MAC, myeloablative conditioning; NK, natural killer; NV, normal values; R, recipient; RIC, reduced-intensity conditioning; TBI, total body irradiation.

after LPS or SEB stimulation in allo-HSCT recipients were also differentially expressed in HV. These results highlight that the number of genes associated with innate or adaptive immune responses that are differentially expressed on stimulation is lower in the allo-HSCT population compared to HV. The complete list of gene expression per stimulant and individual are available in supplementary data (Supplementary Data S2).

Volcano plots were then used to identify the genes for which the expression differed significantly between both populations (FDR corrected P adj < .05; 2-FC threshold). Post-SEB stimulation (Figure 2C), 20/138 (14%) genes were significantly and differentially expressed between allo-HSCT recipients and HV; the expression of most of them (n = 18) was lower, and the 10 most impacted genes (squares) were involved in immunoregulatory and inflammatory processes (CCL20, CCL23, IL1A, IL1B, IL1RN, IL10, IL2, IFNG, SOCS3, and SPP1). On LPS

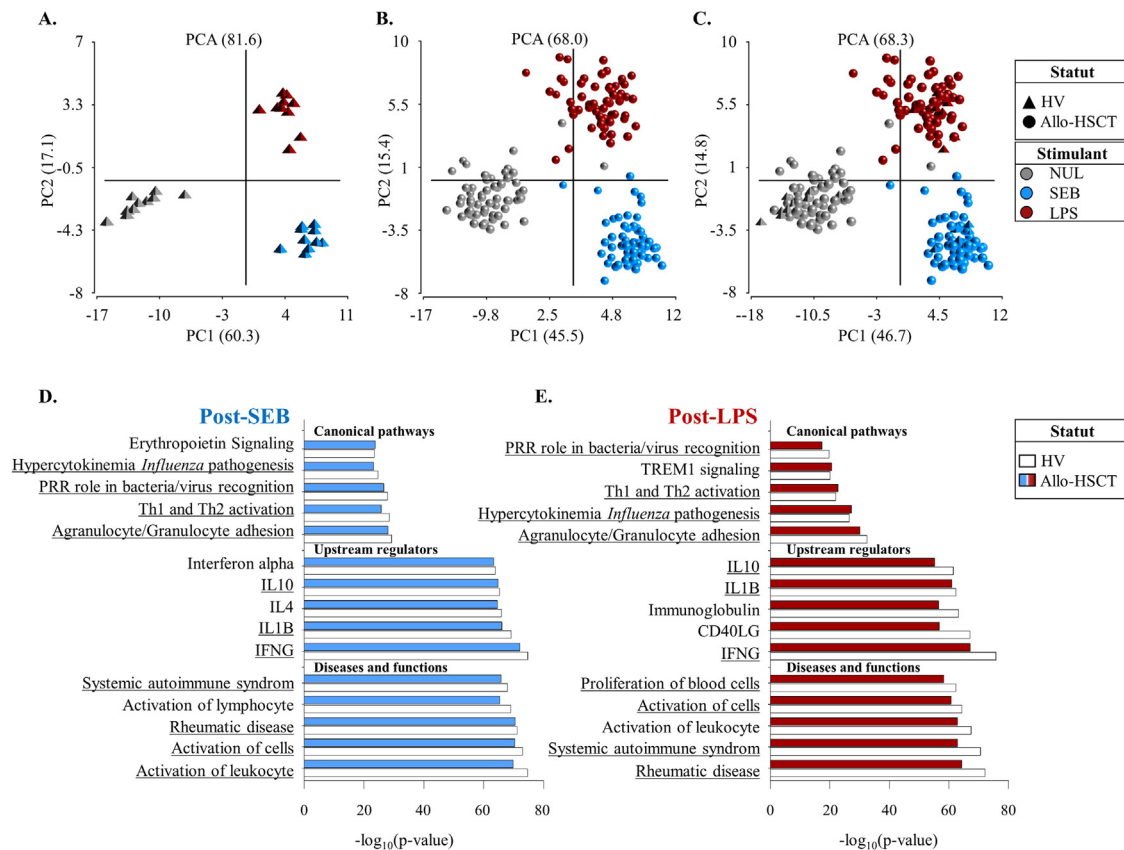


Figure 1. Spatial distribution and biological networks induced by stimulation in healthy volunteers and allo-HSCT recipients. PCA of gene expression data derived from (A) 10 healthy volunteers HV (triangles), (B) 60 allo-HSCT patients (circles), and (C) both populations. Gene expression data for immune response assessment were obtained post SEB (blue) and LPS (red) stimulation, as well as within a NUL unstimulated basal condition (gray). PCA is projected onto the first 2 principal components and each mark represents an individual transcriptomic profile. Biological networks obtained from IPA for HV (white bars) and allo-HSCT recipients (colored bars), represented by the top 5 enriched modulated canonical pathways, upstream regulators, and diseases and functions after SEB (D) and LPS (E) stimulation. For canonical pathways and diseases and functions, a $-\log(P \text{ value}) > 2$ was set as threshold. For upstream regulators, an overlap $P \text{ value} < .05$ was set as threshold. Underlined networks correspond to those common between the 2 stimulants. PC indicates principal component.

stimulation (Figure 2D), 27/135 (20%) genes were significantly and differentially expressed between allo-HSCT and HV; once again, the expression of most of them ($n = 25$) was lower, and the 10 most impacted genes (squares) were involved in complement cascade and immunoregulatory and inflammatory processes (*C3*, *CCL19*, *CCL23*, *GBP5*, *IFNG*, *IP10*, *MCPI*, *SERP1G1*, *SPP1*, and *TNFAIP6*). Three genes with a lower expression were common to both SEB and LPS stimulation (*CCL23*, *IFNG*, and *SPP1*). This suggests a potential delay in the regulation of immune response and inflammatory processes in the allo-HSCT population at 6 months after transplantation compared to HV. Of note, the 4 genes whose expression was higher in allo-HSCT recipients were only weakly induced after stimulation and thus not biologically relevant. Complete list of differentially expressed gene between HV and allo-HSCT population are available in supplementary data (Supplementary Data S3).

The lower number of DEGs associated with a lower expression level post-stimulation of these DEGs in allo-HSCT recipients led us to compare the enrichment of the biological networks implicated between both populations using an activation score in order to quantitatively evaluate the functional immune response post LPS or SEB challenge. Regardless of the stimulant used and despite the ability of allo-HSCT recipients to activate pathways, upstream regulators, and biological diseases and functions common to HV (Figure 1D,E), the intensity

of this activation was significantly lower ($P \text{ adj} < .05$) in allo-HSCT recipients than in HV for almost all parameters (Figure 2E,F).

Transcriptomic IFA Allows Identification of Immune Functional Alteration Unrevealed by Cellular Counts

Individual immune responses were observed through PCA performed on 3 datasets; the first 2 were obtained after stimulation with either LPS or SEB, respectively, and the last one was obtained by combining the datasets obtained after LPS and SEB stimulation (cumulative condition). Samples projected onto the first 2 PC revealed an overall variability of 39.0%, 40.2%, and 34.2% in the LPS, SEB, and cumulative conditions, respectively. Interestingly, among the 3 datasets we observed a group of allo-HSCT recipients clustered closely to all HV located on the upper right side of PCA, whereas some patients were distant from HV, suggesting distinct transcriptomic profiles (Figure 3A, Figure S1A,B). These observations highlight the heterogeneous nature of the post allo-HSCT immune reconstitution, and suggest that the patients located close to HV have a more advanced functional immune reconstitution than others. To obtain a quantitative characterization of the immune alteration, we calculated, using PCA projection, a Euclidean distance of each allo-HSCT recipient to the centroid of HV population (green square), which serves as a reference

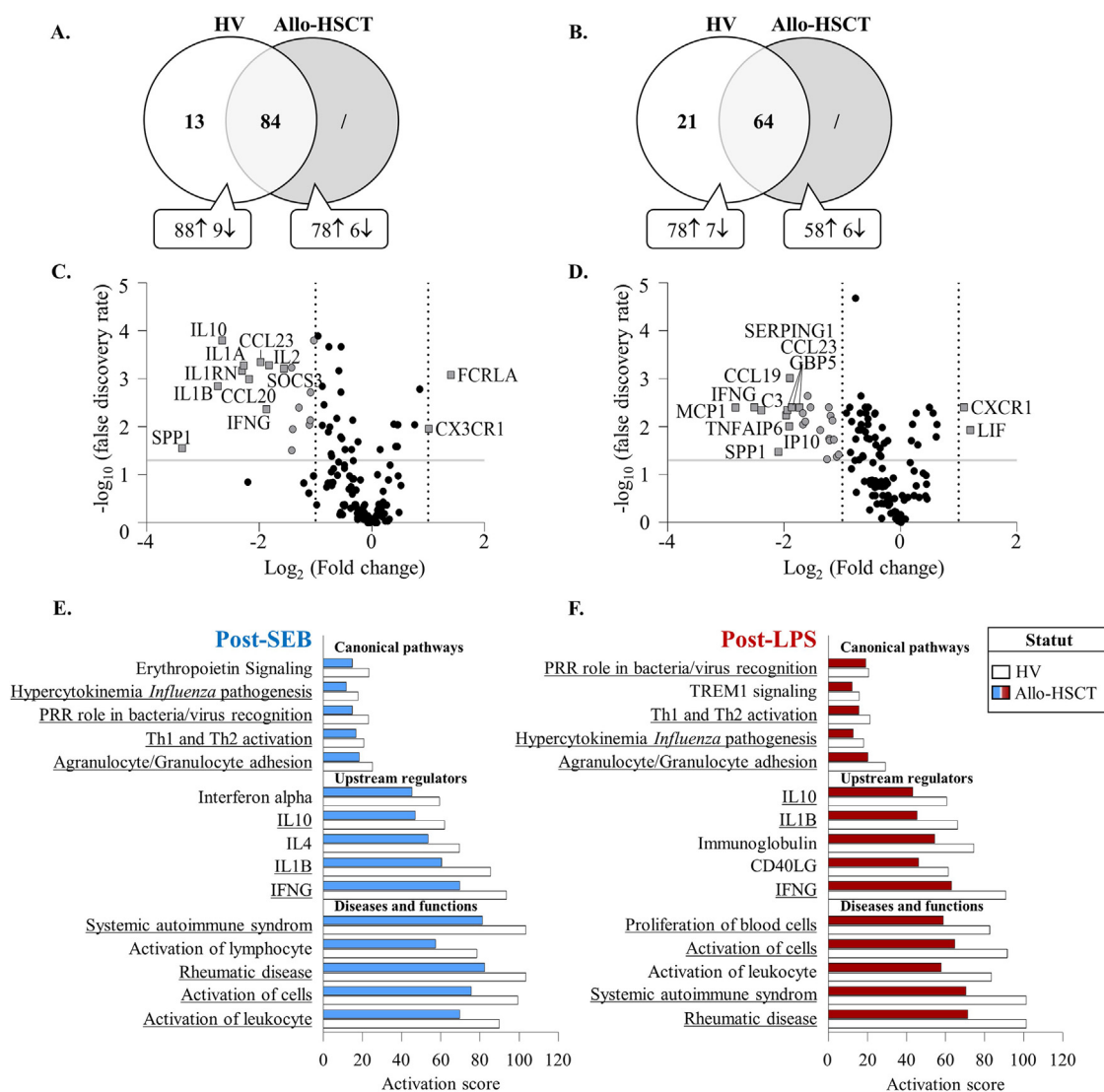


Figure 2. Modulation in the expression of immune response genes post-SEB and post-LPS stimulation in healthy volunteers and allo-HSCT recipients. Venn diagrams of DEG (adjusted $P < .05$ in $>75\%$ of tests) between 10 healthy volunteers HV (white circle) and 60 allo-HSCT recipients (gray circle) after 24 hours of SEB (A) and LPS (B) stimulation. Volcano plots of genes upon SEB (C) and LPS (D) stimulation differing between HV and allo-HSCT population. Fold change (x axis) is plotted against statistical significance (y axis) for each gene. Black circles represents genes not found to differ significantly between the HV and allo-HSCT populations. Up- or down-regulated genes with a fold change >2 or <2 and $FDR < 0.05$ are depicted in gray. The top most impacted genes are detailed and represented as gray squares. The biological network activation scores of the top 5 canonical pathways, upstream regulators, and diseases and functions for HV (white bars) and allo-HSCT recipients (colored bars) on SEB (E) and LPS (F) stimulation. Activation scores for both populations were generated by summing the median expression of component genes for each network. Underlined networks correspond to those common between the two stimulants. PRR indicates pattern recognition receptors; Th, T helper.

value of a functional immune response (Figure 3A, Figure S1A, B). We hypothesized that the greater the distance is, the more allo-HSCT recipients had an altered immune response. We then explored whether 20 of the main biological- or transplant-related factors (age, sex, donor type, stem cell source, underlying disease, GvHD status, etc.) were associated with this Euclidean distance. Interestingly, thresholds classically used to describe an immunosuppression state [50,51] such as a $TCDA^+$ cell count >200 cells/ μ L or a $CD4^+/CD8^+$ ratio >1 did not allow us to identify allo-HSCT recipients with an altered immune response (i.e., with a high Euclidean distance) (Supplementary Table S2). Moreover, among the 20 factors assessed, ongoing immunosuppressive therapy was the only transplantation-related factor statistically associated with an increased Euclidean distance compared to those without, within the cumulative dataset (median [IQR] 15.37 [13.2-

20.29] versus 11.34 [5.14-14.39] P adj $< .027$; Supplementary Table S2). The immunosuppressive drugs used in treated patients ($n = 19$) were calcineurin inhibitors (cyclosporine [$n = 9$] and tacrolimus [$n = 4$]), steroids ($n = 8$), and ruxolitinib ($n = 3$).

When comparing patients with ongoing immunosuppressive treatment ($n = 19$) to those without treatment ($n = 41$), no significant difference was observed in terms of clinical characteristics. Furthermore, no clinical factor had a significant impact on immunosuppressive therapy use, not even GvHD at inclusion (P adj = .707), because 21% of patients under immunosuppressive treatment did not ever present a GvHD (Supplementary Table S3).

We then assessed whether the immune alteration induced by immunosuppressive treatment could be revealed by immune cell counts, using a large immunophenotyping panel.

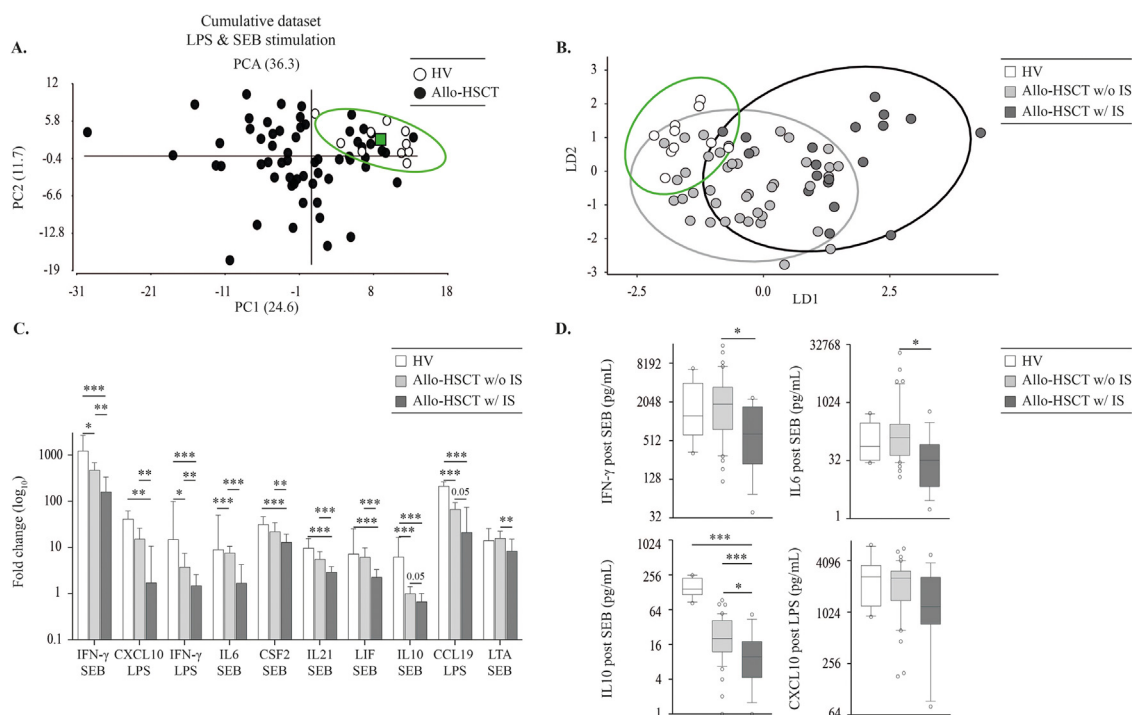


Figure 3. Individual transcriptomic profile of the allo-HSCT population compared to the healthy volunteers population and association with the main disease- and transplant-related factors. (A) PCA of gene expression data derived from 10 healthy volunteers HV (white circles) and 60 allo-HSCT patients (black circles) on cumulative dataset (gene expression obtained after LPS and after SEB stimulation). Individuals were represented onto the first 2 principal components and each circle represents an individual transcriptomic profile. PCA shows the presence of a specific cluster formed by HV individuals (green ellipse), the HV centroid (green square) serve as a reference of functional transcriptomic response. (B) LDA representation from the 5 first principal component from (A) (explaining 80% of dataset variability) from 10 HV (white circles) and 60 allo-HSCT recipients divided into 2 groups, without (n = 41, light gray) or with (n = 19, dark gray) ongoing immunosuppressive treatment, the corresponding ellipses are also represented. (C) Expression level of the 10 genes that most contribute to the construction of the first axis of LDA, comparison between HV (white bars) and allo-HSCT recipients without (n = 41, light gray) immunosuppressive treatment. (D) Comparison of cytokine secretion levels for four genes from LDA analysis (pg/mL) obtained from Truculture supernatants post stimulation and quantified using the ELLA nanofluidic system. Whisker plots represent median [Q1–Q3] values. Kruskal-Wallis test with Dunn correction was used for statistical analysis, $P < .05$ is considered significant. IS indicates immunosuppressive.

Table 2

Comparison of Immune Cell Counts of allo-HSCT Recipients According to Immunosuppressive Treatments

Immunophenotyping, (normal value)	No IS treatment (n = 41) Median [IQR]	IS treatment (n = 19) Median [IQR]	P Value	P Adj
Polynuclear neutrophils (PNN) (NV 2-7.5 × 10 ⁹ /L)	2.8 [2.2-3.8]	4 [3.1-4.4]	.021*	.353
White blood cells (WBC) (NV 4.5-11 × 10 ⁹ /L)	5.4 [4.2-7]	6 [4.8-7.8]	.110	.353
Monocytes (0.2-0.9 × 10 ⁹ /L)	0.5 [0.4-0.7]	0.6 [0.4-0.9]	.187	.390
Absolute lymphocytes (NV, 1-2.8 × 10 ⁹ /L)	1.3 [0.8-2.5]	0.9 [0.7-1.3]	.154	.353
CD3 ⁺ T-lymphocytes (NV, 521-1772/μL)	717 [513-1186]	475 [362.5-686.5]	.072	.353
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-lymphocytes (NV, 336-1126/μL)	287 [151-334]	205 [95-382.5]	.259	.432
Naïve CD4 ⁺ (CD45 ⁺ CCR7 ⁺) (NV, 121-456/μL)	17 [8.5-32]	12 [4-33]	.599	.788
Central memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺) (NV, 92-341/μL)	56.5 [22.5-82]	50 [19.5-104]	.795	.864
Effector memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 59-321/μL)	143.5 [103.8-208]	98 [64.5-185]	.212	.396
Differentiated memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁺) (NV, 11-102/μL)	5 [0-29]	3.5 [0.8-20]	.784	.864
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-lymphocytes (NV, 125-780/μL)	409 [230-790]	250 [141-366.5]	.032*	.353
Naïve CD8 ⁺ (CD45 ⁺ CCR7 ⁺) (NV, 86-257/μL)	20.5 [10-54.5]	17.5 [8.2-49]	.749	.864
Central memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺) (NV, 19-93/μL)	9.5 [3.2-17]	10 [4-12]	.849	.884
Effector memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 15-162/μL)	159 [88-290.8]	107 [62.2-199.8]	.278	.435
Differentiated memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁺) (NV, 39-212/μL)	223 [88.5-339.5]	72 [22.5-247.5]	.049*	.353
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio (NV, 0.9-6)	0.5 [0.4-0.8]	0.8 [0.2-1.3]	.651	.813
CD2 ⁺ T-lymphocytes (NV, 800-3000/μL)	785 [614.8-1218.5]	538 [414-813.5]	.090	.353
CD19 ⁺ B-lymphocytes (NV, 67-516/μL)	214 [101.2-414.8]	171 [54.5-244.2]	.151	.353
CD20 ⁺ B-lymphocytes (NV, 64-593/μL)	213 [98.5-424.5]	168 [54.2-240.8]	.156	.353
CD21 ⁺ B-lymphocytes (NV, 67-516/μL)	203 [86.8-390.2]	161.5 [49-230.8]	.139	.353

* Based on 2016 revisions of the World Health Organization classification of myeloid and lymphoid neoplasms. Immunosuppressive treatments included ciclosporin (n = 9), tacrolimus (n = 4), corticosteroids (n = 8), ruxolitinib (n = 3). Adjusted P values were calculated using the Bonferroni correction method and were considered statistically significant if <.05.

In patients with ongoing immunosuppressive treatment compared to those without, no significant difference was observed in terms of immune cell counts (P adj > .53; Table 2). Of note, no significant correlation was observed between Euclidean distance and the lymphocyte subset counts (Spearman P adj > .12). These results suggest an added value of transcriptomic IFA to depict immune reconstitution in addition to the cellular counts routinely used.

Next, to precisely characterize which transcriptomic features allow us to distinguish allo-HSCT recipients with immunosuppressive treatment, without immunosuppressive treatment, and HV samples, we used an LDA approach (Figure 3B). As observed, the 3 groups are distinctly separated along the first axis of the LDA. We then identified the top 10 genes that contribute to the construction of this axis: *CCL19*, *CSF2*, *CXCL10*, *IFNG*, *IL10*, *IL21*, *IL6*, *LIF*, and *LTA*. These genes were mainly obtained after SEB (7/10) rather than LPS (3/10) stimulation and had a significantly lower expression (P adj < .05) in allo-HSCT recipients with an ongoing immunosuppressive treatment when compared to those without treatment or to the HV population (Figure 3C). Of note, similar results were also observed for the proteins encoded by 4 of these genes, with an at least 2-fold lower secretion in patients with immunosuppressive treatments compared to those without, for IFN- γ , IL6, IL10 after SEB, and CXCL10 after LPS stimulation (Figure 3D). Overall, these results highlight the potential of transcriptomic IFA for the individual assessment of immune function and to reveal specific immune alterations.

Reactivation of Herpesviridae Was Associated With a Lower Expression of CCL4 and CCL3 Genes

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

During the first 6 months after transplantation, 56/60 (93.3%) patients had at least 1 notable infectious episode. A total of 188 infectious episodes were recorded, 57 of which required a specific treatment. Viral infections were the most prominent (51%), especially *Herpesviridae* reactivations with EBV (36%), CMV (19%), or HHV-6 (11%). This observation led us to assess a possible association between immune function and viral reactivation.

Within the 14 days before or after inclusion, 19 (32%) allo-HSCT recipients experienced at least 1 infectious episode. Infectious episodes were exclusively related to *Herpesviridae* reactivation with a large prevalence of asymptomatic EBV reactivation (17/19, 89%), which did not require any specific treatment. Of note, almost all infectious episodes occurred within the 14 days before whole-blood sampling (1/19 at day 5 and 18/19 with an ongoing chronic lasting EBV or HHV-6 reactivation). No significant difference (P adj > .99) was found between recipients with ($n = 19$) or without ($n = 41$) infectious episodes, in terms of demographic and transplant-related characteristics (Table 3). In terms of quantitative cell count measurements, the comparison between patients with and without ongoing *Herpesviridae* reactivation revealed also no significant differences (P adj > .99). Strikingly, classical thresholds used in clinical routine were not useful to discriminate patients with or without infectious episodes because 12/19 (63%) and 25/41 (61%) had a TCD4+ count >200 cells/ μ L (P > .99), and 3/19 (16%) and 12/41 (29%) had a CD4+/CD8+ ratio >1 (P adj = .35), respectively.

After LPS or SEB stimulation, 17 genes were found to be differentially expressed (FDR Benjamini-Hochberg corrected P

adj < .05; 2-FC threshold) between patients with and without *Herpesviridae* reactivation. A supervised analysis revealed a lower expression of these 17 genes after stimulation in allo-HSCT recipients with *Herpesviridae* reactivation compared to those without (Figure 4A). The 4 genes whose expression were the most significantly lower (P adj < .01) in recipients with *Herpesviridae* reactivation compared to those without were *CCL4* (post-LPS, FC 6.9 versus 23.3, post-SEB, FC 12.6 versus 30.2), *CCL3* (post-LPS, FC 23.2 versus 53.7), *SLAMF7* (post-LPS, FC 8.8 versus 19.4), and *CD274* (post-LPS, FC 10.4 versus 30.4; Figure 4B). Finally, ROC curves representation and calculation of respective AUC were performed to evaluate the discriminating power of post-stimulation genes expression compared to classical quantitative cell counts among infected and uninfected allo-HSCT recipients. AUC obtained with genes expression after stimulation was at least >0.79 whereas AUC obtained through cell counts was significantly lower, with a maximum of 0.69 [0.54–0.84] for CD4+/CD8+ ratio (Figure 4C).

DISCUSSION

The present analysis based on a whole-blood IFA, provides a description of the immune functional state of a cohort of allo-HSCT recipients, at 6 months after transplantation. This late post-transplantation timepoint is a pivotal period for allo-HSCT recipients, as immunosuppressive treatment is weaned, prophylactic therapies are adapted, and the revaccination schedule is initiated [13]. Furthermore, although innate immunity is quantitatively normal and lymphocyte counts representing adaptive immunity are only mildly or moderately abnormal, their functionality remains to be characterized.

The use of whole-blood IFA enabled to demonstrate the ability of allo-HSCT recipients to activate the same immune networks than HV in response to immune challenges. Nevertheless, allo-HSCT recipients had a fewer number of DEG than HV, leading to an immune response of weaker intensity on both SEB and LPS stimulation. Genes with a lower expression were mainly involved in immunoregulatory and inflammatory processes. Indeed, post-SEB stimulation, the genes with the most significant lower expression were *IL2*, a marker of T-cell activation [52], *IL1*-related genes, and *IL10*, both regulating inflammatory and immune responses [40,53]. After LPS stimulation, an altered expression of *C3* was observed, a gene related to the activation of the complement system acting as a functional bridge between innate and adaptive immunity that leads to the production of proinflammatory molecules [54,55]. A reduced expression of *MCPI* (also known as *CCL2*) was highlighted. This gene encodes for a chemoattractant of myeloid and lymphoid cells during the inflammatory process and acts as an effector of T-cell differentiation [56], previously reported to be activated by inflammatory stimuli such as LPS [57]. Furthermore, the observed lower expression of *IFNG* with both stimulants potentially reflects a slower functional reconstitution of natural killer or T-cells, the main IFN- γ producing cells [58]. The lower expression of genes identified through volcano plotting explained the weaker biological networks' intensity in allo-HSCT recipients compared to HV. The canonical pathways altered in allo-HSCT recipients were mainly linked to the recognition of infectious agents and the induction of inflammatory reaction or adaptive response. Altogether, the genes with an altered expression were associated with defects in key biological functions, not necessarily specific of a cellular component or system, but involved in many immune response processes. Except for donor lymphocyte infusions, no immune-boosting strategy after allo-HSCT is routinely performed. However, as recently described [59,60], immune-

Table 3
Characteristics of Allo-HSCT Recipients According to Herpesviridae Infection Status

Herpesviridae infection	Presence (n = 19)	Absence (n = 41)	P Value	P adj
Etiology		NA	NA	NA
EBV	17			
CMV (including one combined with EBV)	2			
HHV6	1			
Demographics				
Age (yr), median [IQR]	41 [28-57]	45 [35-63]	.164	1.000
Male	11 (58%)	23 (56%)	.881	1.000
Time from transplantation, months, median [IQR]	6.4 [5.8-7.6]	7.4 [5.8-8.6]	.353	1.000
Hematological and transplant-related characteristics				
Underlying hematological disease*			.859	1.000
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%)		
CR before the engraftment	16 (84%)	37 (90%)	.323	1.000
Donor type			.810	1.000
Matched related donor (MRD)	4 (21)	14 (34)		
Matched unrelated donor (MUD)	9 (90)	14 (74)		
Mismatched unrelated donor (MMUD)	1 (10)	5 (26)		
Haploidentical donor	5 (26)	7 (17)		
Umbilical cord blood (UCB)	0 (0)	1 (2)		
Stem cell source	–	–	1.000	1.000
Peripheral blood cells	15 (79)	33 (81)		
Bone marrow	4 (21)	7 (17)		
Conditioning regimen	–	–		
MAC	11 (58)	27 (66)	1.000	1.000
RIC	8 (42)	14 (34)		
TBI	7 (37)	11 (27)		
GvHD				
GvHD prophylaxis				
ATG	14 (74%)	20 (49%)	.095	1.000
Calcineurin inhibitors	19 (100%)	40 (98%)	1.000	1.000
Mycophenolate mofetil	12 (63%)	21 (51%)	.558	1.000
Corticosteroids	0 (0%)	0 (0%)	NA	NA
Methotrexate	5 (26%)	9 (22%)	.750	1.000
Cyclophosphamide	7 (37%)	16 (39%)	1.000	1.000
History of GvHD between transplantation and inclusion				
Acute GvHD	15 (79%)	27 (66%)	.375	1.000
Chronic GvHD	3 (16%)	5 (12%)	.699	1.000
GvHD status at inclusion				
No history of GvHD	4 (21%)	12 (29%)	.503	1.000
Resolved GvHD	8 (42%)	15 (37%)	.683	1.000
Active GvHD (acute or chronic)	7 (37%)	14 (34%)	.839	1.000
Immunophenotyping, mean (range)				
Lymphocytes (NV, 1000-2800/ μ L)	1869 (490-4910)	1473 (410-4650)	.377	1.000
CD3 ⁺ T-lymphocytes (NV, 521-1772/ μ L)	1081 (188-3406)	797 (145-2910)	.539	1.000
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-lymphocytes (NV, 336-1126/ μ L)	273 (38-785)	269 (60-876)	.697	1.000
Naïve CD4 ⁺ (CD45 ⁺ CCR7 ⁺) (NV, 121-456/ μ L)	20.5 (0-121)	34.3 (1-390)	.165	1.000
Central memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺) (NV, 92-341/ μ L)	49.7 (1-140)	65.4 (1-211)	.266	1.000
Effector memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 59-321/ μ L)	179.5 (13-704)	147.8 (4-368)	.934	1.000
Differentiated memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 11-102/ μ L)	15.0 (0-95)	25.3 (0-226)	.187	1.000
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-lymphocytes (NV, 125-780/ μ L)	776 (60-2779)	489 (50-2422)	.139	1.000
Naïve CD8 ⁺ (CD45 ⁺ CCR7 ⁺) (NV, 86-257/ μ L)	28.8 (0-156)	44.3 (2-241)	.083	1.000

(continued)

Table 3 (Continued)

Herpesviridae infection	Presence (n = 19)	Absence (n = 41)	P Value	P adj
Central memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺) (NV, 19-93/ μ L)	19.8 (0-97)	17.7 (0-127)	.741	1.000
Effector memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 15-162/ μ L)	418 (0-1517)	177 (1-843)	.100	1.000
Differentiated memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻) (NV, 39-212/ μ L)	317 (0-1102)	258 (0-1500)	.315	1.000
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio (NV, 0.9-6)	0.55 (0.17-2.33)	1.17 (0.12-9.07)	.019*	1.000
CD19 ⁺ B-lymphocytes (NV, 64-593/ μ L)	274 (14-1435)	289 (15-1299)	.540	1.000
Post-transplantation immunomodulatory therapy at inclusion				
IS therapy at inclusion	8 (42%)	11 (27%)	.376	1.000
IVIg infusion(s)	17 (89%)	24 (59%)	.003*	1.000
DLI	3 (16%)	5 (12%)	.703	1.000

HHV6 indicates human herpesvirus 6.

Immunosuppressive therapies included ciclosporin (n = 9), tacrolimus (n = 4), corticosteroids (n = 8), and ruxolitinib (n = 3).

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

based approaches, such as cellular therapies and soluble factors, are currently under study.

The assessment of individual post-stimulation transcriptomic profiles revealed that immune reconstitution in allo-HSCT recipients is highly heterogeneous. Some allo-HSCT recipients displayed a transcriptomic profile similar to that observed in HV, suggesting a more advanced process of immune reconstitution. Interestingly, the patients with the most distinct transcriptomic responses compared to HV were mainly allo-HSCT recipients with an ongoing

immunosuppressive treatment, independently of any confounding clinical factor. These patients were characterized by a lower expression of key genes of the immune response such as *CSF2*, *IFNG*, *IL10*, *IL21* or *IL6* resulting for some of them in a lower secretion of related encoded proteins. This is in line with previous data reporting the effect of immunosuppressive treatments, such as calcineurin inhibitors, the most used class of immunosuppressive drugs in the present study, which affect NFAT pathway-related gene expression and protein secretion [61–65]. In addition, no association between a specific

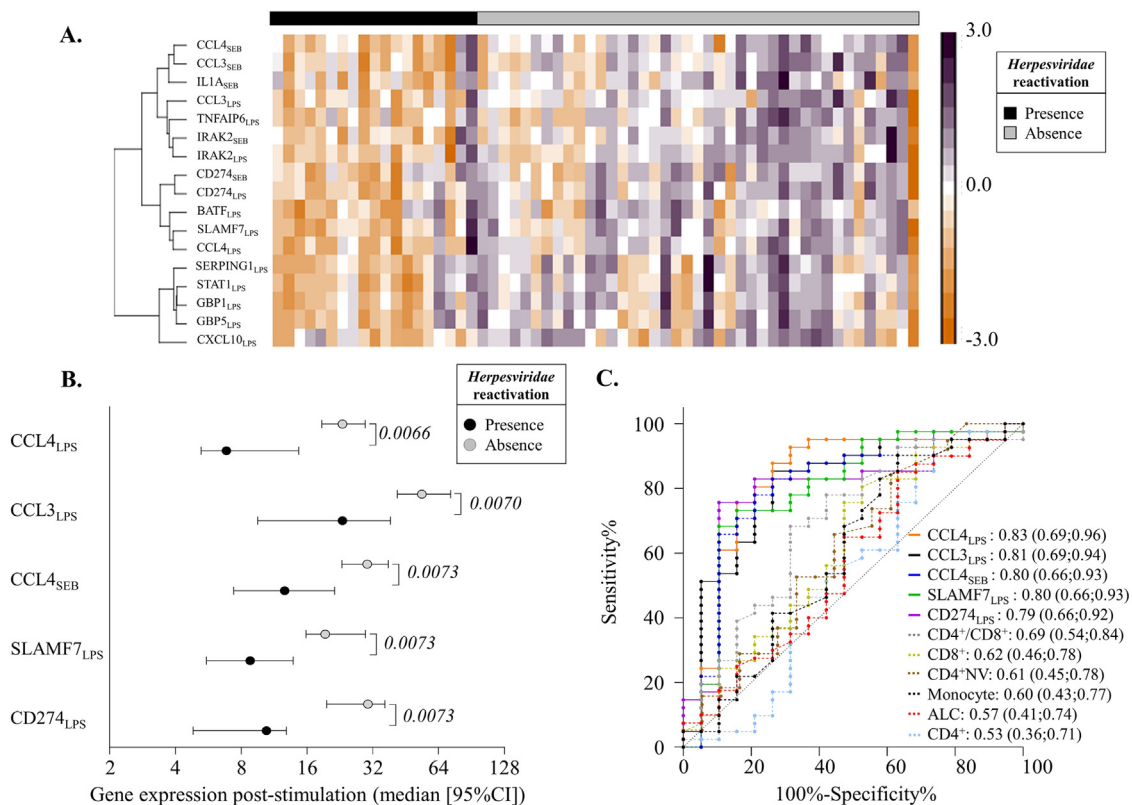


Figure 4. Transcriptomic immune profile according to the presence or absence of recent viral infectious episodes and main genes impacted. Heatmap of gene expression profiles (A) from supervised analysis (Euclidean distances matrix with Ward's methods) generated by scaling and centering log₁₀-transformed gene expression FC and based on the 17 genes with the highest significant ($P < .05$) differences in expression between recipients with (n = 19) and without infectious episodes (n = 41). Genes clustering is indicated by a dendrogram tree for selected genes (left). The colored bars at the top of the heatmap represent the membership of recipients in groups with (black) or without (gray) infectious episodes. (B) Graphical plot representing the expression of the top 5 most DEG (FC > 2 and P < .01) within allo-HSCT recipients with (n = 19) or without infectious episodes (n = 41), median and [95% CI] values are represented by dots and lines, respectively. (C) ROC curves obtained from the comparison between allo-HSCT recipients with (n = 19) and without infectious episodes (n = 41) regarding the 5 most DEG and quantitative cell counts from the large immunophenotyping panel. AUC [95%CI] is indicated for each parameter. CI indicates confidence interval.

transcriptomic profile and other major clinical characteristics, such as GvHD status at inclusion, was found. Regarding immune cell counts, those classically quantified to assess post-transplantation immune reconstitution, such as TCD4⁺ cell count and CD4⁺/CD8⁺ ratio, were not able to reveal these alterations [50,51].

Several studies have shown the interest of evaluating the immune response using a post-stimulation approach with TruCulture tubes in healthy populations [26,39,66], in an infectious context [27,67], and in the context of solid organ transplantation [68]. In the allo-HSCT setting, a recent study revealed the magnitude and the heterogeneity of functional immune responses reflected by the variation in cytokine responses before and early after transplantation [28], a second one also used functional analysis to describe immune reconstitution [69]. Although previous studies have described the heterogeneity of allo-HSCT recipients regarding quantitative parameters of immune reconstitution [70], this is the first, to the best of our knowledge, to report post-stimulation transcriptional immunoprofiling in the late post-transplant period in allo-HSCT recipients. The results herein highlight that the information provided by immune function assessment is different and complementary to that captured by the quantitative measurement of circulating immune cells.

Finally, we were able to identify a set of genes associated with ongoing infectious episodes, only related in this study to *Herpesviridae* reactivation, which are frequent events in immunocompromised populations [71]. A recent study described an altered immune response against *Herpesviridae* in older people [72]. Interestingly, the state of immunosenescence occurring in older people could be in some way compared to what is observed in allo-HSCT recipients, notably regarding phenotypes of immune cells which are mainly made up of memory phenotypes and highly restricted to naïve phenotypes or effector cells. In the present study, allo-HSCT recipients with *Herpesviridae* reactivation presented a significantly lower expression of *CCL3* and *CCL4* genes post-stimulation. These chemokines are potent chemoattractants of innate and adaptive immune cells during inflammatory processes, and their dysregulation has been linked to an increased susceptibility to infection [73,74], or associated to the presence of ongoing viral reactivation [75]. Interestingly, allo-HSCT recipients with *Herpesviridae* reactivation had again no specific clinical features. Quantitative biomarkers used in routine practice failed to discriminate patients with or without infections, notably T-cell counts (total or naïve), which are described as key controllers of infections after HSCT [76–78]. Altogether, the present results confirm the potential added-value of IFA in providing additional information on immunocompetence in the allo-HSCT setting, as previously suggested [6,28,79]. In the current state, this IFA transcriptomic tool is not yet suitable for application in the clinical setting, mainly due to the complexity and time required for interpreting the results. Nevertheless, it paves the way to a new approach regarding the assessment of individual immune capacities. Indeed, deciphering immune signatures through transcriptomic analysis might help develop personalized precision medicine. In the context of allo-HSCT, such tests, reflecting the functional immune status, could allow us to better characterize immune reconstitution to optimize prophylactic strategies.

There are some limitations to this study. In this pilot study, performed at a single institution, the number of patients included was limited, and the results need to be confirmed. Immune function assessment herein is only representative of the selected stimuli (LPS and SEB). Functional immune

reconstitution was studied at a single timepoint, but the ongoing follow-up of the cohort should enable to provide dynamic data regarding the kinetics of immune reconstitution over-time. The biological network assessment might be biased by the custom gene-panel. We have also chosen to use a standardized whole blood IFA to limit the technical variability and to increase applicability in the clinical setting. This choice, however, did not allow us to associate the biological network alterations observed with a specific immune cell type. To do so, it would be necessary to perform stimulation assays on isolated sorted cells. Finally, it cannot be excluded that the important inter-individual variability observed, with no evident link to clinical characteristics, is due to the heterogeneity of allo-HSCT recipients included in the study. Indeed, no specific selection was applied in terms of participants who were representative of the HSCT patient population at our institution, but this might lead to a lack of power.

In conclusion, this first descriptive analysis of the transcriptomic profile of allo-HSCT recipients demonstrates the added value of IFA for deciphering different immune profile signatures that could not be captured by quantification of immune cell counts, currently used in the clinical setting. Besides the interest in assessing individual immune function profiles, the present results pave the way to longitudinal studies, which could assess the predictive value of this tool in terms of relevant clinical post-transplantation outcomes, especially infectious episodes and GvHD, and could ultimately contribute to personalized precision medicine.

Conflict of interest statement: K.B.P., G.O., and M.Bod are employees of bioMérieux SA.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.jctc.2022.10.025.

REFERENCES

1. Ljungman P, Bregni M, Brune M, et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45:219–234.
2. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2006;354:1813–1826.
3. Bosch M, Khan FM, Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Hematol.* 2012;19:324–335.
4. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, et al. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol.* 2016;7:507.
5. Carson K, Mehta J, Singhal S. Reimmunization after stem cell transplantation. In: Treleaven J, Barrett AJ, eds. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Clinical Practice.* 2009;363–368.
6. de Silva HD, Ffrench RA, Korem M, et al. Contemporary analysis of functional immune recovery to opportunistic and vaccine-preventable infections after allogeneic haemopoietic stem cell transplantation. *Clin Transl Immunol.* 2018;7(10):e1040.
7. Storek J. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation – its relation to the contents of the graft. *Expert Opin Biol Ther.* 2008;8:583–597.
8. Bejanyan N, Brunstein CG, Cao Q, et al. Delayed immune reconstitution after allogeneic transplantation increases the risks of mortality and chronic GVHD. *Blood Adv.* 2018;2:909–922.
9. Gratwohl A. Hematopoietic stem cell transplantation: a global perspective. *JAMA.* 2010;303:1617.
10. Pidala J. Graft-vs-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Control.* 2011;18:268–276.
11. Giaccone L, Felicetti F, Butera S, et al. Optimal delivery of follow-up care after allogeneic hematopoietic stem-cell transplant: improving patient outcomes with a multidisciplinary approach. *J Blood Med.* 2020;11:141–162.
12. Sahin U, Toprak SK, Atilla PA, Atilla E, Demirel T. An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Chemother.* 2016;22:505–514.
13. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:1143–1238.


14. Gratwohl A, Brand R, Frassonni F, et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36:757–769.
15. Styczynski J, Tridello G, Koster L, et al. Death after hematopoietic stem cell transplantation: changes over calendar year time, infections and associated factors. *Bone Marrow Transplant.* 2020;55:126–136.
16. Lin R, Liu Q. Diagnosis and treatment of viral diseases in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol.* 2013;6:94.
17. Ljungman P, de la Camara R, Cordonnier C, et al. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42:227–240.
18. Styczynski J, Reusser P, Einsele H, 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.* 2009;43:757–770.
19. 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.* 2007;4:225–232.
20. Luo Y, Xie Y, Zhang W, et al. Combination of lymphocyte number and function in evaluating host immunity. *Aging.* 2019;11:12685–12707.
21. Janetzki S, Schaed S, Blachere NEB, et al. Evaluation of Elispot assays: influence of method and operator on variability of results. *J Immunol Methods.* 2004;291(1–2):175–183.
22. Smith SG, Joosten SA, Verscheure V, et al. Identification of major factors influencing ELISpot-based monitoring of cellular responses to antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE.* 2009;4(11):e7972.
23. Smith JG, Liu X, Kaufhold RM, Clair J, Caulfield MJ. Development and validation of a gamma interferon ELISPOT assay for quantitation of cellular immune responses to varicella-zoster virus. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8:871.
24. Vogt R, Schulte PA. Evaluation of immune responses. *IARC Sci Publ.* 2011;163:215–239.
25. Albert-Vega C, Tawfik DM, Trouillet-Assant S, et al. Immune functional assays, from custom to standardized tests for precision medicine. *Front Immunol.* 2018;9:2367.
26. Duffy D, Rouilly V, Libri V, et al. Functional analysis via standardized whole-blood stimulation systems defines the boundaries of a healthy immune response to complex stimuli. *Immunity.* 2014;40:436–450.
27. Albert Vega C, Oriol G, Bartolo F, et al. Deciphering heterogeneity of septic shock patients using immune functional assays: a proof of concept study. *Sci Rep.* 2020;10:16136.
28. Gjørde LK, Brooks PT, Andersen NS, et al. Functional immune reconstitution early after allogeneic haematopoietic cell transplantation: a comparison of pre- and post-transplantation cytokine responses in stimulated whole blood. *Scand J Immunol.* 2021;94(1):e13042.
29. Bohannon JK, Hernandez A, Enkhbaatar P, Adams WL, Sherwood ER. The immunobiology of toll-like receptor 4 agonists: from endotoxin tolerance to immunoadjuvants. *Shock.* 2013;40:451–462.
30. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:635–700.
31. Fries BC, Varshney AK. Bacterial toxins—staphylococcal enterotoxin B. *Microbiol Spectr.* 2013;1(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0002-2012>.
32. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins.* 2010;2:2177–2197.
33. Conrad A, Boccard M, Valour F, 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.* 2019;9(2):e026093.
34. Cordonnier C, Einarisdottir S, Cesaro S, et al. Vaccination of haematopoietic stem cell transplant recipients: guidelines of the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect. Dis.* 2019;19(6):e200–e212.
35. Ljungman P, de la Camara R, Robin C, et al. Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect. Dis.* 2019;19(8):e260–e272.
36. Styczynski J, van der Velden W, Fox CP, et al. Management of Epstein-Barr virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines. *Haematologica.* 2016;101:803–811.
37. Ogata M, Satou T, Kadota J, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) reactivation and HHV-6 encephalitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a multicenter, prospective study. *Clin Infect Dis.* 2013;57:671–681.
38. Ward KN, Hill JA, Hubacek P, et al. Guidelines from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia for management of HHV-6 infection in patients with hematologic malignancies and after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2019;104:2155–2163.
39. Urrutia A, Duffy D, Rouilly V, et al. Standardized whole-blood transcriptional profiling enables the deconvolution of complex induced immune responses. *Cell Rep.* 2016;16:2777–2791.
40. Goytain A, Ng T. NanoString nCounter technology: high-throughput RNA validation. *Methods Mol Biol.* 2020;2079:125–139.
41. Ovesná J, Kučera L, Vaculová K, et al. Validation of the β -amy1 transcription profiling assay and selection of reference genes suited for a RT-qPCR assay in developing Barley caryopsis. *PLoS ONE.* 2012;7(7):e41886.
42. Zhang J, Xie W, Yu X, et al. Selection of suitable reference genes for RT-qPCR gene expression analysis in Siberian wild rye (*Elymus sibiricus*) under different experimental conditions. *Genes.* 2019;10:451.
43. Nagy NA, Németh Z, Juhász E, et al. Evaluation of potential reference genes for real-time qPCR analysis in a biparental beetle, *Lethrus apterus* (Coleoptera: Geotrupidae). *PeerJ.* 2017;5:e4047.
44. Sarker N, Fabijan J, Emes RD, et al. Identification of stable reference genes for quantitative PCR in koalas. *Sci Rep.* 2018;8:3364.
45. Krämer A, Green J, Pollard J, Tugendreich S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinform.* 2014;30:523–530.
46. Meng T, Chen H, Sun M, et al. Identification of differential gene expression profiles in placentas from preeclamptic pregnancies versus normal pregnancies by DNA microarrays. *OMICS.* 2012;16:301–311.
47. Lopez J, Mommert M, Mouton W, et al. Early nasal type I IFN immunity against SARS-CoV-2 is compromised in patients with autoantibodies against type I IFNs. *J Exp Med.* 2021;218(10):e20211211.
48. Jombart T, Ahmed I. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics.* 2011;27:3070–3071.
49. Dekker L, de Koning C, Lindemans C, Nierkens S. Reconstitution of T cell subsets following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancers.* 2020;12:1974.
50. 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.* 1992;165:352–363.
51. Margolick JB, Gange SJ, Detels R, et al. Impact of inversion of the CD4/CD8 ratio on the natural history of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;42:620–626.
52. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:180–190.
53. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018;281:8–27.
54. Dunkelberger JR, Song W-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010;20:34–50.
55. Carroll MC. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2004;5:981–986.
56. Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol.* 2001;2:102–107.
57. Gschwandtner M, Derler R, Midwood KS. More than just attractive: how CCL2 influences myeloid cell behavior beyond chemotaxis. *Front Immunol.* 2019;10:2759.
58. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. *Front Immunol.* 2018;9:847.
59. Yanir A, Schulz A, Lawitschka A, Nierkens S, Eyrich M. Immune reconstitution after allogeneic haematopoietic cell transplantation: from observational studies to targeted interventions. *Front Pediatr.* 2022;9:786017.
60. de Koning C, Plantinga M, Besseling P, Boelens JJ, Nierkens S. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22:195–206.
61. Sommerer C, Meuer S, Zeier M, Giese T. Calcineurin inhibitors and NFAT-regulated gene expression. *Clin Chim Acta.* 2012;413(17–18):1379–1386.
62. Tsuda K, Yamanaka K, Kitagawa H, et al. Calcineurin Inhibitors Suppress Cytokine Production from Memory T Cells and Differentiation of Naïve T Cells into Cytokine-Producing Mature T Cells. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e31465.
63. Pacocha SE, Oriente A, Huang S-K, Essayan DM. Regulation of antigen-induced human T-lymphocyte responses by calcineurin antagonists. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(4):828–835.
64. Kim H-P, Korn LL, Gamero AM, Leonard WJ. Calcium-dependent activation of interleukin-21 gene expression in T cells. *J Biol Chem.* 2005;280:25291–25297.
65. Bremer S, Vethe NT, Skauby M, et al. NFAT-regulated cytokine gene expression during tacrolimus therapy early after renal transplantation: NFAT-regulated cytokine gene expression during tacrolimus therapy. *Br J Clin Pharmacol.* 2017;83:2494–2502.
66. Duffy D, Rouilly V, Braudeau C, et al. Standardized whole blood stimulation improves immunomonitoring of induced immune responses in multi-center study. *Clin Immunol.* 2017;183:325–335.
67. Duffy D, Nemes E, Llibre A, et al. Immune profiling enables stratification of patients with active tuberculosis disease or mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Infect Dis.* 2021;73(9):e3398–e3408.
68. Drabe CH, Sørensen SS, Rasmussen A, et al. Immune function as predictor of infectious complications and clinical outcome in patients undergoing solid organ transplantation (the ImmuneMo:SOT study): a prospective non-interventional observational trial. *BMC Infect Dis.* 2019;19:573.
69. Mellgren K, Nierop AFM, Abrahamsson J. Use of multivariate immune reconstitution patterns to describe immune reconstitution after allogeneic

- stem cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019;25:2045–2053.
70. Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, et al. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2001;97:1458–1466.
 71. Annaloro C, Serpenti F, Saporiti G, et al. Viral infections in HSCT: detection, monitoring, clinical management, and immunologic implications. *Front Immunol.* 2020;11: 569381.
 72. Nicoli F, Clave E, Wanke K, et al. Primary immune responses are negatively impacted by persistent herpesvirus infections in older people: results from an observational study on healthy subjects and a vaccination trial on subjects aged more than 70 years old. *eBioMedicine.* 2022;76: 103852.
 73. Ren M, Guo Q, Guo L, et al. Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *EMBO J.* 2010;29:3952–3966.
 74. Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, et al. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell–dendritic cell interaction. *Nature.* 2006;440:890–895.
 75. Jabs WJ, Wagner HJ, Maurmann S, Hennig H, Kreft B. Inhibition of macrophage inflammatory protein–1 α production by Epstein-Barr virus. *Blood.* 2002;99:1512–1516.
 76. Moss P, Rickinson A. Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:9–20.
 77. Basso S, Compagno F, Zelini P, et al. Harnessing T cells to control infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol.* 2020;11: 567531.
 78. Ljungman P. Prevention and treatment of viral infections in stem cell transplant recipients. *Br J Haematol.* 2002;118:44–57.
 79. Naik S, Vasileiou S, Aguayo-Hiraldo P, et al. Toward functional immune monitoring in allogeneic stem cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2020;26:911–919.

2. Annexe 2 : Torque Teno Virus Viral Load as a Marker of Immune Function in Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients

Article

Torque Teno Virus Viral Load as a Marker of Immune Function in Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients

William Mouton ^{1,*} , Anne Conrad ^{2,3}, Antonin Bal ^{1,4,5}, Mathilde Boccard ^{1,2,3}, Christophe Malcus ⁶, Sophie Ducastelle-Lepretre ⁷, Marie Balsat ⁷, Fiorenza Barraco ⁷, Marie-Virginie Larcher ⁷, Gaëlle Fossard ⁷, Hélène Labussière-Wallet ⁷, Florence Ader ^{2,3}, Karen Brengel-Pesce ¹, Sophie Trouillet-Assant ^{1,4} and Lyon HEMINF Study Group [†]

¹ Joint Research Unit Hospices Civils de Lyon-bioMérieux, Civils Hospices of Lyon, Lyon Sud Hospital, 69310 Pierre-Bénite, France; antonin.bal@chu-lyon.fr (A.B.); mathilde.boccard@chu-lyon.fr (M.B.); karen.brengel-pesce@biomerieux.com (K.B.-P.); sophie.assant@chu-lyon.fr (S.T.-A.)

² International Centre for Research in Infectiology (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Claude Bernard Lyon 1 University, 69364 Lyon, France; anne.conrad@chu-lyon.fr (A.C.); florence.ader@chu-lyon.fr (F.A.)

³ Infectious and Tropical Diseases Department, Civil Hospices of Lyon, Croix-Rousse Hospital, 69004 Lyon, France

⁴ Virology and Human Pathology—Virpath Team, International Centre for Research in Infectiology (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Claude Bernard Lyon 1 University, 69008 Lyon, France

⁵ Virology Laboratory, Institute of Infectious Agents, Civils Hospices of Lyon, Croix-Rousse Hospital, 69004 Lyon, France

⁶ Immunology Laboratory, Civils Hospices of Lyon, Edouard Herriot Hospital, 69003 Lyon, France; christophe.malcus@chu-lyon.fr

⁷ Clinical Haematology Department, Civils Hospices of Lyon, Lyon Sud Hospital, 69310 Pierre-Bénite, France; sophie.ducastelle-lepretre@chu-lyon.fr (S.D.-L.); marie.balsat@chu-lyon.fr (M.B.); fiorenza.barraco@chu-lyon.fr (F.B.); marie-virginie.larcher@chu-lyon.fr (M.-V.L.); gaelle.fossard@chu-lyon.fr (G.F.); helene.labussiere-wallet@chu-lyon.fr (H.L.-W.)

* Correspondence: william.mouton1@biomerieux.com; Tel.: +33(0)4-72-67-87-81

† Membership of the Lyon HEMINF Study Group is provided in the Acknowledgments.

Received: 12 October 2020; Accepted: 9 November 2020; Published: 11 November 2020



Abstract: Torque teno virus (TTV) has been proposed as a surrogate biomarker of T-cell function in allogeneic–haematopoietic–stem-cell transplantation (allo-HSCT). Conflicting data exists regarding the value of TTV to assess the degree of immunosuppression. The aim of the present study was to investigate the correlation between TTV viral load and immune function. Using samples from a prospective cohort composed of healthy-volunteers (HV) and allo-HSCT recipients at 6 months post-transplantation, we assessed the correlation between TTV viraemia and immune cell counts or T-cell proliferation capacity post-phytohaemagglutinin stimulation. TTV viraemia was detected in 68% of HV ($n = 80$) and 100% of allo-HSCT recipients ($n = 41$; $p < 0.001$); it was significantly higher in allo-HSCT recipients (3.9 vs. 2.1 Log copies/mL, $p < 0.001$). There was no correlation between T-cell function and CD3⁺T-cell count ($\rho = 0.002$) suggesting that T-cell count can normalise without full functional recovery. Furthermore, no significant correlation was observed between TTV viraemia and absolute total/subset lymphocyte counts ($\rho = <0.13$). The highest correlation was observed between TTV viral load and T-cell proliferation capacity ($\rho = -0.39$). We therefore report an inverse correlation between T-cell function and TTV viraemia that is independent of T-cell count. Monitoring of TTV viraemia could be a fast suitable option to objectively assess the competence of immune function in at-risk populations.

Keywords: allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT); torque teno virus (TTV); immune functional assay; immunocompetence; biomarker

1. Introduction

Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a cellular therapy used for the cure of malignant and non-malignant haematological disorders. From the immunological point of view, allo-HSCT recipients represent a highly specific population experiencing a phase of profound immunosuppression followed by gradual immune recovery [1–3]. Both the speed and quality of immune reconstitution are variable; these depend on haematological and transplant characteristics, as well as post-transplant complications such as graft-versus-host-disease (GvHD). This is also of importance as prolonged immunosuppression exposes allo-HSCT recipients to transplant rejection, relapse of the underlying disease and infectious complications [4].

During the immune reconstitution period, tools to effectively measure the individual degree of immunosuppression are needed. Absolute lymphocyte counts, such as counts of T-cell subtype populations, are currently used as biomarkers of immune reconstitution, although this is not informative of their function [5–7]. A simple blood biomarker mirroring T-cell function would be useful, and measuring the blood viral load of torque teno virus (TTV) may be of interest in this context. TTV is a ubiquitous, non-enveloped DNA virus from the *Anelloviridae* family with no known pathogenicity and constitutes the main component of the human blood virome [8]. Previous studies in the transplant setting have suggested that TTV viral load and/or the composition of the *Anelloviridae* virome could be surrogate markers of immune competence and could be useful to monitor patients' immunity and to guide pharmacological interventions [9–14]. However, none of these analysed the correlation between TTV viral load and direct markers of immune function; only indirect markers of immunocompetence have been previously used, such as clinical adverse outcomes (type of disease, graft rejection, infections, or GvHD) or immune cell counts for which conflicting data exists, especially in the allo-HSCT context [9,15]. In addition to being based only on an indirect correlation, the link between TTV and immune function warrants further investigation. We therefore studied prospectively the correlation between TTV viraemia, immune cell counts and lymphocyte competency estimated by their proliferating capacity in allo-HSCT recipients at 6 months post-transplant.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

Adult (≥ 18 years) allo-HSCT recipients transplanted at the haematology department of the Lyon university hospital (France) and enrolled in the prospective, single-centre cohort study "VaccHemInf" between May 2018 and April 2020 were included. The VaccHemInf cohort study has been previously described and aims at studying vaccine immunogenicity and immune reconstitution after allo-HSCT [16]. The cohort has been approved by a regional review board (Comité de Protection des Personnes Sud-Est V, Grenoble, France; number 69HCL17_0769) and is registered in [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03659773) (NCT03659773). At inclusion, demographics (age and sex), haematological and transplant-related (underlying haematological disease (based on 2016 revision of the World Health Organization classification of myeloid and lymphoid neoplasms), conditioning regimen, stem cell source, and donor type) as well as post-transplant characteristics (GvHD, immunomodulatory medication(s) and immunosuppressive therapies including antithymocyte globulins, cyclosporine, tacrolimus, methotrexate, mycophenolate mofetil, cyclophosphamide, and corticosteroids ≥ 1 mg/kg > 21 days) were retrieved from medical records through an electronic case report form (eCRF). The presence of viral opportunistic infection/reactivation (except TTV viral load) was also routinely monitored by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) in the routine virology laboratory

and reported in the eCRF during the post-transplant period. Infections, infectious agent-related reactivations and diseases were reported using classification guidelines from European Group for Blood and Marrow Transplantation, as reported previously [16]. Concomitantly, healthy volunteers (HV) were recruited among donors to the Lyon blood transfusion centre (*Etablissement Français du Sang*, EFS) and were considered as a control group. According to the EFS procedures, informed consent was obtained from HV, and personal data were anonymous.

2.2. Blood Sampling

Before initiation of the recommended vaccination schedule after allo-HSCT [17,18], samples of heparinised whole blood and EDTA plasma were collected and processed for the measurement of quantitative and qualitative parameters of immune reconstitution.

2.3. TTV Viral Load Quantification

TTV viral DNA (elution volume 50 μ L) was extracted from 200 μ L of plasma sample using an easyMag extractor (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) following the manufacturer's instructions. The presence and viral load of TTV were then determined using the TTV R-GENE[®] kit (available for research use only, not for diagnostic, Ref#69-030; bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) as previously described [19,20]. Log of TTV DNA copy number/mL (Log copies/mL) plasma are used to describe TTV viral load. The lowest viral load detected was 0.46 Log copies/mL.

2.4. T-Cell Proliferation Assay

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from fresh heparinised blood samples using a Ficoll density gradient centrifugation (U-04; Eurobio, Les Ulis, France). Then, 10^5 cells/well were incubated for 24 h in supplemented culture medium (RPMI 1640; Eurobio) in a 96-well cell culture plate at 37 °C under 5% CO₂. PBMCs were then stimulated in duplicate with phytohaemagglutinin (PHA) at 4 μ g/mL (R30852801; Remel[™], Dartford, Kent, UK) and incubated for 72 h. Then, cellular pellets were analysed for T-cell proliferation using the Click-It[®] EdU AF488 flow kit (C10420; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) to measure incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) according to the previously published protocol [21]. The proportion (%) of EdU+ proliferating cells (among CD3⁺ T-cell) was obtained by flow cytometry analyses performed on a BD LSR Fortessa[™] flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). For each experiment, a minimum of 2.5×10^3 CD3⁺ T-cells was recorded. Data were analysed using BD FACSDiva Software (version 8.0.3; BD Biosciences).

2.5. Post-Transplant T-Cell Immunophenotyping

Extensive T-cell immunophenotyping by flow cytometry on whole blood was performed at the immunology laboratory of the Lyon university hospital. Counts of naive CD4⁺ and CD8⁺ T-cell (CD45⁺CCR7⁺), central memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell (CD45RA⁻CCR7⁺), effector memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell (CD45RA⁻CCR7⁺), and differentiated memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell (CD45RA⁺CCR7⁻) were determined (cells/ μ L) as previously described [15]. The normal values for each type of cell have been provided by the immunology laboratory.

2.6. Statistical Analysis

The Shapiro–Wilk normality test was used to determine the distribution of data, and accordingly, quantitative data was expressed as mean (range) or median (interquartile range (IQR)). TTV viral load was log-transformed for analysis (Log copies/mL). For HV and allo-HSCT recipients' datasets, analysis of variance was performed using *F*-test, and differences were calculated using a parametric unpaired *t* test with Welch's correction. Correlations were assessed using a parametric Pearson rho correlation coefficient (rho (95% confidence interval, CI)). Regression analyses were conducted to evaluate the association between the dependent variable, TTV viral load, and independent variables (proportion

of proliferating cells, absolute lymphocytes counts, and CD3⁺ T-cell counts). Differences in TTV plasma viral load according to several clinical characteristics were performed using the non-parametric Mann–Whitney test.

A *p*-value of < 0.05 was considered significant. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism[®] software (version 5; GraphPad software, La Jolla, CA, USA) and R (version 3.5.1, R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (<https://www.R-project.org/>).

3. Results

3.1. Participant Characteristics

A total of 41 allo-HSCT recipients and 80 HV were included. Age (median (IQR): 46 (31–53) vs. 56 (40–64) years, *p* = 0.32) and sex ratio (1.6 vs. 1.4, *p* = 0.85) were similar among allo-HSCT recipients and HV. Allo-HSCT recipients were enrolled at a median (IQR) of 6 (5–8) months post-transplant. Patient characteristics are summarised below; of note, 17% (*n* = 7) had chronic GvHD and 78% (*n* = 32) of allo-HSCT recipients were still under immunosuppressive medication (Table 1).

Table 1. Clinical characteristics of allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients.

	Patients <i>n</i> = 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. <i>n</i> (%)	
Underlying haematological diseases	
Myeloid neoplasm and acute leukaemia	37 (90)
Mature lymphoid. histiocytic. and dendritic neoplasms	4 (10)
CR before the engraftment. <i>n</i> (%)	39 (95)
Donor types	
Matched related	23 (56)
Unrelated	18 (44)
Fully matched	15 (37)
HLA mismatched	3 (7)
Stem cell source	
Peripheral blood cells	28 (68)
Bone marrow	13 (32)
Conditioning regimen	
MAC	17 (41)
RIC	24 (59)
TBI	11 (27)
Post-transplant complications. <i>n</i> (%)	
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/μL)	1659 (410–5350)
CD3 ⁺ T-cells (NV. 521–1772/μL)	915 (175–3406)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-cells (NV. 336–1126/μL)	273 (38–876)
Naïve CD4 ⁺ (CD45 ⁺ CCR7 ⁺) (NV. 121–456/μL)	45 (0–445)
Central Memory CD4 ⁺ (CD45RA [−] CCR7 ⁺) (NV. 92–341/μL)	60 (1–168)
Effector Memory CD4 ⁺ (CD45RA [−] CCR7 [−]) (NV. 59–321/μL)	163 (4–522)
Differentiated Memory CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 [−]) (NV. 11–102/μL)	19 (0–147)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-cells (NV. 125–780/μL)	602 (60–2779)
Naïve CD8 ⁺ (CD45 ⁺ CCR7 ⁺) (NV. 86–257/μL)	40 (0–241)
Central Memory CD8 ⁺ (CD45RA [−] CCR7 ⁺) (NV. 19–93/μL)	17 (0–127)
Effector Memory CD8 ⁺ (CD45RA [−] CCR7 [−]) (NV. 15–162/μL)	286 (0–1517)
Differentiated Memory CD8 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 [−]) (NV. 39–212/μL)	257 (0–1474)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio (NV. 0.9–6)	0.84 (0.13–8.88)

Table 1. Cont.

	Patients <i>n</i> = 41
Post-transplant immunomodulatory therapy at inclusion, <i>n</i> (%)	
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)

Abbreviations: Allo. allogeneic; CR. complete remission; DLI. donor lymphocyte infusion; ECP. extracorporeal photochemotherapy; GvHD. graft-versus-host disease; HLA. human leukocyte antigen; HSCT. haematopoietic stem cells transplantation; IQR. interquartile range; IS. immunosuppressive; MAC. myeloablative conditioning; NK. Natural Killer; NV. normal values; RIC. reduced intensity conditioning; TBI. total body irradiation.

3.2. Plasma TTV Viral Load in Allo-HSCT Recipients and HV

TTV was detected in 100% (41/41) of allo-HSCT recipients and 68% (54/80) of HV ($p < 0.001$). Mean (range) TTV viral load was significantly higher in allo-HSCT recipients compared to HV (3.9 (0.7–7.7) vs. 2.1 (0.5–4.3) Log copies/mL respectively, $p < 0.001$; Figure 1).

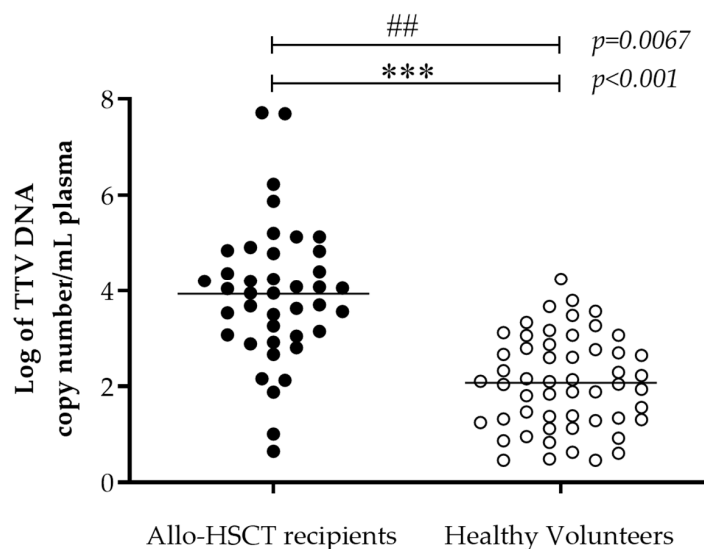


Figure 1. TTV viral load in healthy volunteers and allo-HSCT plasma samples. TTV viral load from 41 allo-HSCT recipients (black) and 54 healthy volunteers (white) plasma was quantified by real-time qPCR. Variance was compared using F-test (## $p < 0.01$). The mean TTV viral load (black line) was compared using unpaired t test with Welch's correction (** $p < 0.001$). Abbreviations: Allo. allogeneic; HSCT. haematopoietic stem cells transplantation; TTV. torque teno virus.

No correlation was found between the delay post-transplant (5–8 months) and plasma TTV viral load (Pearson's rho $\rho = 0.03$, 95% CI (−0.2811 to 0.3338), $p = 0.86$; Figure S1).

3.3. Correlation between TTV Viral Load and T-Cell Counts or Proliferation Capacity

In allo-HSCT recipients, absolute lymphocytes and CD3⁺ T-cells counts were within normal value ranges. Five out of 10 lymphocyte subtype counts studied were lower than the normal value range, such as naïve and central memory CD3⁺CD4⁺ or CD3⁺CD8⁺ T-cells (individual values available in Table S1). A significant lower mean (range) proliferation capacity among CD3⁺ T-cells was observed in allo-HSCT recipients compared to HV (21.3% (2.9–42.3%) vs. 40.5% (29.7–55.3%), $p < 0.001$). In addition, a significantly wider range and a more heterogeneous distribution of proliferation capacity were observed among allo-HSCT recipients compared to HV (2.9–42.3% vs. 29.7–55.3%, respectively, F-test $p = 0.004$), indicating the inter-individual variability in the immune reconstitution after allo-HSCT

(Figure S2). Correlations between TTV viral load and T-cell proliferation capacity or absolute cell counts were then analysed among allo-HSCT recipients (Figure 2A). The highest correlation was between TTV viral load and T-cell proliferation capacity (Pearson's rho $\rho = -0.39$, $(-0.62$ to $-0.09)$; Figure 2B); there was no significant correlation between TTV viral load and absolute lymphocytes (Figure 2C) or CD3⁺ T-cell counts (Figure 2D).

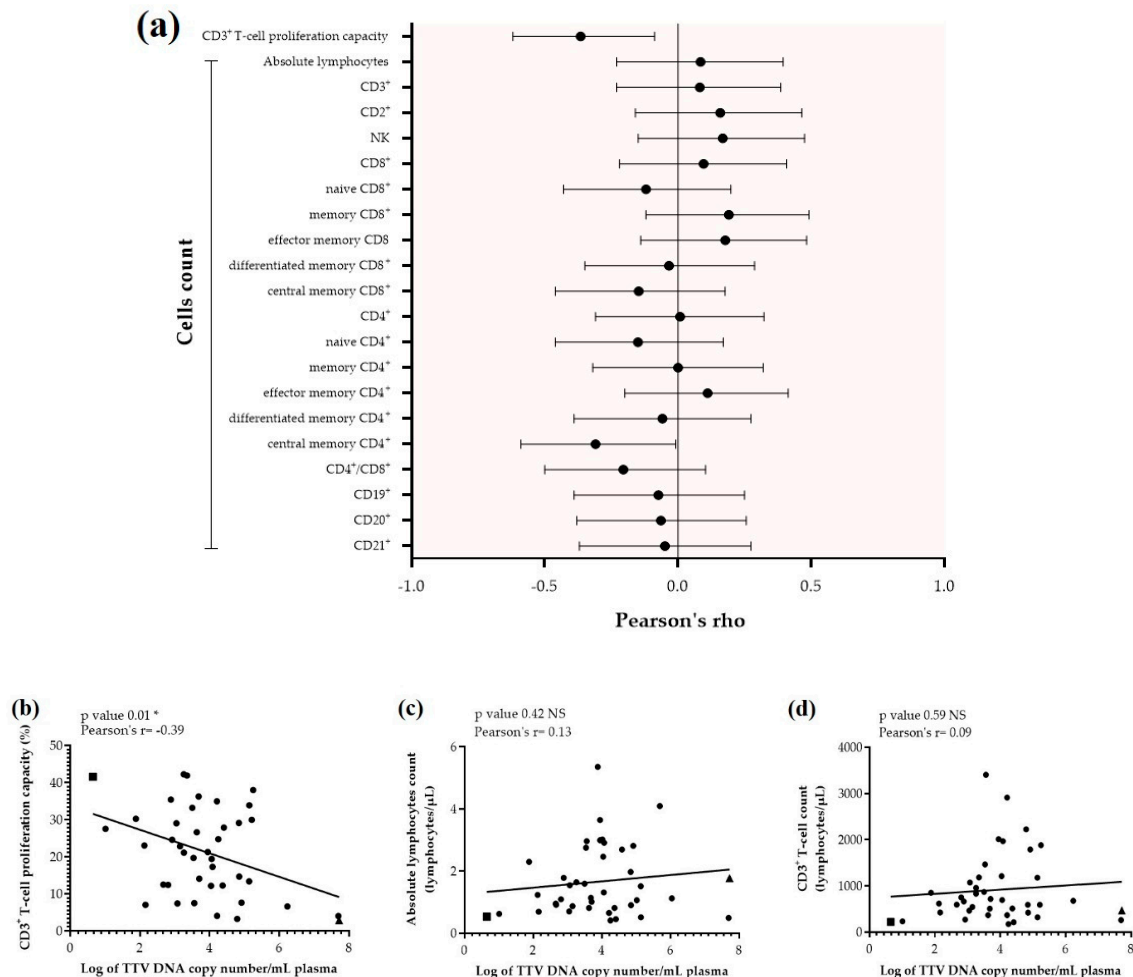


Figure 2. Overall correlation of TTV plasma viral load from 41 allo-HSCT recipients plasma versus T-cell subtype counts and CD3⁺ T-cell proliferation capacity (a). Pearson's rho and 95% confidence interval (95% CI) for all parameters are represented by black dots and lines, respectively. Detailed correlation of TTV viral load from 41 allo-HSCT recipients' plasma versus: (b) CD3⁺ T-cell proliferation capacity, (c) absolute lymphocyte count, and (d) CD3⁺ T-cell count. Extreme patients: "A" (square) and "B" (triangle), as well as the linear regression (black line) are presented. Correlation of TTV viral load (x-axis) and cell count or CD3⁺ T-cell proliferation capacity (y-axis) was determined using Pearson's correlation coefficient. The asterisk (*) denotes statistical significance at $p < 0.05$. Abbreviations: NK. Natural killer; PHA. Phytohemagglutinin; TTV. torque teno virus.

3.4. Correlation between (Post-)Transplant Characteristics and TTV Viral Load

There was a significantly higher median (IQR) plasma TTV viral load in allo-HSCT recipients with viral opportunistic infection/reactivation (4.1 Log copies/mL (3.5–4.9), $n = 26$, $p = 0.02$) compared to other allo-HSCT recipients (3.2 Log copies/mL (2.8–4.1), $n = 15$; Figure 3A). This was also the case for allo-HSCT recipients with CMV infection/reactivation (4.8 Log copies/mL (4.0–5.9), $n = 9$, $p = 0.02$) compared to other allo-HSCT recipients (3.7 Log copies/mL (2.9–4.3), $n = 32$; Figure 3B). Other characteristics did not significantly impact TTV viral loads in univariate analysis (Table S2).

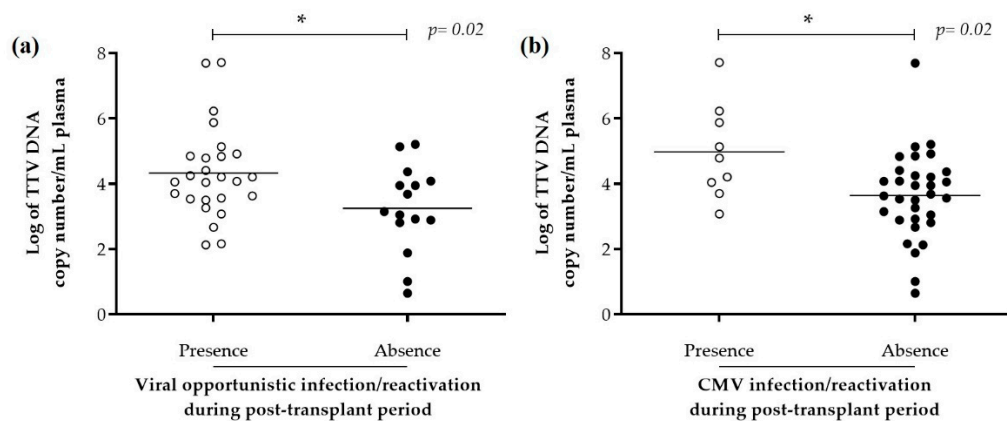


Figure 3. TTV viral load in allo-HSCT recipients according to post-transplant viral infection/reactivation. TTV viral load from 41 allo-HSCT with (white) or without (black) (a) viral opportunistic infection/reactivation and (b) CMV infection/reactivation during post-transplant period. Comparison between groups was performed using Mann–Whitney test, the asterisk (*) denotes statistical significance at $p < 0.05$. Abbreviations: Allo. allogeneic; CMV. Cytomegalovirus; HSCT. haematopoietic stem cells transplantation; TTV. torque teno virus.

3.5. Clinical Characteristics of Allo-HSCT Recipients with Extreme Values of TTV Viral Load

By analysing at an individual level the correlation between the TTV viral load and the T-cell proliferation capacity in response to PHA stimulation, we noticed that patient ‘A’ with the lowest viral load (0.65 Log copies/mL) had one of the highest T-cell proliferation capacities (41.6% EdU+ proliferating cells among CD3⁺ T-cell; square on Figure 2B). Conversely, patient ‘B’ with the highest viral load (7.72 Log copies/mL) had the lowest T-cell proliferation capacity (2.9% EdU+ proliferating cells among CD3⁺ T-cell; triangle on Figure 2B). Patient ‘A’ had an uncomplicated post-transplant course (Figure S3A); conversely, patient ‘B’ suffered from chronic GvHD (grade I requiring immunosuppressive therapy (topical corticosteroids), received monthly intravenous immunoglobulin infusions, and had presented multiple episodes of post-transplant infections (Figure S3B). Patient characteristics are summarised in Table 2.

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

Abbreviations: GvHD. graft versus host disease; IS. immunosuppressive therapy; IVIg; intravenous immunoglobulin; MAC. myeloablative conditioning; RIC. reduced intensity conditioning; TTV. torque teno virus.

4. Discussion

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].

In allo-HSCT recipients, the peak of TTV viral load occurs approximately at 3–6 months post-transplant before returning to the value observed prior to 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 also been reported for other viruses such as cytomegalovirus (CMV) or Epstein–Barr virus (EBV) [9,27,28].

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 post engraftment, which then serves as a TTV replication reservoir, thus avoiding extrapolation between TTV and T-cell function. Indeed, as suggested by Pradier et al., the correlation between T-cell subtype count and TTV viral load can vary according to the interval post-transplant [5]. This result highlights the need for new markers to evaluate lymphocyte function. The use of an immune functional assay (IFA) such as the assessment of post-stimulation T-cell proliferation capacity could fill this need but its implementation in clinical practice remains difficult. TTV could be interesting as a biomarker to estimate immune function and finally to predict infectious and/or clinical events related to the immune system [5,9,22,26,30].

The present study found a correlation between T-cell function, assessed by the proliferation capacity in response to PHA stimulation, and TTV viral load in a well-characterised cohort of allo-HSCT recipients. These data suggest an interplay between TTV replication and cellular immune reconstitution after transplantation, especially the reconstitution of T-cells, which are one of the main replicating sites of TTV [31].

The study does, however, have limitations, notably related to the small number of patients. For instance, because allo-HSCT recipients were referred for vaccination by their haematologists, we cannot exclude a selection bias, which could explain the absence of difference between clinical characteristics (e.g., underlying disease, conditioning, immunosuppressive therapy, or GvHD) and TTV viral load (Table S2). Moreover, it would be interesting to validate these results by assessing kinetics of TTV viral load and lymphocyte proliferative capacities at consecutive time points in this specific recipient population or in other immunocompromised populations. Furthermore, assessing the T-cell function through the measurement of their proliferating capacity might be a reductionist view of immune competency, and additional tests are needed to confirm the conclusions made.

5. Conclusions

In summary, we found an inverse correlation between the TTV viral load and T-cell function, independently of the count of T-cells. The evaluation of immune competency, for at-risk populations, using the monitoring of TTV viraemia, requires further assessment, as currently under evaluation in kidney transplant recipients [32]. Indeed, during the dynamic process of immune reconstitution post-transplant, a pivotal period for allo-HSCT recipients, a rapid and individual assessment of the immune system's capacities could be of clinical interest to adapt anti-infectious prophylactic treatments, to guide the immunosuppressant treatment and in fine prevent graft rejection GvHD, infectious events and relapsing disease, which are the main causes of morbimortality in this population.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1999-4915/12/11/1292/s1>, Figure S1: Correlation between TTV viral load and delays from HSCT; Figure S2: Proliferation capacity of CD3⁺ T-cell of allo-HSCT recipients compared to healthy volunteers; Figure S3: Chronological descriptive follow-up of patients with extreme values of TTV viral load; Table S1: T-cell immunophenotyping of allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients and Table S2: Comparison of TTV plasma viral load with clinical characteristics of 41 allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients.

Author Contributions: Conceptualisation and methodology, W.M., A.C., A.B., M.B. (Mathilde Boccard), F.A. and S.T.-A.; validation F.A., S.T.-A. and K.B.-P.; formal analysis, W.M.; investigation, W.M., A.B., M.B. (Mathilde Boccard), K.B.-P., and S.T.-A.; resources, A.C., C.M., S.D.-L., M.B. (Marie Balsat), F.B., M.-V.L., G.F., H.L.-W. and F.A., were involved in patient care; writing—original draft preparation W.M. and S.T.-A.; writing—review and editing, W.M., A.C., A.B., M.B. (Mathilde Boccard), F.A., K.B.-P. and S.T.-A.; visualisation, W.M.; supervision and project administration, F.A., K.B.-P. and S.T.-A.; funding acquisition, A.C. and F.A. K.B.-P. and S.T.-A. take responsibility for the integrity of the data analysis. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

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

Acknowledgments: The authors would like to thank Philip Robinson for helpful reviewing of the manuscript and the Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation (DRCI) des Hospices Civils de Lyon, the Hospices Civils de Lyon, as well as the Région Auvergne-Rhône-Alpes for supporting the VacHemInf cohort and the FIGHT project. Membership of the Lyon HEMINF Study Group: F. Ader, V. Alcazer, E. Bachy, M. Balsat, F. Barraco, M. Boccard, C. Chidiac, A. Conrad, S. Ducastelle-Leprêtre, O. Dumitrescu, D. Dupont, V. Escuret, E. Ferrant, T. Ferry, E. Frobert, H. Ghesquières, M. Heiblig, E. Hodille, L. Karlin, H. Labussière-Wallet, M.-V. Larcher, F. Laurent, B. Lina, G. Lina, C. Malcus, P. Mialhes, G. Monneret, F. Morfin-Sherpa, T. Perpoint, F. Poitevin-Later, M. Rabodonirina, C. Roure-Sobas, V. Safar, G. Salles, P. Sesques, S. Trouillet-Assant, F. Valour, F. Venet, F. Wallet, M. Wallon.

Conflicts of Interest: W.M. and K.B.-P., are employed in bioMérieux SA, an in vitro diagnostic company. A.B. has received research grant from bioMérieux and has served as consultant. 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.

References

1. Bosch, M.; Khan, F.M.; Storek, J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr. Opin. Hematol.* **2012**, *19*, 324–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ogonek, J.; Kralj Juric, M.; Ghimire, S.; Varanasi, P.R.; Holler, E.; Greinix, H.; Weissinger, E. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front. Immunol.* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. De Silva, H.D.; Ffrench, R.A.; Korem, M.; Orlowski, E.; Curtis, D.J.; Spencer, A.; Avery, S.; Patil, S.; Morrissey, C.O. Contemporary analysis of functional immune recovery to opportunistic and vaccine-preventable infections after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Transl. Immunol.* **2018**, *7*, e1040. [[CrossRef](#)]
4. Sahin, U.; Toprak, S.K.; Atilla, P.A.; Atilla, E.; Demirel, T. An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Infect. Chemother.* **2016**, *22*, 505–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Pradier, A.; Masouridi-Levrat, S.; Bosshard, C.; Dantin, C.; Vu, D.-L.; Zanella, M.-C.; Boely, E.; Tapparel, C.; Kaiser, L.; Chalandon, Y.; et al. Torque Teno Virus as a Potential Biomarker for Complications and Survival after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Hoshina, T.; Ohga, S.; Fujiyoshi, J.; Nanishi, E.; Takimoto, T.; Kanno, S.; Nishio, H.; Saito, M.; Akeda, Y.; Oishi, K.; et al. Memory B-Cell Pools Predict the Immune Response to Pneumococcal Conjugate Vaccine in Immunocompromised Children. *J. Infect. Dis.* **2016**, *213*, 848–855. [[CrossRef](#)]
7. Luo, Y.; Xie, Y.; Zhang, W.; Lin, Q.; Tang, G.; Wu, S.; Huang, M.; Yin, B.; Huang, J.; Wei, W.; et al. Combination of lymphocyte number and function in evaluating host immunity. *Aging (Albany N. Y.)* **2019**, *11*, 12685–12707. [[CrossRef](#)]
8. Focosi, D.; Antonelli, G.; Pistello, M.; Maggi, F. Torquetenovirus: The human virome from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Infect.* **2016**, *22*, 589–593. [[CrossRef](#)]
9. Wohlfarth, P.; Leiner, M.; Schoergenhofer, C.; Hopfinger, G.; Goerzer, I.; Puchhammer-Stoeckl, E.; Rabitsch, W. Torquetenovirus Dynamics and Immune Marker Properties in Patients Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Prospective Longitudinal Study. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2018**, *24*, 194–199. [[CrossRef](#)]
10. Mitchell, A.B.; Glanville, A.R. Kinetics of TTV-DNA Plasma Load: A Global Measure of Immune Suppression? *Transplantation* **2019**, *103*, 660–661. [[CrossRef](#)]
11. Focosi, D.; Maggi, F.; Albani, M.; Macera, L.; Ricci, V.; Gragnani, S.; Di Beo, S.; Ghimenti, M.; Antonelli, G.; Bendinelli, M.; et al. Torquetenovirus viremia kinetics after autologous stem cell transplantation are predictable and may serve as a surrogate marker of functional immune reconstitution. *J. Clin. Virol.* **2010**, *47*, 189–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. De Vlaminc, I.; Khush, K.K.; Strehl, C.; Kohli, B.; Luikart, H.; Neff, N.F.; Okamoto, J.; Snyder, T.M.; Cornfield, D.N.; Nicolls, M.R.; et al. Temporal Response of the Human Virome to Immunosuppression and Antiviral Therapy. *Cell* **2013**, *155*, 1178–1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Gilles, R.; Herling, M.; Holtick, U.; Heger, E.; Awerkiew, S.; Fish, I.; Höller, K.; Sierra, S.; Knops, E.; Kaiser, R.; et al. Dynamics of Torque Teno virus viremia could predict risk of complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Med. Microbiol. Immunol.* **2017**, *206*, 355–362. [[CrossRef](#)]
14. Masouridi-Levrat, S.; Pradier, A.; Simonetta, F.; Kaiser, L.; Chalandon, Y.; Roosnek, E. Torque teno virus in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transpl.* **2016**, *51*, 440–442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kosulin, K.; Kernbichler, S.; Pichler, H.; Lawitschka, A.; Geyerregger, R.; Witt, V.; Lion, T. Post-transplant Replication of Torque Teno Virus in Granulocytes. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Conrad, A.; Boccard, M.; Valour, F.; Alcazer, V.; Tovar Sanchez, A.-T.; Chidiac, C.; Laurent, F.; Vanhems, P.; Salles, G.; Brengel-Pesce, K.; et al. 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* **2019**, *9*, e026093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Cordonnier, C.; Einarsdottir, S.; Cesaro, S.; Di Blasi, R.; Mikulska, M.; Rieger, C.; de Lavallade, H.; Gallo, G.; Lehrnbecher, T.; Engelhard, D.; 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*, e200–e212. [[CrossRef](#)]
18. Haut Conseil de Santé Publique (HCSP). Vaccination des Personnes Immunodéprimées ou Aspléniques. 2014. Available online: <http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportdomaine?clefr=504> (accessed on 12 October 2020).
19. Kulifaj, D.; Essig, M.; Meynier, F.; Pichon, N.; Munteanu, E.; Moulinas, R.; Joannes, M.; Heckel, D.; Combrisson, J.; Barranger, C.; et al. Torque teno virus (TTV) in immunosuppressed host: Performances studies of TTV R-Gene[®] kit and donors and recipients kidney samples genotyping. *J. Clin. Virol.* **2016**, *82*, S103–S104. [[CrossRef](#)]
20. Kulifaj, D.; Durgueil-Lariviere, B.; Meynier, F.; Munteanu, E.; Pichon, N.; Dubé, M.; Joannes, M.; Essig, M.; Hantz, S.; Barranger, C.; et al. Development of a standardized real time PCR for Torque teno viruses (TTV) viral load detection and quantification: A new tool for immune monitoring. *J. Clin. Virol.* **2018**, *105*, 118–127. [[CrossRef](#)]
21. Poujol, F.; Monneret, G.; Friggeri, A.; Rimmelé, T.; Malcus, C.; Poitevin-Later, F.; Pachot, A.; Lepape, A.; Textoris, J.; Venet, F. 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*, 71–79. [[CrossRef](#)]

22. Focosi, D.; Spezia, P.G.; Macera, L.; Salvadori, S.; Navarro, D.; Lanza, M.; Antonelli, G.; Pistello, M.; Maggi, F. Assessment of prevalence and load of torquetenovirus viraemia in a large cohort of healthy blood donors. *Clin. Microbiol. Infect.* **2020**, S1198743X20300367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Tyagi, A.; Pradier, A.; Baumer, O.; Uppugunduri, C.R.S.; Huezo-Diaz, P.; Posfay-Barbe, K.M.; Roosnek, E.; Ansari, M. Validation of SYBR Green based quantification assay for the detection of human Torque Teno virus titers from plasma. *Viol. J.* **2013**, *10*, 191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. 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. Transpl.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Focosi, D.; Bestagno, M.; Burrone, O.; Petrini, M. CD57⁺ T lymphocytes and functional immune deficiency. *J. Leukoc. Biol.* **2010**, *87*, 107–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Albert, E.; Solano, C.; Giménez, E.; Focosi, D.; Pérez, A.; Macera, L.; Piñana, J.L.; Mateo, E.M.; Boluda, J.C.H.; Maggi, F.; et al. Kinetics of Alphatorquevirus plasma DNAemia at late times after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Med. Microbiol. Immunol.* **2019**, *208*, 253–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ljungman, P.; Hakki, M.; Boeckh, M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* **2011**, *25*, 151–169. [[CrossRef](#)]
28. Liu, L.; Zhang, X.; Feng, S. Epstein-Barr Virus-Related Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorders After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2018**, *24*, 1341–1349. [[CrossRef](#)]
29. Albert, E.; Solano, C.; Pascual, T.; Torres, I.; Macera, L.; Focosi, D.; Maggi, F.; Giménez, E.; Amat, P.; Navarro, D. Dynamics of Torque Teno virus plasma DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J. Clin. Virol.* **2017**, *94*, 22–28. [[CrossRef](#)]
30. 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.* **2019**, S1083879119307426. [[CrossRef](#)]
31. Focosi, D.; Macera, L.; Boggi, U.; Nelli, L.C.; Maggi, F. Short-term kinetics of torque teno virus viraemia after induction immunosuppression confirm T lymphocytes as the main replication-competent cells. *J. Gen. Virol.* **2015**, *96*, 115–117. [[CrossRef](#)]
32. Doberer, K.; Schiemann, M.; Strassl, R.; Haupenthal, F.; Dermuth, F.; Görzer, I.; Eskandary, F.; Reindl-Schwaighofer, R.; Kikić, Ž.; Puchhammer-Stöckl, E.; et al. Torque teno virus for risk stratification of graft rejection and infection in kidney transplant recipients—A prospective observational trial. *Am. J. Transpl.* **2020**, ajt.15810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).