

Immunomonitoring du risque infectieux en transplantation de cellules souches hématopoïétiques chez l'enfant

ADENOGREFFE

PROTOCOLE DE RECHERCHE NON INTERVENTIONNELLE

Version N°0.1 du 29/06/2012  
Code projet AP-HP : NI 11047

Investigateur Coordonnateur : Pr Jean-Hugues DALLE  
Service d'Hématologie Clinique – Groupe Hospitalier  
Robert Debré  
48 Boulevard Sérurier – 75019 Paris  
Tél : 01 40 03 12 41 - Fax : 01 40 03 47 40  
Courriel : [jean-hugues.dalle@rdb.aphp.fr](mailto:jean-hugues.dalle@rdb.aphp.fr)

Gestionnaire : AP-HP  
Département de la Recherche Clinique et du développement (DRCD)  
Réfèrent projet : Cécile KEDZIA, Fadila AMERALI  
Hôpital Saint-Louis - 1, avenue Claude Vellefaux - 75010 Paris  
Tél : 01 44 84 17 33 - Fax : 01 44 84 17 01  
Courriel : [cecile.kedzia@sls.aphp.fr](mailto:cecile.kedzia@sls.aphp.fr) [fadila.amerali@sls.aphp.fr](mailto:fadila.amerali@sls.aphp.fr)

Structure chargée du suivi de la recherche : Unité de Recherche Clinique (URC)  
Hôpital Robert Debré  
48, bld Sérurier - 75019 Paris  
Réfèrent projet : Adyla YACOUBI  
Tél : 01 40 03 47 38 - Fax : 01 40 03 24 85  
Courriel : [adyla.yacoubi@rdb.aphp.fr](mailto:adyla.yacoubi@rdb.aphp.fr)

Département de la Recherche Clinique et du Développement (DRCD)  
Hôpital Saint Louis 75010 PARIS

Page de SIGNATURE

**Titre : Immunomonitoring du risque infectieux en transplantation de cellules souches  
hématopoïétiques chez l'enfant**

**Titre court: Adenogreffe.**

La recherche sera conduite conformément au protocole et aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

Responsable scientifique / investigateur coordonnateur

Pr Jean-Hugues DALLE  
Service d'Hématologie Clinique  
Hôpital Robert Debré  
75019 Paris

Date : ...../...../.....  
Signature :

Directeur du DRCD

M. Christophe Misse  
Assistance Publique – Hôpitaux de Paris  
Département de la Recherche Clinique et du  
Développement  
Hôpital Saint Louis  
75010 PARIS

Date : ...../...../.....  
Signature :

La recherche a reçu une autorisation de la CNIL en date du .....

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RESUME</b> .....	<b>4</b>
<b>1. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE DE LA RECHERCHE</b> .....	<b>5</b>
1.1. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES RELATIVES AU DOMAINE CONCERNÉ.....	5
1.2. DESCRIPTION DE LA POPULATION À ÉTUDIER ET JUSTIFICATION DE SON CHOIX.....	9
1.3. DESCRIPTION DU OU DES ÉLÉMENTS SUR LESQUELS PORTE LA RECHERCHE.....	9
1.4. HYPOTHÈSES.....	15
1.5. RÉSULTATS ATTENDUS.....	16
<b>2. OBJECTIFS</b> .....	<b>16</b>
2.1. OBJECTIF PRINCIPAL.....	16
2.2. OBJECTIFS SECONDAIRES.....	16
<b>3. CALENDRIER DE SUIVI</b> .....	<b>17</b>
3.1. CRITÈRE D'ÉVALUATION PRINCIPAL ET, LE CAS ÉCHÉANT, CRITÈRES D'ÉVALUATION SECONDAIRES.....	17
3.2. POPULATION ÉTUDIÉE.....	20
3.3. DÉROULEMENT DE LA RECHERCHE.....	20
3.4. DURÉE DE LA RECHERCHE.....	23
<b>4. RISQUES (SI PRÉLÈVEMENTS)</b> .....	<b>23</b>
<b>5. ASPECTS STATISTIQUES</b> .....	<b>23</b>
5.1. DESCRIPTION DES MÉTHODES STATISTIQUES PRÉVUES Y COMPRIS LE CALENDRIER DES ANALYSES INTERMÉDIAIRES PRÉVUES.....	23
<b>6. GESTION DES DONNEES</b> .....	<b>24</b>
6.1. MODALITÉS DE RECUEIL DES DONNÉES.....	24
6.2. CIRCUIT DES DONNÉES.....	25
6.3. DROITS D'ACCÈS AUX DONNÉES DES SUJETS ET DOCUMENTS SOURCES.....	25
6.4. CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNÉES.....	25
<b>7. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ</b> .....	<b>25</b>
7.1. QUALIFICATION DES INTERVENANTS.....	25
<b>8. ASPECTS ETHIQUES ET LEGAUX</b> .....	<b>25</b>
8.1. RÔLE DU GESTIONNAIRE.....	25
8.2. MODALITÉS D'INFORMATION DES SUJETS ET LE CAS ÉCHÉANT, DE CONSENTEMENT.....	25
8.3. AVIS DU COMITÉ DE PROTECTION DES PERSONNES.....	26
8.4. TRAITEMENT DES DONNÉES À CARACTÈRE PERSONNEL – AUTORISATION CNIL.....	26
8.5. COLLECTION D'ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES.....	26
8.6. RESPONSABILITÉS VIS-À-VIS DU GESTIONNAIRE.....	26
8.7. RAPPORT FINAL DE LA RECHERCHE.....	26
<b>9. REGLES RELATIVES À LA PUBLICATION</b> .....	<b>27</b>
<b>10. BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>27</b>
<b>11. ANNEXES</b> .....	<b>32</b>
11.1. LISTE DES INVESTIGATEURS.....	32

## RESUME

- Titre long:** Immunomonitoring des infections à adénovirus (AdV), cytomégalovirus (CMV) et influenza pour l'aide aux indications individualisées des chimiothérapies antivirales, thérapies cellulaires et vaccinations en transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) chez l'enfant.
- Titre court:** Immunomonitoring des infections virales en transplantation de CSH pédiatrique.
- Gestionnaire:** Assistance Publique - Hôpitaux de Paris.
- Investigateur Coordinateur:** Pr. Jean-Hugues Dalle.
- Population concernée:** Pédiatrique à la transplantation de CSH et pendant les 6 premiers mois post-greffe.
- Nature de la recherche:** non interventionnelle, prospective, multicentrique.
- Nombre de sites:** 20 structures dans 7 CHU (Necker, Robert Debré, Bordeaux, Marseille, Lyon, Nantes et Nancy).
- Objectif principal:** 1) Identification de biomarqueurs immuno-virologiques corrélés à un contrôle viral. 2) évaluation de l'utilité de ces biomarqueurs en pratique courante.
- Résultats attendus:** Amélioration de la qualité des soins par une prescription individualisée des chimiothérapies, immunothérapies et vaccinations à visée antivirale.
- Critères d'inclusions:** Age de 0 à  $\leq 18$  ans, transplantation de CSH comportant un risque infectieux élevé (greffes phénoïdentes en situation de compatibilité  $\geq 9/10$ , haploïdentes et placentaires  $\geq 4/6$ )
- Critères de non inclusion :** Age > 18 ans ; greffe géno-identique
- Examens requis spécifiquement pour la recherche :** il s'agit d'une étude non interventionnelle, aucun examen non réalisé habituellement n'est requis pour cette recherche
- Critères d'évaluation:** 1) Corrélation entre le délai d'apparition et l'intensité de la réponse antivirale et le contrôle de la réplication virale dans le sang (CMV et ADV) ou les selles (AdV). 2) Corrélation entre le délai de la greffe à la vaccination anti-influenza et l'apparition d'anticorps anti-influenza circulants.
- Méthodologie statistique:** Analyse des critères immunologiques: réponses immunitaires anti-virales évaluées par tests de transformations lymphoblastiques et sécrétions de cytokines (données quantitatives) et recherche de corrélations entre ces critères immunologiques et les données virologiques, également quantitatives et les données cliniques.
- Nombre de patients prévus 200
- Calendrier:** Inclusions pendant 2 ans avec un suivi de 12 mois par patient.  
Durée totale de l'étude : 36 mois.

## 1. JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE DE LA RECHERCHE

### 1.1. Etat actuel des connaissances relatives au domaine concerné

Les infections continuent d'être une cause majeure de morbidité et mortalité après transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Si le traitement par Rituximab (anti-CD20) a profondément modifié le risque infectieux lié à l'EBV {Kuehnle, *et al* 2000}, les infections virales à CMV et adénovirus restent problématiques particulièrement chez l'enfant. Bien que le ganciclovir et le foscarnet ont une certaine efficacité pour le traitement du CMV {Boeckh, *et al* 2009}, ces drogues peuvent être toxiques voire inefficaces. Par ailleurs l'incidence des infections à adénovirus (AdV) est croissante, sans traitement véritablement efficace {Feuchtinger, *et al* 2007}. Enfin, les greffes de CSH exposent les receveurs à un risque infectieux majeur en cas de pandémie grippale.

Le risque infectieux est directement lié au niveau d'immunodéficience des patients. Les greffes de CSH non apparentées, haploidentiques et de sang de cordon s'accompagnent d'un retard à la reconstitution d'une immunité efficace. Par ailleurs, ces greffes s'accompagnent d'un risque de GvH (maladie du greffon contre l'hôte) plus élevé que les greffes géno-identiques. La survenue d'une GVH aiguë ou chronique sévère est responsable d'un déficit immunitaire profond et prolongé. Ces différentes circonstances sont des facteurs de risque infectieux majeur.

Le rôle des lymphocytes T dans les défenses immunitaires antivirales est primordial. Les analyses fonctionnelles de l'immunité cellulaire devraient ainsi constituer le meilleur biomarqueur pour évaluer le risque infectieux. En cas de déficit sévère de l'immunité cellulaire, le transfert adoptif de lymphocytes T immuns (CTL) spécifiques du CMV {Einsele, *et al* 2002; Peggs, *et al* 2003} et plus récemment de l'AdV {Leen, *et al* 2006; Feuchtinger, *et al* 2006} constituent une alternative thérapeutique prometteuse. La faisabilité du transfert adoptif de lymphocytes T immuns anti-influenza en cas de pandémie a également été démontrée très récemment {Stadtmauer, *et al* 2010}.

Ces traitements innovants lourds et très coûteux ne peuvent être envisagés sans un immunomonitoring performant précisant leurs indications et traçant leur efficacité.

**Le cytomegalovirus (CMV)** reste une cause majeure de complications infectieuses après transplantation de cellules souches hématopoïétiques tant chez l'adulte que chez l'enfant. La séropositivité du receveur pour le CMV avant greffe constitue un facteur de risque indépendant pour développer une infection à CMV post-greffe et également un facteur de mauvais pronostic pour la survie globale {Boeckh, *et al* 2004; Boeckh, *et al* 2004}. L'impact du statut CMV du donneur dépend du statut du receveur. Une positivité est préférable en cas de positivité du receveur alors qu'elle influe négativement sur le devenir des receveurs CMV négatif {Nichols, *et al* 2002; Ljungman, *et al* 2003}.

Des avancées récentes en matière d'outils diagnostiques avec en particulier l'introduction de PCR-CMV ainsi que l'utilisation d'agents antiviraux plus efficaces en prévention et plus encore en préemption ont contribué à diminuer l'incidence des réactivations et de leur progression vers le stade de maladie à CMV.

Des doses élevées d'acyclovir ou de valocyclovir utilisés **en traitement préventif** apparaissent efficaces pour réduire les infections et maladies précoces à CMV {Ljungman, *et al* 2002; Mori, *et al* 2006} mais ces résultats sont controversés et il n'existe aucune étude de pharmacocinétique de ces molécules chez l'enfant. La toxicité des chimiothérapies anti-CMV limite cependant leur intérêt. A titre d'exemple, le ganciclovir réduit le risque infectieux sans pour autant augmenter la survie globale en raison, en partie, des neutropénies sévères compliquant ce traitement. Par ailleurs, les traitements préventifs sont associés à une incidence accrue de maladies à CMV tardives. Un mécanisme possible pourrait être la reconstitution tardive de l'immunité cellulaire anti-CMV résultant de la diminution de la charge virale {Li, *et al* 1994}. Ainsi, de nos jours, les traitements préemptifs sont préférés aux traitements préventifs, les traitements préventifs restant limités, lorsqu'ils sont utilisés, aux patients à haut risque infectieux {O'Brien, *et al* 2008}.

Les indications **des traitements préemptifs** s'appuient sur les résultats du monitoring des réactivations CMV. Elles doivent également tenir compte du risque infectieux de chaque patient {Choi, *et al* 2005} pour réduire l'administration de ces agents toxiques lorsqu'elle est inutile (myélotoxicité pour le ganciclovir et néphrotoxicité et déséquilibre électrolytique pour le foscarnet) {Reusser, *et al* 2002; Ayala, *et al* 2006; Busca, *et al* 2007; Candoni, *et al* 2008}. C'est dans ces indications qu'un immunomonitoring permettant de repérer les patients dont le niveau de déficit immunitaire impose un traitement préemptif serait le plus profitable.

En cas de **maladie à CMV**, le traitement comporte du ganciclovir (ou du foscarnet) associé ou non à des fortes doses d'IgIV {Ljungman, *et al* 1998; Machado, *et al* 2000}. Un allègement de l'immunosuppression est conseillé lorsque le risque de GVH l'autorise.

Les lymphocytes T spécifiques du CMV jouent un rôle critique dans le contrôle des infections à CMV. Les progrès technologiques récents permettent aujourd'hui l'identification et la quantification des lymphocytes T spécifiques d'un nombre croissant de pathogènes incluant le CMV {Cwynarski, *et al* 2001}. L'évaluation de l'immunité anti-CMV chez les patients présumés à risque a été ainsi proposée pour mieux prédire le risque individuel d'évolution vers une maladie à CMV de chaque patient.

Chez les patients ayant un déficit immunitaire profond et en l'absence d'allègement possible de l'immunosuppression, l'injection de lymphocytes T spécifiques du CMV et issus du donneur voire d'une tierce

personne, constitue une alternative qui a fait la preuve de sa faisabilité, non toxicité et possible efficacité {Walter, *et al* 1995; Einsele, *et al* 2002; Peggs, *et al* 2003; Rauser, *et al* 2004}.

En résumé, le cytomegalovirus est responsable de morbidité et mortalité en transplantation de CSH en particulier en cas de séroposivité du receveur avant greffe. Un déficit immunitaire profond et prolongé post-greffe constitue le premier facteur de risque chez ces patients. L'utilisation de chimiothérapies anti-CMV a fait la preuve d'une certaine utilité. Elles sont cependant inefficaces en cas de déficit profond de l'immunité et exposent par ailleurs au développement de résistances et/ou d'infections tardives et à des effets secondaires importants. L'immunomonitoring du statut immunologique des patients à risque devrait permettre d'améliorer leur prise en charge individualisée.

**Les adenovirus (AdV)** sont classés en sous-groupes de A à F incluant 51 sérotypes différents. Les 6 sous-groupes sont responsables d'infections sévères bien que sous des formes cliniques différentes {Bruno, *et al* 2003}. Au décours d'une primo-infection, les AdV persistent chez l'enfant dans les tissus adénoïdes (Horwitz MS *et al* Lippincott Williams et Wilkins Philadelphia 2001 p2301). Les réactivations pourraient être plus fréquentes que les infections de novo en transplantation de CSH pédiatrique {Bruno, *et al* 2003} bien que des « épidémies » de service aient été rapportées.

L'incidence des infections sévères à AdV est augmentée en cas de déplétion T {Flomenberg, *et al* 1994}, GVHD, irradiation corporelle totale, greffe non apparentée et chez les plus jeunes patients {Bruno, *et al* 2003}. Une étude récente multivariée a indiqué que les infections à AdV étaient un risque indépendant de mortalité en transplantation de CSH pédiatrique.

Une surveillance hebdomadaire des PCR-AdV dans le sang pendant toute la période de déficit immunitaire profond post-greffe est recommandée. En cas de positivité, un traitement par ribavirine ou cidofovir est instauré préventivement. Ce traitement préemptif n'empêche pas toujours l'évolution vers une maladie à AdV grevée d'un taux de mortalité pouvant atteindre 50% {Kim, *et al* 2007}. Une surveillance virale non seulement dans le sang mais également dans les selles a été récemment recommandée pour initier plus précocement un traitement préemptif {Lion, *et al* 2010}. Ces traitements restent cependant inefficaces lorsque l'hôte est incapable de développer une immunité cellulaire spécifique. Plusieurs équipes ont proposé d'utiliser des critères biologiques immunologiques prédictifs d'infection non contrôlée pour l'indication précoce du transfert adoptif de lymphocytes T immuns issus du donneur {Chakrabarti, *et al* 2007}. La numération des lymphocytes totaux voire des lymphocytes TCD4 bien qu'accessibles à tous les centres sont des marqueurs insuffisamment précis. La numération de lymphocytes T spécifiques de l'AdV, bien que non standardisée représente le biomarqueur actuellement le plus fiable {Feuchtinger, *et al* 2006 ; Myers, *et al* 2007}.

En résumé, les infections à AdV sont une cause importante de morbidité et de mortalité en transplantation de CSH pédiatrique. Les chimiothérapies antivirales sont peu efficaces. Les transferts adoptifs ont prouvé leur bonne tolérance et constituent une approche thérapeutique prometteuse. Des initiatives en termes d'immunomonitoring dans le but de guider les cliniciens dans le choix des thérapeutiques à leur disposition sont nécessaires.

**Les virus influenza** sont classés en 3 types de virus A, B et C. Les virus A sont plus fréquemment responsables d'infection sévère que les virus B chez les receveurs de CSH. Les infections par le virus C sont virtuellement inexistantes chez l'homme. Les transplantations de CSH constituent un facteur de risque pour le développement de pneumopathie sévère en particulier après conditionnement myeloablatif (Schiffer J *et al* IDSA annual meeting Toronto 2006 p.183).

La vaccination assure une prévention efficace des infections sévères à influenza après transplantation de CSH {Ljungman, *et al* 2008}. Il est recommandé aux proches des patients d'être vaccinés tôt dans la saison. Chez les receveurs, l'effet protecteur des vaccins a pu être démontré lorsque la vaccination était pratiquée au delà du sixième mois suivant la greffe. Des vaccinations plus précoces ont été proposées en cas de pandémie {Ljungman, *et al* 2008}. Des études restent cependant à faire pour démontrer l'effet protecteur du vaccin lorsqu'il est administré dans les 6 premiers mois suivant la greffe.

Des chimiothérapies antivirales existent. Les inhibiteurs de neuraminidase sont préconisés plutôt que des inhibiteurs de M2 en raison de l'émergence de souches résistantes à l'amantidine et à la rimantidine {Bright, *et al* 2006; Nicholson, *et al* 2000}.

En cas de pandémie, des protocoles de chimioprophylaxie ont été proposés pour les patients immunodéprimés et une étude cas-contrôle utilisant de l'oseltamivir suggère que cette approche est bien tolérée {Vu, *et al* 2007}. Dans une récente étude, Stadtmayer et al ont montré la faisabilité de stratégies combinant vaccination et transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques et suggèrent l'intérêt de ces stratégies en cas de pandémie {Stadtmayer, *et al* 2010}.

En résumé, les infections sévères à virus influenza sont relativement peu fréquentes en transplantation de CSH grâce à une prévention par la vaccination de l'entourage et également du receveur au-delà du 6<sup>ème</sup> mois post-greffe. En cas de pandémie, l'efficacité de méthodes alternatives dont des vaccinations plus précoces voire des transferts adoptifs restent à démontrer.

Au total, les efforts considérables consentis au cours des dernières décennies pour limiter les morbidités et mortalités liées aux infections à EBV et CMV ont permis des avancées certaines. L'émergence d'autres pathogènes dont l'adénovirus et le risque de nouvelles pandémies dont influenza n'est qu'un exemple, justifient la



poursuite des efforts tant dans le domaine du diagnostic que dans l'évaluation des risques ou le développement d'alternatives thérapeutiques tant préventives que curatives.

La prise en charge individualisée des patients est devenue une priorité pour limiter les traitements abusifs voire toxiques et améliorer le rapport coût/qualité de la prise en charge du risque infectieux. L'utilisation plus large des analyses d'immunomonitoring devrait y contribuer.

## **1.2. Description de la population à étudier et justification de son choix**

Ces dernières années, les 7 centres pédiatriques participant à cette étude ont réalisé environ 75% de l'activité de greffe pédiatrique française, soit 180 à 200 greffes par an. Parmi ces greffes, 60% des patients reçoivent un greffon alternatif c'est-à-dire non issu de la fratrie. Ces patients représentent la population la plus à risque de développer une infection virale en raison d'une immunosuppression intense liée à la T-déplétion réalisée en pré-greffe in vitro (greffe haplo-identiques) ou in vivo (greffe phéno-identiques et greffes de sang placentaire non apparentées.

## **1.3. Description du ou des éléments sur lesquels porte la recherche**

### **1.3.1. Immunomonitoring du risque infectieux en transplantation de CSH**

La prédiction des transplantés qui feront des infections asymptomatiques alors que d'autres succomberont aux mêmes virus est encore de nos jours abordée essentiellement en reliant les morbi-mortalités à des paramètres cliniques tels que la nature du greffon (moelle, cellules souches périphériques ou sang de cordon) ; le niveau de compatibilité entre le donneur et le receveur (greffes apparentées, non apparentées et compatibilité pour le système HLA) ; l'intensité du conditionnement, l'immunosuppression post-greffe ou les complications immunologiques post-greffe dont principalement la sévérité des GVHD. Tous ces paramètres se résument en une balance dominée par les capacités de l'hôte à développer ou non une immunité antivirale efficace. Des méthodes permettant la détection de lymphocytes T spécifiques de pathogènes sont maintenant disponibles et leur pertinence en termes d'évaluation du risque infectieux est largement démontrée. Les tests fonctionnels évaluant les réponses prolifératives ou cytokiniques constituent de meilleurs marqueurs du risque infectieux que les tests énumérant les lymphocytes T antiviraux par la technique des tétramères {Ozdemir, *et al* 2002}. Ces tests fonctionnels qui commencent à se simplifier et à être plus ou moins standardisés se développent de plus en plus {Owens, *et al* 2000; Asemissen, *et al* 2001; Hobeika, *et al* 2005; Karlsson, *et al* 2003; Whiteside, *et al* 2003; Samri, *et al* 2006}. Toutes les études les utilisant ont montré une relation entre la capacité ou l'incapacité à reconstituer une immunité efficace et les morbidités/mortalités liées aux infections après transplantation {Quinnan, *et al* 1982; Reusser, *et al* 1991; Gratama, *et al* 2001; Ljungman, *et al* 2006; Pantaleo, *et al* 2006; Boeckh, *et al* 2003; Feuchtinger, *et al* 2006; Myers, *et al* 2007}. Malgré ces corrélations et à notre connaissance, aucune équipe n'a jusqu'à ce jour établi des protocoles de prise en charge thérapeutique incluant ces paramètres immunologiques.

### 1.3.2. Justifications méthodologiques

**L'analyse des lymphocytes T immuns antiviraux fonctionnels** peut être abordée par des tests de sécrétion de cytokines, de cytotoxicité et de prolifération. Les tests d'ELISPOT permettent d'énumérer les lymphocytes T sécrétant des cytokines ex-vivo après stimulation par des antigènes viraux {Hebart, *et al* 2002}. La numération de lymphocytes T antiviraux fonctionnels en cytométrie en flux est supposée moins sensible mais plus spécifique. Elle permet par ailleurs de tester simultanément plusieurs fonctions par marquage intracytoplasmique et également de préciser le phénotype des cellules fonctionnelles. Au cours des 10 dernières années, l'intérêt pour cette méthode a été croissant {Ghanekar, *et al* 2003} malgré sa lourdeur. La découverte récente du rôle distinct dans l'immunité virale des lymphocytes T sécrétant de l'IL2 et/ou de l'IFN $\gamma$  a renforcé encore son intérêt. En effet, des profils cytokiniques distincts permettent de repérer la présence de lymphocytes T sécrétant exclusivement de l'IFN $\gamma$ , caractéristiques d'une infection aiguë à charge virale élevée ou co-produisant IL2 et IFN $\gamma$  corrélés à une infection chronique à charge virale basse.

Parmi les lymphocytes T, les lymphocytes TCD8 jouent un rôle important dans la clairance virale. Les lymphocytes TCD4 contribuent à la différenciation des TCD8 en CTL (lymphocytes T cytotoxiques). Ils apparaissent par ailleurs indispensables au maintien de la mémoire des TCD8. Les lymphocytes TCD4 sont également indispensables au développement des réponses humorales antivirales. Enfin, les lymphocytes TCD4 peuvent exercer une fonction antivirale directe non seulement par le biais de sécrétion de cytokines mais également l'exercice de fonctions cytotoxiques. Ainsi, les thérapies cellulaires tentent, chaque fois que cela est possible, de transférer à la fois des TCD4 et des TCD8 immuns bien que l'ensemble de ces traitements utilisent la dénomination générique de transfert adoptif de CTL.

Concernant l'intérêt respectif des CD4 et des CD8 en termes de biomarqueurs, tout laisse à penser que la présence de lymphocytes TCD4 immuns pourrait constituer un meilleur marqueur de l'acquisition d'une immunité T protectrice de longue durée que la seule présence de TCD8 immuns {Sester, *et al* 2001}.

### 1.3.3. Travaux antérieurs de l'équipe

Depuis 2007, nous nous sommes attachés à identifier des biomarqueurs caractérisant la capacité des enfants greffés à se défendre ou non contre le CMV et l'AdV. La menace d'une pandémie influenza en 2009, liée à l'émergence d'un nouveau virus H1N1 nous a également conduit pendant la saison 2009-2010 à développer une méthode permettant d'évaluer l'immunogénicité du vaccin pandémique H1N1 au moins en terme d'immunité cellulaire. Nous avons par ailleurs développé une méthode rapide d'isolement des lymphocytes immuns anti-adénovirus à visée thérapeutique et utiliser cette méthode pour traiter plusieurs patients.

Pour répondre aux bonnes pratiques en terme d'identification de biomarqueurs, les études d'immunomonitoring ont été précédées par l'évaluation de l'ontogénèse de l'immunité cellulaire chez l'enfant sain afin d'établir les valeurs de références en fonction de l'âge.

Dans cette **étude préliminaire** publiée dans *Pediatric Research* 2010 {Pedron, *et al* 2010}, les intensités de réponses prolifératives et cytokiniques ex vivo après stimulation par l'adénovirus et le CMV ont été analysées chez 57 enfants sains (donneurs volontaires de moelle) âgés de 0 à 16 ans. Dix-sept adultes ont également été inclus comme contrôle interne. Les résultats ont montré :

- 1) Des réponses prolifératives optimales à l'adénovirus et au CMV dès l'âge de 2 ans.
- 2) une augmentation continue de 0 à 18 ans de l'intensité des réponses IFN $\gamma$  anti-CMV contrastant avec une intensité optimale des réponses anti-adénovirus dès l'âge de 2 ans
- 3) La prédominance d'une réponse IFN $\gamma$  dans les infections à CMV contrastant avec une réponse polyfonctionnelle IL $_2$ + IFN $\gamma$  prédominante dans les infections à adénovirus.
- 4) Un déficit qualitatif et quantitatif des réponses cytokiniques anti-CMV et anti-AdV chez les enfants de moins de 2 ans.

Ainsi l'immunité cellulaire anti-CMV et AdV peut être évaluée chez les enfants transplantés et âgés de plus de 2 ans. Des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer l'incidence de la spécificité des réponses immunes cellulaires des enfants de moins de 2 ans.

Une **deuxième étude** a consisté à établir des corrélations entre les intensités et cinétiques de reconstitution de l'immunité cellulaire anti-CMV d'une part et les infections à CMV classées en 3 catégories de gravité croissante :

- infection sans dissémination virale sanguine
- virémie asymptomatique
- maladie à CMV

Les résultats ont été publiés dans *Bone Marrow Transplant* 2010 {Guerin, *et al* 2010}.

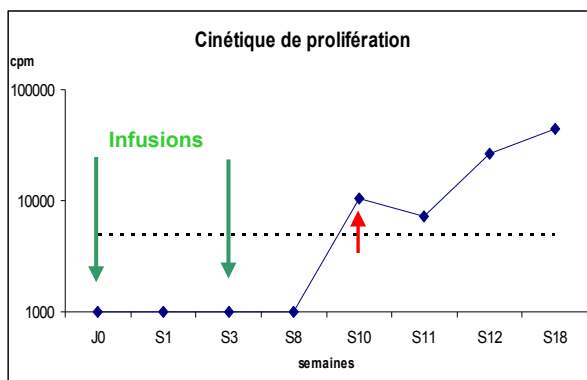
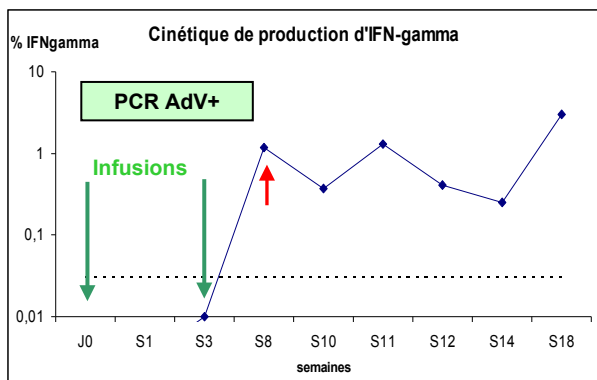
Dans cette étude, 30 enfants (âge médian 8 ans ½) ont été inclus. 13 receveurs ayant un statut sérologique négatif vis à vis du CMV avant la greffe et chez lesquels les PCR-CMV sont restées négatives n'ont pas reconstitué d'immunité cellulaire anti-CMV (évaluée par des tests de prolifération et de sécrétion d'IFN $\gamma$ ). Chez les 17 receveurs CMV<sup>+</sup> avant la greffe, l'intensité des réponses cytokiniques anti-CMV étaient inversement corrélées aux intensités et durées des virémies CMV. Le seul enfant ayant développé une maladie à CMV avait des réponses prolifératives et cytokiniques indétectables. En complément du monitoring viral, l'analyse de ces biomarqueurs nous paraît en conséquence important à considérer pour l'indication des traitements préemptifs anti-CMV (voir objectifs spécifiques du projet).

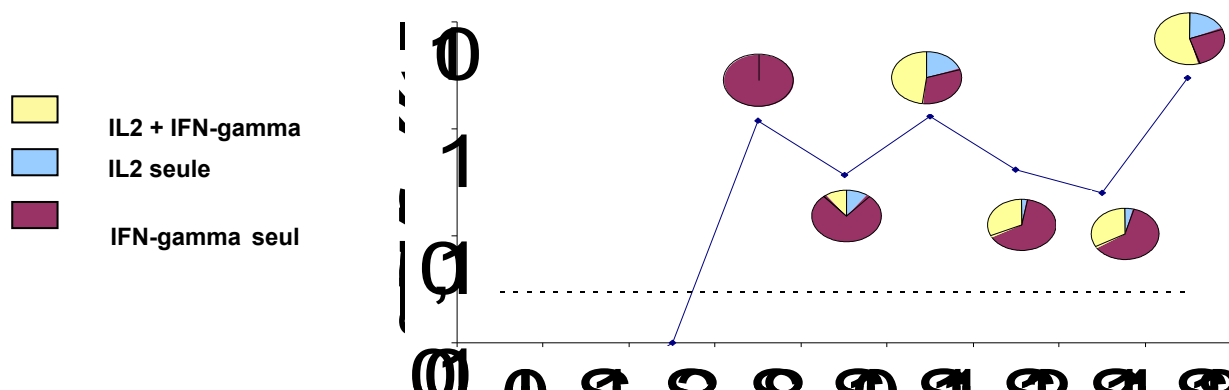
Une **troisième étude** a consisté à établir des corrélations entre les intensités et cinétiques de reconstitution de l'immunité anti-AdV d'une part et les infections à AdV associées à une virémie (avec ou sans symptômes en

raison de la sévérité du pronostic dès l'apparition d'une virémie). Ces résultats ont été publiés dans Biol. Bone Marrow Transplant, 2010 {Khourouj, *et al* 2010}. Dans cette étude, 47 enfants (âge médian : 6.4 ans ; extrêmes : 0.4-16.2 ans) ont été inclus à la greffe (23 greffes géno-identiques, 18 non apparentées avec une compatibilité HLA 10/10 (n=9) ou 9/10 (n=9) et 6 cordons). La numération des lymphocytes TCD4 sécrétant de l'IFN $\gamma$  et/ou de l'IL $_2$  en réponse à l'adénovirus ex vivo a été confrontée à la diffusion du virus dans le sang (évalué par PCR) et aux symptômes cliniques. Les résultats ont indiqué qu'environ les 2/3 des enfants développaient une immunité cellulaire anti-adénovirus dans les 3 mois suivant la greffe sans diffusion du virus dans le sang et sans symptôme clinique d'infection à adénovirus (infections contrôlées). 3 enfants ont été virémiques. Dans les 3 cas, il s'agissait d'une greffe non apparentée avec une compatibilité HLA 9/10 entre le donneur et le receveur. Dans les 3 cas, les réponses cellulaires tant en termes de réponses prolifératives que de réponses cytokiniques étaient indétectables. Un des patients est décédé avant l'administration de CTL.

L'existence d'une virémie AdV en l'absence d'immunité détectable a été considérée comme un signe de gravité chez les 2 autres. Le transfert adoptif de lymphocytes immuns du donneur a coïncidé avec un contrôle de l'infection. Ces deux enfants sont actuellement vivants et bien portants. Le profil de la reconstitution de l'immunité cellulaire après administration (non publié) est illustré ci-dessous.

### Cinétique de reconstitution d'une réponse anti-AdV après transfert adoptif





Dans cet exemple, une reconstitution immunitaire contemporaine de la négativation des PCR dans le sang renforce l'idée d'une efficacité des administrations de CTL anti-AdV.

Le développement successif d'une réponse effectrice ( $IFN\gamma$ ) suivie d'une réponse IL2 +  $IFN\gamma$  suggère l'acquisition d'une protection de longue durée.

La poursuite de ce travail consistera à évaluer si l'analyse conjointe de ces biomarqueurs et des PCR dans les selles plutôt que dans le sang permettrait une indication du transfert adoptif plus précoce (avant l'apparition d'une PCR positive dans le sang accompagnée d'une mortalité élevée) pour une meilleure prise en charge des patients (voir section objectifs spécifiques du projet).

Une **quatrième étude** a consisté à évaluer les performances respectives des tests de prolifération (3HT) et d'accumulation intracytoplasmiques de cytokines (cytométrie en flux) pour déterminer l'immunogénicité des vaccins influenza lorsqu'ils doivent être administrés aux temps précoces post-transplantation en raison d'une pandémie. Les résultats de cette étude (acceptés dans deux congrès « ASH 2010 et Vaccinology 2010 ») indiquent :

- une meilleure sensibilité du test de prolifération que des tests cytokiniques pour évaluer l'immunogénicité des vaccins influenza inactivés (avec ou sans adjuvant).
- les tests cytokiniques apportent néanmoins, lorsqu'ils sont positifs, des informations complémentaires en révélant des profils cytokiniques distincts après vaccination versus immunisation naturelle (syndrome grippal associé à une PCR positive dans les sécrétions nasales). La signification en termes de protection de chacun de ces profils reste à déterminer.

Cette étude a par ailleurs permis d'ores et déjà de conclure à une immunogénicité des vaccins influenza inactivés sans adjuvants dès le 3<sup>ème</sup> mois post-greffe en cas de greffe génoïdente chez l'enfant. La poursuite du travail consistera à déterminer les temps les plus précoces compatibles avec une immunogénicité après greffe non apparentée phénoïdente (9/10 et 10/10 séparément), haploïdente et cordonale.

Le transfert de CTL anti-AdV a pu être réalisé grâce à la production par une des équipes participant au projet de ce produit thérapeutique selon une méthode publiée {Aissi-Rothe, *et al* 2010}. En bref, les cellules mononucléées Adenogreffe.NI11047 – V 1-0 du 29/06/2012

isolées à partir du sang périphérique des donneurs sont stimulées 6 heures avec des peptides de l'AdV. Les cellules sécrétant de l'IFN $\gamma$  en réponse à cette stimulation sont isolées par tri magnétique. La caractérisation des cellules triées indique 1) une prédominance de TCD4 immuns, 2) les capacités de prolifération et de cytotoxicité des lymphocytes après tri vis à vis du virus, 3) l'absence de réactivité allogénique de la préparation.

### **Références**

- Aissi-Rothe L, Decot V, Venard V, et al. Rapid generation of full clinical-grade human antiadenovirus cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy. 2010 *J Immunother*;33:414-424.
- Guerin, V., J. H. Dalle, B. Pedron, M. Ouachee-Chardin, K. Yakouben, A. Baruchel and G. Sterkers "Cellular immune parameters associated with spontaneous control of CMV in children who underwent transplantation." *Bone Marrow Transplant* 45(3): 442-9.
- Khourouj, V.G., Dalle, J.H., Pedron, B., Yakouben, K., Bensoussan, D., Cordeiro, D.J., Peltier, L., Ouachee-Chardin, M., Baruchel, A. & Sterkers, G. Quantitative and qualitative CD4 T-cell immune responses related to adenovirus DNAemia in hematopoietic-stem cell transplantation. 2010 *Biol Blood Marrow Transplant*. **In press**.
- Pedron, B., Guerin, V., Cordeiro, D.J., Masmoudi, S., Dalle, J.H. & Sterkers, G. Development of cytomegalovirus (CMV) and adenovirus-specific memory CD4 T-cell functions from birth to adulthood. 2010 *Pediatric research*. **In press**.
- V. Guérin-El Khourouj, M.-L. Frémond, M. Duchamp, B. Pédrón, A. Baruchel, G. Sterkers, J.-H. Dalle. Cellular immune responses in hematopoietic-stem cell transplanted (HSCT) pediatric patients after pandemic H1N1 vaccination. *Colloque de vaccinologie SFI/IMMI*. Marseille, Paris, **22-23 novembre 2010** (voir détails des résultats ci-dessous).

# Cellular immune responses in hematopoietic-stem cell transplanted (HSCT) pediatric patients after pandemic H1N1 vaccination

Valérie Guérin-Ei Khourouj<sup>(1)</sup>, Marie-Louise Frémond<sup>(2)</sup>, Marie Duchamp<sup>(1)</sup>, Béatrice Pédrón<sup>(1)</sup>, André Baruchel<sup>(2)</sup>, Ghislaine Sterkers<sup>(1)</sup>, Jean-Hugues Dalle<sup>(2)</sup>.  
 (1): Laboratoire d'Immunologie, Hôpital Robert Debré, Paris, France, APHP et Université Paris VII. (2): Service d'Hématologie, Hôpital Robert Debré, Paris, France, APHP et Université Paris VII.

## INTRODUCTION

Influenza vaccination performed at least six months after hematopoietic-stem cell transplantation (HSCT) appears safe and efficient. The existing data supporting the recommendations to vaccinate earlier in case of pandemy are less robust. Although cellular immunity evaluation could correlate better than serum antibodies titers with protection to Flu in at-risk populations, no convenient and reproducible cellular assay is available. Here we compared the performance of a proliferation assay and an intracellular cytokine assay to measure the immunogenicity of the 2009 H1N1 vaccines performed as early as 2.5 months following HSCT.

## PATIENTS AND METHODS

28 HSCT recipients, aged 4.8y (1.4-16.9) were transplanted after myeloablative conditioning from Jan'09 to Apr'10. Fourteen were vaccinated with H1N1 vaccine followed in 4 cases by seasonal vaccine. Fourteen were not vaccinated, of whom one developed H1N1 flu. The main characteristics of HSCT recipients are given in the table. Seven healthy individuals, >13y of age, vaccinated with both the pandemic H1N1 and the seasonal (H1N1+H3N2+B) vaccines were used as controls.

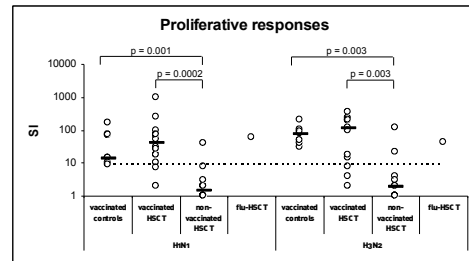
T-cell proliferation (3HT incorporation) and enumeration, by flow cytometry, of CD4+ T-cells secreting IFN $\gamma$  and IL2 in response to in vitro stimulation with inactivated H1N1 (A/PR8) and H3N2 (A/X31) viruses were evaluated. The assays were performed from Mar'10 to Sept'10, at time to HSCT indicated in the table.

Characteristics	All vaccinated (HSCT n=14)	Non-vaccinated (HSCT n=14)
Mean age, mean (range)	4.8 (1.4-16.9)	4.8 (1.4-16.9)
Male/female	9/5	9/5
Underlying disease, n (%)		
- Acute leukemia	6	6
- Myeloid leukemia	1	1
- Other	7 <sup>a</sup>	7 <sup>b</sup>
Conditioning regimen		
- Myeloablative	14 (100%)	14 (100%)
IL2 dose (mg/kg), n (%)		
- 180 IU/kg (n=14)	14	14
- 360 IU/kg (n=0)	0	0
- 720 IU/kg (n=0)	0	0
- 1440 IU/kg (n=0)	0	0
- 2880 IU/kg (n=0)	0	0
Fluorouracil (mg/m <sup>2</sup> ) following HSCT (days)	171 (3-180)	-
Timing of vaccination to entry and remission	140 (99-240)	-
Mean follow-up (range) (months)	102 (21-175)	176 (108-278)

## RESULTS

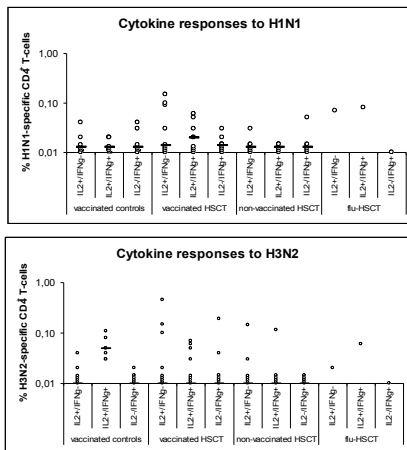
### Proliferative responses to H1N1 and H3N2

- All vaccinated controls evidenced proliferative responses to the H1N1 and also to the H3N2 strain with stimulation index (SI)  $\geq$  9.
- 12/14 (86%) vaccinated HSCT recipients evidenced SI  $\geq$  9 in response to H1N1, with median SI similar to controls' (61 and 14 respectively). 8/14 also evidenced responses to H3N2. Strikingly, 6/8 that responded to both H1N1 and H3N2 were vaccinated against the only H1N1 strain.
- As expected from myeloablative regimen that preceded HSCT, responses to H1N1 and H3N2 were at background in a large proportion of non-vaccinated HSCT recipients.
- In total, H1N1 SI were lower in non-vaccinated than in vaccinated HSCT (p=0.0002) and than in controls (p=0.001). Also, H3N2 SI were lower in non-vaccinated than in vaccinated HSCT and than in controls (p=0.003 in both cases).



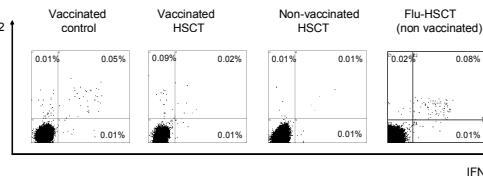
### Cytokine responses to H1N1 and H3N2

- 7/7 (100%) controls evidenced cytokine responses to H3N2 but only 2/7 (29%) to H1N1.
- Among 9 vaccinated HSCT recipients that were evaluated for cytokine-responses, 5 (56%) and 6 (67%) evidenced CD4+ T-cells secreting cytokines in response to H3N2 and H1N1 respectively.
- Only 2/13 (15%) non vaccinated (and non infected) HSCT recipients evidenced cytokine responses to H1N1 and/or H3N2.



### Four representative profiles of cytokine responses to H1N1.

- Upper-left: CD4+ T-cells secreting IL2 alone (IL2<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>-</sup>)
- Upper-right: CD4+ T-cells secreting IL2 and IFN $\gamma$  (IL2<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup>)
- Lower-right: CD4+ T-cells secreting IFN $\gamma$  alone (IL2<sup>-</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup>)



In controls, influenza-specific CD4+ T-cells secreting IFN $\gamma$  and IL2 predominated over CD4 secreting IFN $\gamma$  alone or IL2 alone whereas influenza specific CD4 secreting IL2 alone predominated in vaccinated HSCT.

Finally, the Flu-infected, non-vaccinated HSCT recipient evidenced both proliferative and cytokine-responses highly similar to that of controls.

## CONCLUSION

In conclusion, H1N1 vaccine could induce heterosubtypic cellular immunity in pediatric HSCT (since 2 months post-HSCT in genotypical condition). Proliferative assay could be more sensitive than cytokine assay and cytokine profiles could differ in natural and vaccine immunization. How these different profiles correlate with host defense remain to be clarified.

## 1.4. Hypothèses

1. Les résultats obtenus par notre groupe collaboratif, depuis 2007, démontrent la faisabilité des numérations de lymphocytes T antiviraux pour évaluer le risque infectieux en transplantation de CSH pédiatrique et pour le

monitoring des transferts adoptifs. Notre hypothèse est la possible mise en application de cet immunomonitoring en pratique clinique pour guider les traitements préemptifs et curatifs en transplantation de CSH. Cet immunomonitoring devrait en effet permettre d'améliorer la prise en charge des patients par l'élaboration de protocoles thérapeutiques individualisés. L'immunomonitoring des transferts adoptifs devrait par ailleurs aider à l'évaluation de leur efficacité et également fournir des informations importantes sur la nature des cellules administrées corrélées à un contrôle viral à court et long terme.

2. Les résultats préliminaires concernant l'immunogénicité des vaccins anti-influenza suggèrent la possibilité de conférer une protection dès le 3<sup>ème</sup> mois post-HSCT en cas de greffe de moelle génoidentique. Un délai similaire entre la greffe et la vaccination pourrait être appliqué en cas de greffe non apparentée, haploidentique ou greffe de sang de cordon et entraîner l'apparition d'une immunité efficace contre l'influenza.

### **1.5. Résultats attendus**

En raison de leur lourdeur et malgré un intérêt réel, peu d'équipes utilisent en pratique clinique, des tests fonctionnels immunologiques prédictifs du risque infectieux après greffe de CSH. Une standardisation en cours, au niveau national, devenue indispensable dans le cadre des accréditations COFRAC devrait permettre leur plus large diffusion en France.

Nos travaux, au cours des 3 dernières années, nous permettent d'ores et déjà d'alléger les monitorings virologiques et pourraient limiter les indications de traitements préemptifs abusifs dans les infections à CMV. L'évaluation des monitorings AdV dans les selles conjointement à l'immunomonitoring des réponses anti-AdV pour une préparation précoce des transferts adoptifs dans les infections qui seront résistantes aux chimiothérapies antivirales est en cours. Le monitoring des vaccinations influenza contribuera par ailleurs à définir les conditions optimales de ces vaccinations.

## **2. OBJECTIFS**

### **2.1. Objectif principal**

Décrire la corrélation entre la cinétique et l'intensité des biomarqueurs immuno-virologiques et le contrôle viral (CMV, Adénovirus, Influenza) chez les enfants ayant bénéficié d'une transplantation de souches hématopoïétiques, comportant un risque infectieux élevé.

### **2.2. Objectifs secondaires**

1. Evaluer les modalités de l'utilisation de biomarqueurs immunovirologiques pertinents pour guider la prescription des traitements préemptifs et/ou curatifs antiviraux.
2. Evaluer l'impact de l'usage de ces biomarqueurs sur la prescription individualisée des chimiothérapies et de l'immunothérapie anti-adénovirus et anti-cytomégalo virus.



3. Evaluer l'immunogénicité des vaccins trivalents inactivés non adjuvantés en fonction de la date de vaccination post-greffe afin d'optimiser le calendrier vaccinal anti-influenza.
4. Évaluer la pertinence de la suspension du monitoring viral du CMV chez les patients ayant un taux de  $\geq 1$  CD4 immun/mm<sup>3</sup> et receveurs de greffes phénoïdiques R+CMV.
5. Évaluer la pertinence de sursoir aux traitements préemptifs spécifiques anti-viraux chez tous les patients ayant  $\geq 1$  CD4 immun spécifique /mm<sup>3</sup> à l'exclusion des greffes accompagnées d'infections symptomatiques d'autres natures et/ou de GVHD corticodépendantes ou résistantes.

### 3. CALENDRIER DE SUIVI

Les médecins des centres recruteurs proposeront à tout enfant éligible de participer à l'étude Adenogreffe. Dans le cadre du suivi habituel pré et post-greffe, des prélèvements de sang et de selles sont réalisés régulièrement, le plus souvent sur un rythme hebdomadaire jusqu'à J90 post-greffe et parfois plus tardivement en fonction de l'état clinique de l'enfant. Certains de ces prélèvements seront utilisés dans le cadre de ce protocole. Aucun prélèvement supplémentaire n'est nécessaire pour la recherche.

Prélèvements à visée virologique :

- un prélèvement sanguin et de selles avant la greffe
- des prélèvements sanguins et de selles après la greffe, toutes les semaines jusqu'à sa sortie d'hospitalisation puis toutes les semaines ou tous les 15 jours lors de ses venues en hôpital de jour jusqu'à J90 post-greffe puis au troisième, sixième et douzième mois post-greffe. La survenue d'un épisode d'infection virale peut conduire à la réalisation de prélèvements supplémentaires en routine (selon les habitudes du centre de prise en charge) jusqu'à négativation. Un prélèvement mensuel, sanguin et fécal, sera analysé de façon centralisé jusqu'à négativation.

#### 3.1. Critère d'évaluation principal et, le cas échéant, critères d'évaluation secondaires

3.1.1. Critères d'évaluations principaux :

- délai d'apparition de la réponse antivirale
- intensité de la réponse antivirale
- contrôle de la réplication virale : AdV dans le sang et les selles, CMV dans le sang ou Influenzae dans les sécrétions nasales en cas de syndrome grippal.

La réponse antivirale est évaluée par : numération de lymphocytes immuns circulants (indiqués en % et valeurs absolues) vis-à-vis de chacun des virus pour lesquels la réponse immunitaire est étudiée : CMV, adénovirus et dans certains cas Influenzae virus.

La réplication virale est évaluée par Les résultats des PCR-CMV (sang) -EBV (sang), -AdV (sang et selles) pendant au moins les 3 premiers mois post-greffe et à tout moment en cas de symptômes, et influenza (nasales)

en cas de syndrome grippal, Le contrôle de la réplication virale est défini par la négativation du prélèvement concerné.

3.1.2. Critères dévaluation secondaires :

- Caractéristiques cliniques
- Statut vaccinal post-greffe
- Statuts sérologiques pour le CMV des donneurs et receveur,
- Nature du greffon et les doses de cellules greffées,
- La nature et la composition du conditionnement,
- Nature et les doses des traitements immunosuppresseurs,
- Grades de GVH aigue/chronique et leur traitement,
- Episodes infectieux ainsi que leur traitement et complications éventuelles,

Examen/date	M0	Transplantation	M1				M2				M3 *				M4	M5	M6	M8	M12
			S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4					
Examen clinique	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vérification des critères d'inclusion et de non inclusion et accord parental	X																		
PCR Adv (prélèvement sanguin + selles)			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X <sup>°</sup>	X	X				
PCR CMV (prélèvement sanguin)			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X <sup>°</sup>	X	X				
Analyses immunologiques	X		X								X						X	X*	X*
Numération des lymphocytes T antiviraux (CMV, AdV et H3N2)			X								X						X	X*	X*

X\* Chez un nombre réduit d'enfants des prélèvements seront également réalisés à M8 et M12 dès lors qu'aucune reconstitution immunitaire n'aura été observée à M6

M3 \* : X<sup>°</sup> : En cas de PCR positive à M3 ou en cas de GVHD  $\geq$  grade 2 les analyses seront renouvelées chaque semaine jusqu'à négativation.

## **3.2. Population étudiée**

### 3.2.1. Recrutement de la population

L'étude sera proposée dans les centres recruteurs, de manière consécutive à tous les enfants répondant aux critères d'inclusion. La non-opposition des titulaires de l'autorité parentale et du patient (si âge > 7 ans) doit être notifiée dans le dossier médical du patient. Il est prévu d'inclure 200 enfants au total. Tous les enfants participeront aux études portant sur les infections AdV (tous les enfants consécutifs à haut risque infectieux), 30 enfants vaccinés par le virus influenza participeront à cette partie du protocole, et 100 enfants, CMV positif (donneur et/ou receveur) participeront aux études portant sur les infections CMV

### 3.2.2. Critères d'éligibilité (critères d'inclusion et de non inclusion)

#### 3.2.2.1. Critères d'inclusion

- < 18 ans d'âge.
- Rémission complète en cas d'hémopathie maligne.
- Greffes à haut risque infectieux : 1) moelle ou CSP (cellules souches périphériques) non apparentées et/ou en compatibilité partielle pour le système HLA (dont greffes haploidentiques), 2) greffes de sang placentaire apparentées ou non.

#### 3.2.2.2. Critères de non-inclusion

- ≥ 18 ans.
- Greffes géno-identiques (à partir de la fratrie).
- Refus de participation à l'étude

## **3.3. Déroulement de la recherche**

### 3.3.1. Suivi de la population

La durée moyenne de séjour en hospitalisation en secteur de greffe est d'environ 45 jours puis le suivi ultérieur est assuré à raison d'au moins un séjour en hospitalisation de jour par semaine jusqu'au 3ème mois post-greffe inclus. Au-delà, selon l'état général de l'enfant, le suivi sera effectué en hôpital de jour ou en consultation à raison d'une consultation toutes les 4 à 6 semaines durant la première année post-greffe.

Chaque enfant disposera d'un cahier d'observation et de recueil spécifique au protocole dans lequel seront consignés l'ensemble des items indispensables à la présente recherche, en particulier, stade de la GvH et traitement, données virologiques et données immunologiques.

### 3.3.2. Procédure de prélèvement, lieu de recueil

Les prélèvements destinés aux analyses immunologiques seront effectués sur sang veineux prélevé sur ACD à M0 (avant greffe), M1, M3 et M6. Chez un nombre réduit d'enfants des prélèvements seront également réalisés à M8 et M12 dès lors qu'aucune reconstitution immunitaire n'aura été observée à M6. Les prélèvements destinés aux analyses immunologiques seront couplés aux prélèvements effectués pour le soin de l'enfant, dont les analyses virologiques. Ces prélèvements seront effectués dans le cadre du soin, aucun prélèvement supplémentaire ne sera réalisé dans le cadre de la recherche.

Les prélèvements virologiques seront réalisées dans le cadre du soin : PCR-AdV dans le sang et les selles et PCR-CMV dans le sang chaque semaine pendant au moins les premiers 3 mois suivant la transplantation et numération des lymphocytes T antiviraux (CMV, AdV et H3N2) à 1 mois, 3 mois et 6 mois après la greffe.

### 3.3.3. Traitement des prélèvements

#### 3.3.3.1. Analyses virologiques

Des PCR seront effectuées chaque semaine dans le sang (CMV) et le sang et les selles (AdV) pendant les 3 premiers mois dans les laboratoires de virologie auxquels chaque centre fait habituellement appel ainsi qu'à M4 et M5.

En cas de PCR positive à M3 ou en cas de GVHD  $\geq$  grade 2 les analyses seront renouvelées chaque semaine jusqu'à négativation.

Des PCR influenza (sécrétions nasales) seront effectuées en cas de syndrome grippal, comme il est d'usage dans ce type de situation clinique.

Les analyses virologiques, sang et selles, prévues dans le tableau de suivi des patients seront centralisées à l'hôpital Saint Louis. Les échantillons prélevés seront conservés dans les centres à -80°C et acheminés au laboratoire de microbiologie à l'hôpital Saint Louis sous la responsabilité du Dr Jérôme Le Goff.

#### 3.3.3.2. Analyses immunologiques

Les tests immunologiques seront effectués dans les 7 centres dans un délai de 4 heures maximum après les prélèvements.

Les sept sites participant au projet ont une expertise reconnue dans la réalisation des tests analysant les réponses cytokiniques par les méthodes ELISPOT et/ou en cytométrie en flux. Chaque site participant au projet continuera d'utiliser son propre protocole. Cette attitude est conforme à avec une étude multicentrique récente faisant référence et évaluant comparativement les 2 approches méthodologiques dans 7 centres. Elle est basée sur la prise en considération que chacun des sites participant au projet a configuré son propre protocole pour obtenir des résultats optimaux. Des analyse simultanées, à partir du même prélèvement, sur les sites Robert Debré et Nancy utilisant les techniques de CMF et ELISPOT respectivement ont par ailleurs aboutit a des

conclusions identiques en terme de réponses indétectables, faibles ou corrélées à une protection malgré l'utilisation d'unités distinctes.

Enfin, les 7 sites ont rapporté des éventails de valeurs similaires aux données de la littérature chez les individus sains immunisés.

#### 3.3.3.2.1. Réponses prolifératives par incorporation de thymidine tritiée

Les lymphocytes sont isolés par une technique de gradient de centrifugation.  $10^5$  lymphocytes resuspendus dans du milieu de culture supplémenté en SAB 10% sont distribués dans chaque puits, en triplicate et cultivés 6 jours soit 1) sans stimulus (contrôle négatif), 2) en présence d'anticorps monoclonaux anti-CD3 (1 $\mu$ g/ml) et anti-CD28 (1 $\mu$ g/ml) auquel est ajoutée de l'IL2 (1ul/ml) les 3 derniers jours de culture (contrôle positif), 3) en présence d'un lysat de virus AdV, 4) ou de la protéine Hexon, 5) ou d'un lysat de virus CMV, 6) ou des virus influenza inactivés à des dilutions pré-établies pour donner des réponses optimales. La thymidine tritiée est ajoutée au 6<sup>ème</sup> jour de culture. Après 6 heures additionnelles, les lymphocytes sont collectés et leur radioactivité est comptée. Les résultats sont exprimés en moyenne de cpm et index. Le cut-off de positivité a été établi à 5000 cpm avec un index au minimum de 5.

#### 3.3.3.2.2. Réponses cytokiniques

##### 1. Test d'accumulation de cytokines analysées en cytométrie en flux (IFN $\gamma$ et IL $_2$ ).

Les lymphocytes isolés comme ci-dessus sont stimulés pendant 1 heure dans 1ml de milieu de culture supplémenté en SVF (10%) avec les mêmes activateurs polyclonaux ou antigènes que ci-dessus, puis cultivés pendant 17 heures additionnelles en présence de brefeldine. A ce terme, ils sont centrifugés et marqués par une combinaison de 5 anticorps fluorescents CD3/CD4/IFN $\gamma$ /IL2/IL17. L'analyse est faite sur un cytomètre au moins 5 couleurs après trois fenêtres encadrant successivement les lymphocytes, puis la sous-population T (CD3 $^+$ ) et enfin les T-CD4 (CD4 $^+$ ). Le pourcentage de cellules sécrétant soit de l'IL2, soit de l'IFN $\gamma$ , soit les deux, est déterminé parmi les CD4 $^+$  et les T-CD4 $^-$  (c'est-à-dire CD8). Les valeurs absolues par  $\mu$ l de sang circulant seront établies en multipliant ce pourcentage par la valeur absolue des T-CD4 $^+$  et T-CD4 $^-$  (c'est-à-dire T-CD8 $^+$ ) comptés par cytométrie en flux à partir d'une prescription dans le cadre du soin courant, le jour même à partir de 2ml sur EDTA soit à défaut à partir de 50 $\mu$ l du prélèvement destinés aux tests cytokiniques.

##### 2. Technique Elispot

Les cellules mononucléées du receveur seront mises en contact pendant 20 heures avec les antigènes précédemment décrits dans des plaques de nitrocellulose multiscreen préalablement coatées avec un anticorps anti-IFN $\gamma$  (Mabtech, Suède). La révélation est réalisée avec les réactifs Mabtech et une réaction enzymatique avec le substrat de la phosphatase alcaline permet de colorer les spots. Les plaques sont lues sur un lecteur automatisé Bioreader 4000 Pro S, avec un programme de lecture spécifique. Des manipulations préliminaires sur

témoin sain ont permis de valider les conditions de réalisation de l'Elispot. Un minimum de  $5.10^5$  cellules mononucléées doit être déposé dans les puits afin d'observer un nombre de spots en moyenne de 100 chez un témoin sain. Les valeurs absolues seront obtenues en multipliant les pourcentages par la valeur absolue des lymphocytes totaux.

#### 3.3.4. Devenir des échantillons

Après analyse, le reliquat des échantillons sera éliminé conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.

### 3.4. Durée de la recherche

Période d'inclusion : 2 ans

Durée de suivi par patient : 12 mois.

Durée totale de l'étude : 36 mois.

### 4. RISQUES (si prélèvements)

Aucun risque lié aux prélèvements car ils sont effectués dans le cadre du soin.

### 5. ASPECTS STATISTIQUES

!

#### 5.1. Description des méthodes statistiques prévues y compris le calendrier des analyses intermédiaires prévues

Les cas sans reconstitution immunitaire anti-AdV et/ou anti-CMV en l'absence de signe clinique et/ou virologique d'infection seront interprétés comme « non infectés » et exclus des analyses ultérieures. Tous les autres dossiers seront évalués.

L'analyse consistera en corrélations entre :

- les délais d'apparition et l'intensité d'une réponse T antivirale et le contrôle d'une réplication virale dans le sang (CMV, AdV) ou dans les selles (AdV)
- les délais de la greffe à la vaccination anti-influenza et l'apparition d'une immunité T spécifique.
- la résolution spontanée des virémies (CMV, AdV) et réplication virale dans les selles (AdV) quel que soit leur délai d'apparition après la greffe et la présence de  $\geq 1$  TCD4 immuns/ $\text{mm}^3$  (spécifique de chacun des virus étudiés) de sang (CMF) ou 1000 CFU/ $10^6$  PBMC (ELISPOT).
- Le monitoring viral pour les 2 ou 3 virus considérés et la prescription d'anti-viraux et/ou d'immunothérapie
- La date de la vaccination post-greffe et l'obtention d'une immunité vaccinale anti-influenzae

Les études statistiques seront réalisées par l'équipe du Centre d'Epidémiologie Clinique de l'Hôpital Robert Debré sous la responsabilité du Pr. Corinne Alberti.

Les données quantitatives seront décrites sous forme de médiane (quartiles) ou moyenne (écart-type) en fonction de la nature gaussienne ou non de la distribution. Les données qualitatives, réponses positives (ou au-dessus du seuil de détection) ou négatives (au-dessous d'un seuil déterminé chez des enfants sains matchés pour l'âge et non exposés) seront décrites sous forme d'effectifs (pourcentages).

L'incidence des catégories d'infections en fonction de leur sévérité sera décrite par la méthode de Kaplan Meier.

Les liaisons entre les techniques seront étudiées 2 à 2 en utilisant les tests de corrélation.

La comparaison des résultats quantitatifs des tests immunologiques entre les groupes reposera sur des tests paramétriques éventuellement après transformation logarithmique. Un modèle mixte sera privilégié pour prendre en compte les mesures longitudinales des marqueurs immunologiques et l'occurrence vraisemblable de données manquantes au cours du temps pour des problèmes de technique.

Les performances diagnostiques de chaque test immunologique seront étudiées en considérant la nature quantitative de la mesure et la survenue d'une virémie positive (cumul des groupes B et C) versus virémie négative. La performance diagnostique sera étudiée par l'aire sous la courbe ROC et les sensibilités, spécificité, rapports de vraisemblance seront établis pour chacun des tests. Les courbes ROC pourront être comparées par des tests non paramétriques. Par ailleurs nous étudierons la performance diagnostique de la combinaison des différents tests.

Tous les tests seront bilatéraux et le seuil de significativité sera de 5%. Le logiciel SAS v 9.1 sera utilisé.

## **6. GESTION DES DONNEES**

### **6.1. Modalités de recueil des données**

Seront recueillies sur un CRF au format papier :

- Les caractéristiques cliniques des patients ainsi que leur statut vaccinal post-greffe,
- La nature et les posologies du conditionnement,
- Les statuts sérologiques pour le CMV des donneurs et receveur,
- La nature du greffon et les doses de cellules greffées,
- La nature et la composition du conditionnement,
- La nature et les doses des traitements immunosuppresseurs,
- Les grades de GVH aigue/chronique et leur traitement,
- Les épisodes infectieux ainsi que leur traitement et complications éventuelles,



- Les résultats des PCR-CMV (sang) -EBV (sang), -AdV (sang et selles) pendant au moins les 3 premiers mois post-greffe et à tout moment en cas de symptômes, et influenza (nasales) en cas de syndrome grippal,
- Les résultats de numération de lymphocytes immuns circulants (indiqués en % et valeurs absolues).

## **6.2. Circuit des données**

Afin de respecter la confidentialité des informations, aucun moyen d'identification des patients ne sera accessible au gestionnaire. Les patients seront identifiés dans les cahiers d'observation par le numéro de centre et leur numéro d'inclusion chronologique dans le centre.

## **6.3. Droits d'accès aux données des sujets et documents sources**

Les personnes ayant un accès direct aux données des sujets prennent toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité de ces données.

## **6.4. Conservation des documents et des données**

Les documents et données de la recherche seront conservés pendant 15 ans après la publication.

# **7. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ**

## **7.1. Qualification des intervenants**

L'investigateur coordonnateur ou le responsable scientifique s'assure que les intervenants de la recherche sont qualifiés pour les tâches qui leur incombent. Cette qualification est documentée dans leur CV et dans la présentation qui leur est faite de la recherche.

# **8. ASPECTS ETHIQUES ET LEGAUX**

## **8.1. Rôle du gestionnaire**

L'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris est le gestionnaire de cette recherche. Le DRCD en est son représentant.

## **8.2. Modalités d'information des sujets et le cas échéant, de consentement**

Une note d'information sera fournie aux parents. L'information donnée au patient sera notifiée dans son dossier patient. L'absence d'opposition à la participation du patient sera notifiée dans son dossier médical par l'investigateur qui la recueille

Le fait d'accepter ou de refuser la participation à cet essai n'affectera en rien les soins médicaux prodigués au patient. Aucune incitation, financière ou autre, ne sera faite au patient ou à ses représentants légaux.

### **8.3. Avis du Comité de Protection des Personnes**

Cette recherche répondant à la définition du 1° de l'article L.1121-1 du Code de la Santé Publique, un avis éthique sur le protocole, la note d'information et de consentement sera demandé à l'un des Comités de Protection des Personnes Paris Ile de France par le gestionnaire de l'étude.

Le gestionnaire de l'étude et l'URC devront être informés de tout projet de modification du protocole par l'investigateur coordonnateur. Ces modifications seront transmises pour information ou pour avis au CPP.

### **8.4. Traitement des données à caractère personnel – Autorisation CNIL**

Cette recherche est soumise à la loi n°78-17 du 6 janvier 1978 modifiée par la loi n° 2004-801 du 6 août 2004 relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements de données à caractère personnel et son décret d'application n° 2005-1309 du 20 oct. 2005.

De ce fait, tout traitement de données à caractère personnel est subordonné à l'avis du Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé (CCTIRS) puis à l'autorisation de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL).

L'obtention de cet avis et de cette autorisation est un préalable au commencement de la recherche.

### **8.5. Collection d'échantillons biologiques**

Via la DIRC Ile de France, l'activité de constitution et d'utilisation d'une collection d'échantillons biologiques humains fait l'objet d'une déclaration au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, à l'Agence Régionale de la Santé et au Comité de Protection des Personnes territorialement compétent.

### **8.6. Responsabilités vis-à-vis du gestionnaire**

L'investigateur coordonnateur s'engage à fournir au gestionnaire les informations relatives aux inclusions des sujets dans la recherche.

Toute modification du protocole de la recherche devra être soumise au gestionnaire.

L'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris se réserve le droit d'interrompre la recherche à tout moment pour des raisons administratives.

### **8.7. Rapport final de la recherche**

Le rapport sera établi dans les 12 mois qui suivent le dernier suivi du dernier sujet.

Il sera écrit en collaboration par l'investigateur coordonnateur, le responsable scientifique et le biostatisticien désigné pour cette recherche. Ce rapport sera soumis à chacun des investigateurs pour avis. Une fois qu'un consensus aura été obtenu, la version finale devra être avalisée par la signature de chacun des investigateurs et adressée au gestionnaire de la recherche dans les meilleurs délais après la fin effective de la recherche.

## **9. REGLES RELATIVES À LA PUBLICATION**

L'AP-HP, en tant que gestionnaire, est propriétaire des données et aucune utilisation ou transmission à un tiers ne peut être effectuée sans son accord préalable.

Seront premiers signataires des publications, les personnes ayant réellement participé à l'élaboration du protocole et son déroulement ainsi qu'à la rédaction des résultats.

L'Assistance Publique- Hôpitaux de Paris doit être mentionnée comme étant le gestionnaire de la recherche et les termes « Assistance Publique- Hôpitaux de Paris » doivent apparaître dans l'adresse des auteurs.

## **10. BIBLIOGRAPHIE**

Asemissen AM, Nagorsen D, Keilholz U, et al. Flow cytometric determination of intracellular or secreted IFN $\gamma$  for the quantification of antigen reactive T cells. *Journal of immunological methods* 2001;251:101-108.

Ayala, E., Greene, J., Sandin, R., Perkins, J., Field, T., Tate, C., Fields, K.K. & Goldstein, S. (2006) Valganciclovir is safe and effective as pre-emptive therapy for CMV infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*, **37**, 851-856.

Boeckh, M. & Ljungman, P. (2009) How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*, **113**, 5711-5719.

Boeckh, M. & Nichols, W.G. (2004) The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood*, **103**, 2003-2008.

Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, et al. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* 2003;101:407-414.

Bright, R.A., Shay, D.K., Shu, B., Cox, N.J. & Klimov, A.I. (2006) Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *Jama*, **295**, 891-894.

Bruno, B., Gooley, T., Hackman, R.C., Davis, C., Corey, L. & Boeckh, M. (2003) Adenovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation: effect of ganciclovir and impact on survival. *Biol Blood Marrow Transplant*, **9**, 341-352.

Busca, A., de Fabritiis, P., Ghisetti, V., Alice, T., Mirabile, M., Gentile, G., Locatelli, F. & Falda, M. (2007) Oral valganciclovir as preemptive therapy for cytomegalovirus infection post allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*, **9**, 102-107.

Candoni, A., Simeone, E., Tiribelli, M., Pipan, C. & Fanin, R. (2008) What is the optimal dosage of valganciclovir as preemptive therapy for CMV infection in allogeneic hematopoietic SCT? *Bone marrow transplantation*, **42**, 207-208.

- Chakrabarti, S. (2007) Adenovirus infections after hematopoietic stem cell transplantation: still unravelling the story. *Clin Infect Dis*, **45**, 966-968.
- Choi, S.M., Lee, D.G., Choi, J.H., Yoo, J.H., Kim, Y.J., Park, S.H., Park, S.N., Min, C.K., Lee, S., Kim, H.J., Kim, D.W., Lee, J.W., Min, W.S., Shin, W.S. & Kim, C.C. (2005) Risk-adapted preemptive therapy for cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation: a single-center experience in Korea. *International journal of hematology*, **81**, 69-74.
- Cwynarski, K., Ainsworth, J., Cobbold, M., Wagner, S., Mahendra, P., Apperley, J., Goldman, J., Craddock, C. & Moss, P.A. (2001) Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, **97**, 1232-1240.
- Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Loeffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H.G., Kanz, L., Kleihauer, A., Frank, F., Jahn, G. & Hebart, H. (2002) Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood*, **99**, 3916-3922.
- Feuchtinger, T., Lang, P. & Handgretinger, R. (2007) Adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia & lymphoma*, **48**, 244-255.
- Feuchtinger, T., Matthes-Martin, S., Richard, C., Lion, T., Fuhrer, M., Hamprecht, K., Handgretinger, R., Peters, C., Schuster, F.R., Beck, R., Schumm, M., Lotfi, R., Jahn, G. & Lang, P. (2006) Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *British journal of haematology*, **134**, 64-76.
- Flomenberg, P., Babbitt, J., Drobyski, W.R., Ash, R.C., Carrigan, D.R., Sedmak, G.V., McAuliffe, T., Camitta, B., Horowitz, M.M., Bunin, N. & et al. (1994) Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *The Journal of infectious diseases*, **169**, 775-781.
- Ghanekar, S.A. & Maecker, H.T. (2003) Cytokine flow cytometry: multiparametric approach to immune function analysis. *Cytotherapy*, **5**, 1-6.
- Gratama JW, van Esser JW, Lamers CH, 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;98:1358-1364.
- Hebart, H., Dajinik, S., Stevanovic, S., Grigoleit, U., Dobler, A., Baur, M., Rauser, G., Sinzger, C., Jahn, G., Loeffler, J., Kanz, L., Rammensee, H.G. & Einsele, H. (2002) Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, **99**, 3830-3837.
- Heslop, H.E., Ng, C.Y., Li, C., Smith, C.A., Loftin, S.K., Krance, R.A., Brenner, M.K. & Rooney, C.M. (1996) Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nature medicine*, **2**, 551-555.

- Hobeika AC, Morse MA, Osada T, et al. Enumerating antigen-specific T-cell responses in peripheral blood: a comparison of peptide MHC Tetramer, ELISpot, and intracellular cytokine analysis. *J Immunother* 2005;28:63-72.
- Khourouj, V.G., Dalle, J.H., Pedron, B., Yakouben, K., Bensoussan, D., Cordeiro, D.J., Peltier, L., Ouachee-Chardin, M., Baruchel, A. & Sterkers, G. Quantitative and qualitative CD4 T-cell immune responses related to adenovirus DNAemia in hematopoietic-stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*.
- Karlsson AC, Martin JN, Younger SR, et al. Comparison of the ELISPOT and cytokine flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells. *Journal of immunological methods* 2003;283:141-153.
- Kim, Y.J., Boeckh, M. & Englund, J.A. (2007) Community respiratory virus infections in immunocompromised patients: hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients, and individuals with human immunodeficiency virus infection. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, **28**, 222-242.
- Kuehnle, I., Huls, M.H., Liu, Z., Semmelmann, M., Krance, R.A., Brenner, M.K., Rooney, C.M. & Heslop, H.E. (2000) CD20 monoclonal antibody (rituximab) for therapy of Epstein-Barr virus lymphoma after hemopoietic stem-cell transplantation. *Blood*, **95**, 1502-1505.
- Leen, A.M., Myers, G.D., Sili, U., Huls, M.H., Weiss, H., Leung, K.S., Carrum, G., Krance, R.A., Chang, C.C., Molldrem, J.J., Gee, A.P., Brenner, M.K., Heslop, H.E., Rooney, C.M. & Bollard, C.M. (2006) Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nature medicine*, **12**, 1160-1166.
- Li, C.R., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Goodrich, J.M. & Riddell, S.R. (1994) Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood*, **83**, 1971-1979.
- Lion, T., Kosulin, K., Landlinger, C., Rauch, M., Preuner, S., Jugovic, D., Potschger, U., Lawitschka, A., Peters, C., Fritsch, G. & Matthes-Martin, S. Monitoring of adenovirus load in stool by real-time PCR permits early detection of impending invasive infection in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*, **24**, 706-714.
- Ljungman, P., Brand, R., Einsele, H., Frassoni, F., Niederwieser, D. & Cordonnier, C. (2003) Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood*, **102**, 4255-4260.
- Ljungman, P., Cordonnier, C., Einsele, H., Bender-Gotze, C., Bosi, A., Dekker, A., De la Camara, R., Gmur, J., Newland, A.C., Prentice, H.G., Robinson, A.J., Rovira, M., Rosler, W. & Veil, D. (1998) Use of intravenous immune globulin in addition to antiviral therapy in the treatment of CMV gastrointestinal disease in allogeneic bone marrow transplant patients: a report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Infectious Diseases Working Party of the EBMT. *Bone marrow transplantation*, **21**, 473-476.

- Ljungman, P., de La Camara, R., Milpied, N., Volin, L., Russell, C.A., Crisp, A. & Webster, A. (2002) Randomized study of valacyclovir as prophylaxis against cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Blood*, **99**, 3050-3056.
- Ljungman P. Would monitoring CMV immune responses allow improved control of CMV in stem cell transplant patients. *J Clin Virol* 2006;35:493-495.
- Ljungman P, Avetisyan G. Influenza vaccination in hematopoietic SCT recipients. *Bone marrow transplantation* 2008;42:637-641.
- Machado, C.M., Dullea, F.L., Boas, L.S., Castelli, J.B., Macedo, M.C., Silva, R.L., Pallota, R., Saboya, R.S. & Pannuti, C.S. (2000) CMV pneumonia in allogeneic BMT recipients undergoing early treatment of pre-emptive ganciclovir therapy. *Bone marrow transplantation*, **26**, 413-417.
- Mori, T., Aisa, Y., Shimizu, T., Nakazato, T., Yamazaki, R., Ikeda, Y. & Okamoto, S. (2006) Prevention of cytomegalovirus infection by valacyclovir after allogeneic bone marrow transplantation from an unrelated donor. *International journal of hematology*, **83**, 266-270.
- Myers GD, Bollard CM, Wu MF, et al. Reconstitution of adenovirus-specific cell-mediated immunity in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation* 2007;**39**:677-686.
- Nichols, W.G., Corey, L., Gooley, T., Davis, C. & Boeckh, M. (2002) High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *The Journal of infectious diseases*, **185**, 273-282.
- Nicholson, K.G., Aoki, F.Y., Osterhaus, A.D., Trottier, S., Carewicz, O., Mercier, C.H., Rode, A., Kinnersley, N. & Ward, P. (2000) Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group. *Lancet*, **355**, 1845-1850.
- O'Brien, S., Ravandi, F., Riehl, T., Wierda, W., Huang, X., Tarrand, J., O'Neal, B., Kantarjian, H. & Keating, M. (2008) Valganciclovir prevents cytomegalovirus reactivation in patients receiving alemtuzumab-based therapy. *Blood*, **111**, 1816-1819.
- Owens MA, Vall HG, Hurley AA, Wormsley SB. Validation and quality control of immunophenotyping in clinical flow cytometry. *Journal of immunological methods* 2000;243:33-50.
- Ozdemir, E., St John, L.S., Gillespie, G., Rowland-Jones, S., Champlin, R.E., Molldrem, J.J. & Komanduri, K.V. (2002) Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific CD8+ T cells. *Blood*, **100**, 3690-3697.
- Pantaleo G, Harari A. Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nature reviews* 2006;6:417-423.
- Pedron, B., Guerin, V., Cordeiro, D.J., Masmoudi, S., Dalle, J.H. & Sterkers, G. Development of cytomegalovirus (CMV) and adenovirus-specific memory CD4 T-cell functions from birth to adulthood. 2010 *Pediatric research*.

- Peggs, K.S., Verfuërth, S., Pizzey, A., Khan, N., Guiver, M., Moss, P.A. & Mackinnon, S. (2003) Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet*, **362**, 1375-1377.
- Quinnan GV, Jr., Kirmani N, Rook AH, 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. *The New England journal of medicine* 1982;307:7-13.
- Rausser, G., Einsele, H., Sinzger, C., Wernet, D., Kuntz, G., Assenmacher, M., Campbell, J.D. & Topp, M.S. (2004) Rapid generation of combined CMV-specific CD4+ and CD8+ T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood*, **103**, 3565-3572.
- Reusser, P., Einsele, H., Lee, J., Volin, L., Rovira, M., Engelhard, D., Finke, J., Cordonnier, C., Link, H. & Ljungman, P. (2002) Randomized multicenter trial of foscarnet versus ganciclovir for preemptive therapy of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, **99**, 1159-1164.
- Rooney, C.M., Smith, C.A., Ng, C.Y., Loftin, S.K., Sixbey, J.W., Gan, Y., Srivastava, D.K., Bowman, L.C., Krance, R.A., Brenner, M.K. & Heslop, H.E. (1998) Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood*, **92**, 1549-1555.
- Samri A, Durier C, Urrutia A, et al. Evaluation of the interlaboratory concordance in quantification of human immunodeficiency virus-specific T cells with a gamma interferon enzyme-linked immunospot assay. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:684-697.
- Sester M, Sester U, Gartner B, et al. Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* 2001;71:1287-1294.
- Stadtmauer, E.A., Vogl, D.T., Luning Prak, E., Boyer, J., Aqui, N.A., Rapoport, A.P., McDonald, K.R., Hou, X., Murphy, H., Bhagat, R., Mangan, P.A., Chew, A., Veloso, E.A., Levine, B.L., Vonderheide, R.H., Jawad, A.F., June, C.H. & Sullivan, K.E. Transfer of influenza vaccine-primed co-stimulated autologous T cells after stem cell transplantation for multiple myeloma leads to reconstitution of influenza immunity: results of a randomized clinical trial. *Blood*. On line.
- Vu, D., Peck, A.J., Nichols, W.G., Varley, C., Englund, J.A., Corey, L. & Boeckh, M. (2007) Safety and tolerability of oseltamivir prophylaxis in hematopoietic stem cell transplant recipients: a retrospective case-control study. *Clin Infect Dis*, **45**, 187-193.
- Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas, E.D. & Riddell, S.R. (1995) Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *The New England journal of medicine*, **333**, 1038-1044.
- Whiteside TL, Zhao Y, Tsukishiro T, Elder EM, Gooding W, Baar J. Enzyme-linked immunospot, cytokine flow cytometry, and tetramers in the detection of T-cell responses to a dendritic cell-based multi-peptide vaccine in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:641-649.

## 11. ANNEXES

### 11.1. Liste des Investigateurs

#### Coordonnateur du projet

Jean Hugues Dalle  
Service d'Hématologie Clinique  
Hôpital Robert Debré - 48, boulevard Sérurier - 75019 Paris  
[jean-hugues.dalle@rdb.aphp.fr](mailto:jean-hugues.dalle@rdb.aphp.fr)

**Téléphones**                      **Fax**  
01.40.03.47.42    01.40.03.24.14

#### Services Cliniques recruteurs

	<b>Téléphones</b>
Site Hôpital Robert Debré (hématologie) : Pr. Baruchel 48, bld Sérurier - 75019 Paris	01.40.03.23.51
Site Nancy (hématologie) : Pr. Chastagner Allée du Morvan - 54511 Vandœuvre Lès Nancy	03.83.15.37.79
Site Necker (immunologie) : Pr. Fischer 149 rue de Sèvres - 75015 Paris	01.44.49.48.22
Site Marseille (hématologie) : Pr Gérard Michel 13385 Marseille 5ème arrondissement	04 91 38 67 78
Site Lyon: Pr Yves Bertrand (hématologie et immunologie pédiatrique) 59, Bd Pinel 69500 Bron	04 69 16 65 70
Site Bordeaux : Pr Yves Perel (hématologie) Hôpital Pellegrin-enfants, Service de pédiatrie B 33076 Bordeaux	05 57 82 04 30
Site Nantes : Dr Fanny Riolland (hématologie) 1 Place Alexis Ricordeau , 44093 Nantes Cedex 1	02 40 08 36 10

#### Unité d'Epidémiologie Clinique

Site Robert Debré : Pr. Alberti  
48, bld Sérurier - 75019 Paris

**Téléphones**                      **Fax**  
01.40.03.24.65    01.40.03.24.85