

17-19 NOVEMBRE 2021

SFGM-TC  
2021



Centre de  
Congrès Prouvé  
Nancy

# Reconstitution immunitaire spécifique anti-CMV : les outils au service de la pratique

Prof. Marcelo de Carvalho, MD PhD

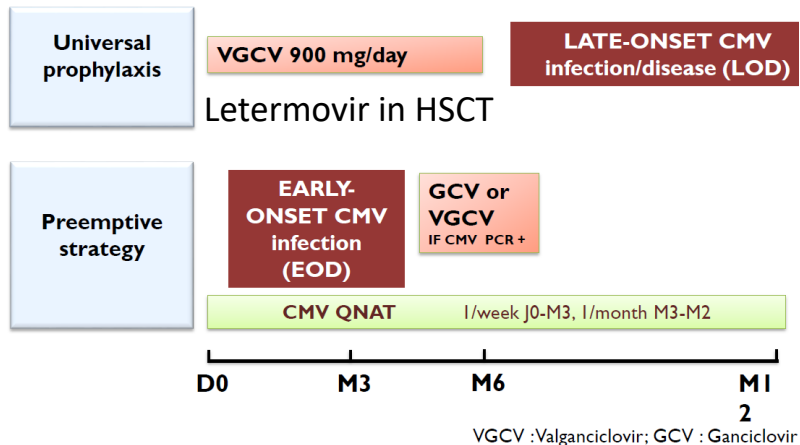
Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine/CHRU de Nancy

IMOPA UMR Univ Lorraine/CNRS

# Infection/réactivation par le CMV : problème majeur en transplantation

Herpesvirus (HHV5), infection latente et persistante mais maintenue sous contrôle si immunocompétence

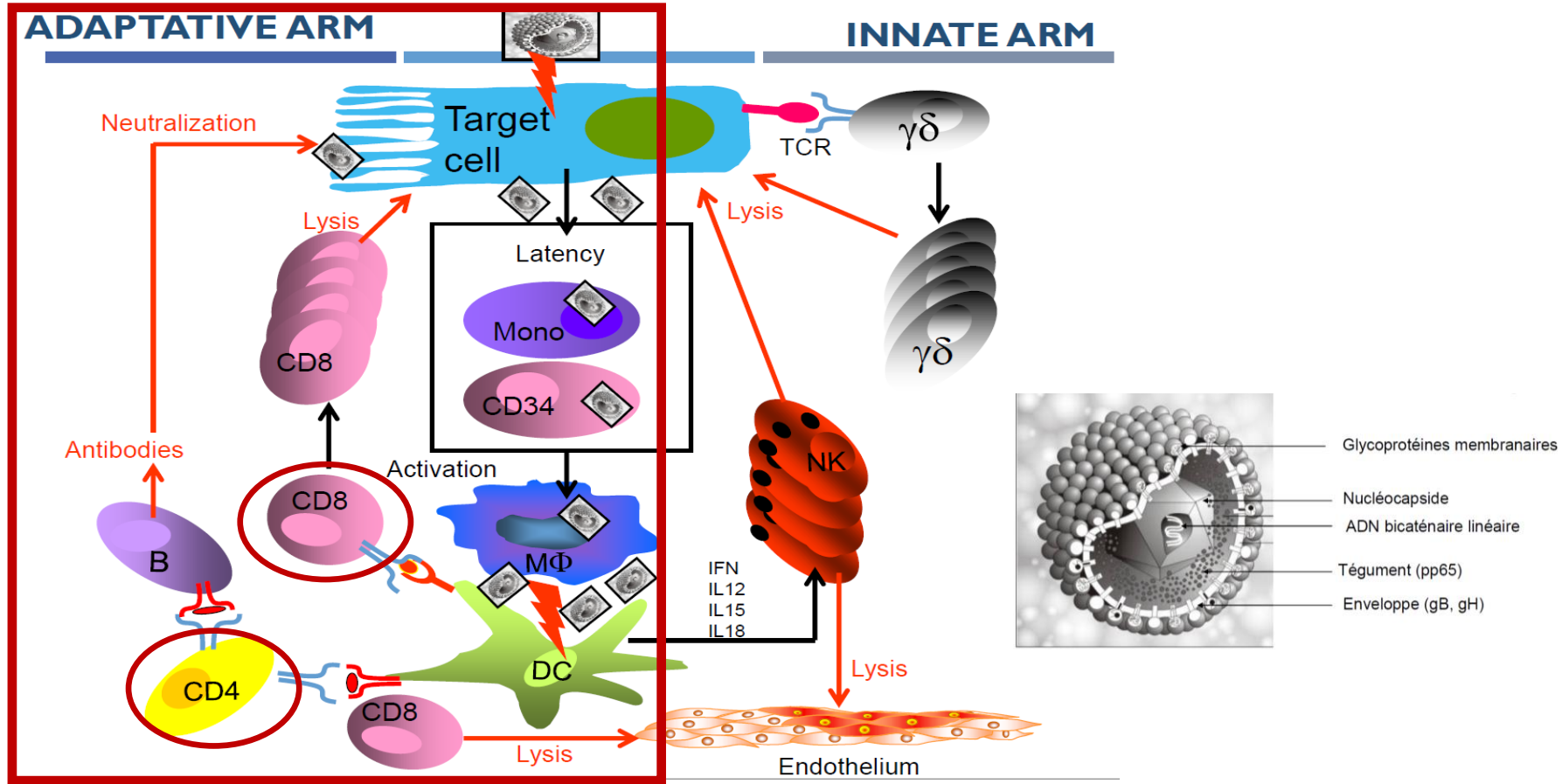
Situations d'immunosuppression (transplantation d'organes ou HSCT) : risque d'infections cliniquement significatives (cs-CMVi)



Décisions thérapeutiques basées sur le risque clinique : status sérologique D/R, compatibilité HLA, conditionnement, ...

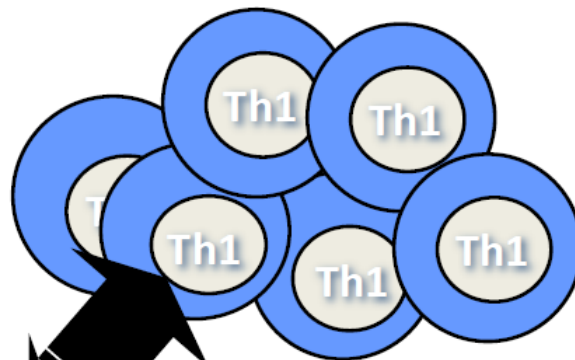
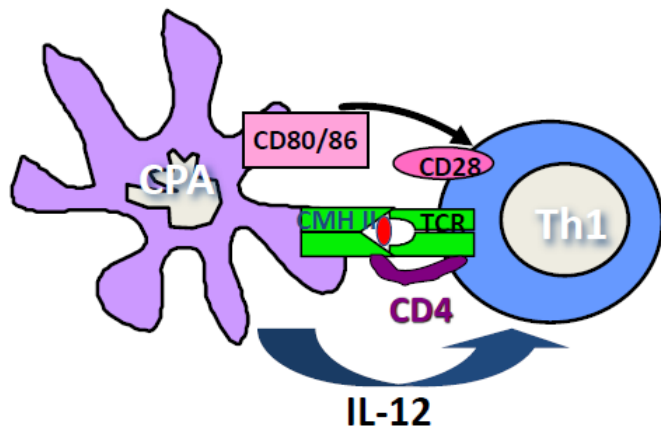
Monitoring de la réponse immune anti-CMV comme méthode d'évaluation personnalisée du risque de cs-CMVi

# Réponse immunitaire anti-CMV



# Rappels sur la réponse immunitaire spécifique T

**Prolifération**



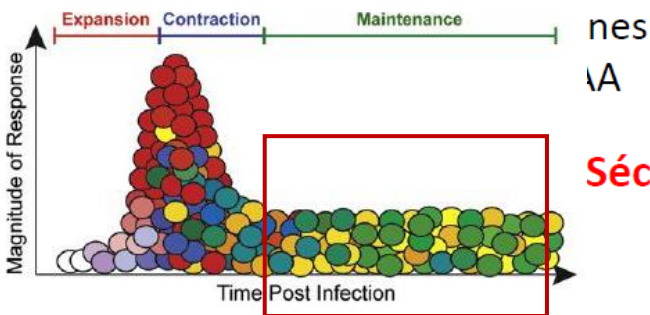
**Sécrétion de cytokines**

Antigènes endogènes  
Peptides 8-10 AA



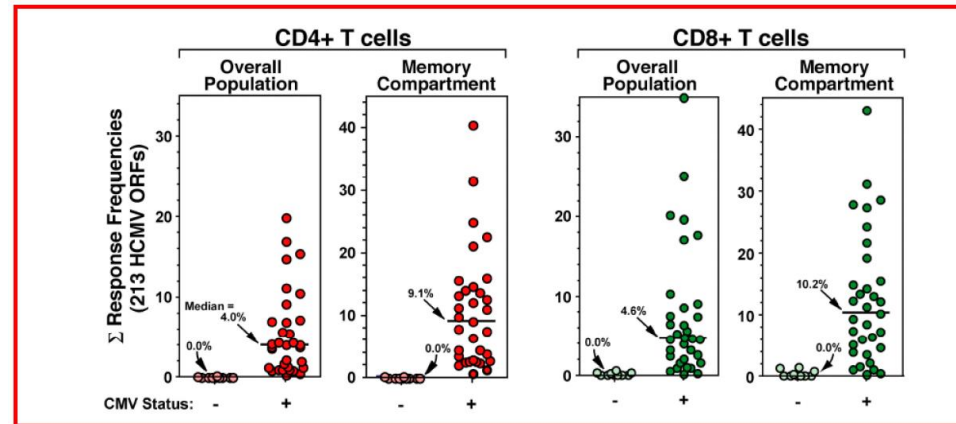
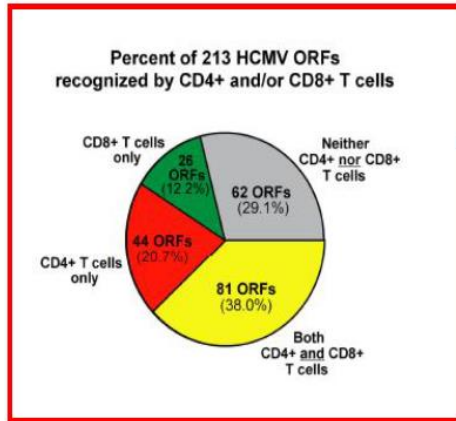
**Sécrétion de cytokines**

**Dégranulation**



# « Inflation » des LT mémoires anti-CMV

L'immunosurveillance par les LT CD4 et CD8 empêche la génération de virions (mais présence réplication incomplète à bas bruit) chez les personnes immunocompétentes



*In CMV+ individuals, 71 % of CMV peptides are able to stimulate CD4 or CD8 or both.*

**10 % OF MEMORY CD4 OR CD8 COMPARTMENT IS DEVOTED TO CMV RECOGNITION**

# Immunomonitorage anti-CMV

Consensus sur l'importance capitale des LT CD4 et CD8 anti-CMV pour le contrôle de l'infection/réactivation du CMV (Harari *et al.* Hum Immunol 2004)

HSCT : Protection contre cs-CMVi, réactivation tardive, survie (Boeckh *et al.* Blood 2003)

Importance des LT CD8 et IFN- $\gamma$  (Cummins *et al.* Transpl Infect Dis 2009, Neshet *et al.* J Infect Dis 2016)

...mais aussi des LT CD4 (Lim *et al.* Front Cell Infect Microbiol 2020)

IFN- $\gamma$  pas suffisant comme corrélat de protection? (Boeckh and Riddell, J Infect Dis 2007)

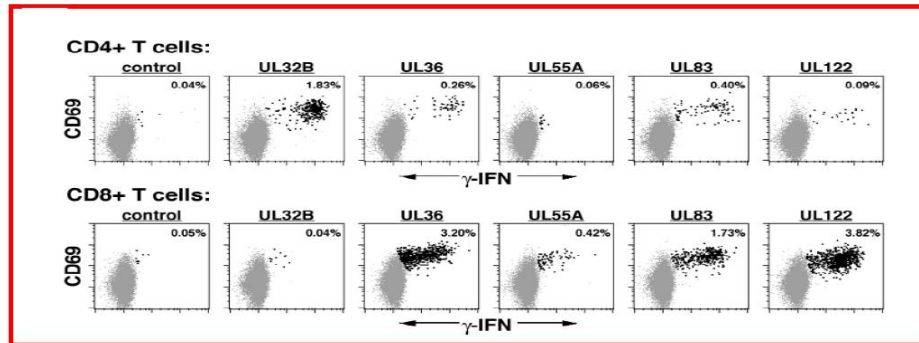
- ➔ Evaluation reconstitution LT spécifiques pour stratification individuelle du risque et décisions thérapeutiques (qui traiter/pas traiter, quand adapter/arrêter prophylaxie ou traitement?)
- ➔ Comment monitorer ces LT spécifiques du CMV ? Comment interpréter les résultats?

# Immunomonitorage anti-CMV

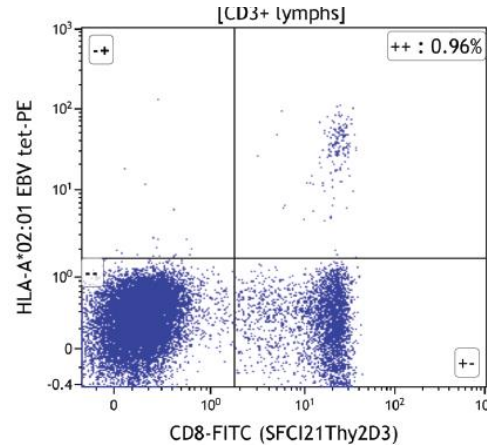
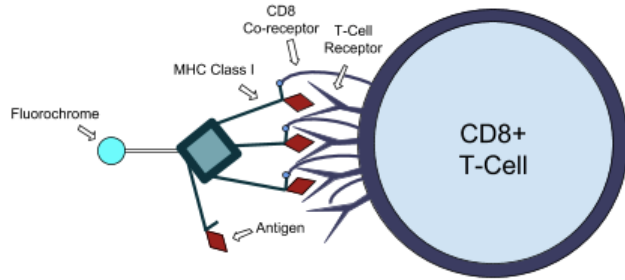
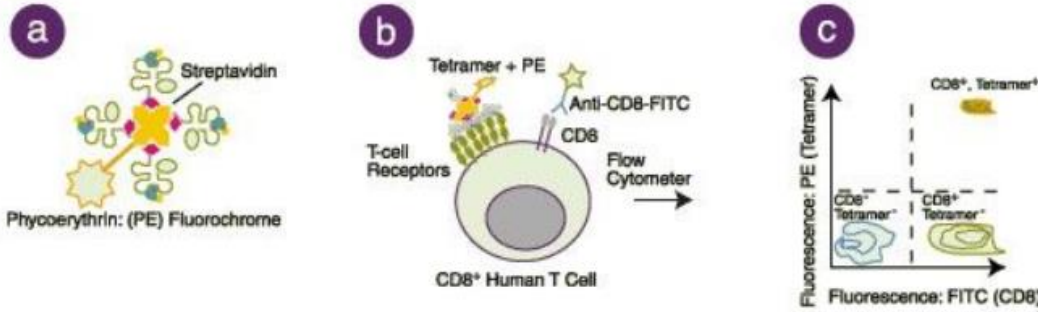
Malgré beaucoup d'Ag reconnus (Sylwester et al. J Exp Med 2005), restriction des études à deux Ag immunodominants :

IE-1 (immediate-early protein 1)

pp65 (65kDa phosphoprotein)



# Evaluation des LT spécifiques d'Ag avec des tetramers



Avantages :

Evaluation directe *ex vivo*  
quantitative et phénotypique  
Relativement peu complexe

Inconvénients :

Limité à des pairs HLA/peptides  
restreints

(réponse globale sous-estimée)

Pas d'évaluation fonctionnelle  
(mais possible, complexité accrue)



## Exemples d'immunomonitorage anti-CMV avec Tetramers

- Aubert G *et al.* J Infect Dis 2001; Cwynarski K *et al.* Blood 2001;  
Gratama JW *et al.* Blood 2001 : seuil de 10 CTL/ $\mu$ L pour protection contre cs-CMV<sub>i</sub>.
- Ozdemir E *et al.* Blood 2002 et Engstrand M *et al.* Clin Exp Immunol 2003 :  
Seuil de 10 CTL/ $\mu$ l pas protecteur, LT CD8 dysfonctionnels.
- Borchers S *et al.* Transpl Infect Dis 2011 : étude prospective, 114 HSCT patients, 2 ans de monitoring. Présence de LT CD8 CMV-spécifiques avant J+50 et leur expansion associés à protection contre la réactivation. Seuil de 10 CTL/ $\mu$ L pas protecteur.

Possibilité d'évaluer les LT CD4 anti-CMV également (tetramers HLA II)

**Suivi longitudinal avec expansion des LT tetramers+ : bon corrélat de protection**

# Evaluation des LT spécifiques d'Ag par des études fonctionnelles

Culture cellulaire (PBMC ou sang total) avec Ag immunodominants (protéines, pool de peptides, lysats viraux possibles)

Présentation par les molécules HLA de classe I et classe II, stimulation des LT CD4 et CD8 spécifiques d'Ag  **Activation LT mémoires spécifiques**

Read-outs :

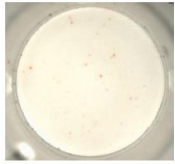
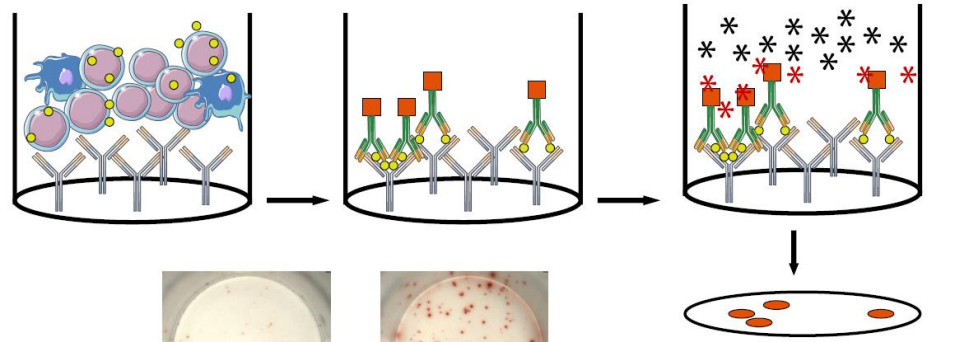
Prolifération (<sup>3</sup>H-thymidine, Cytométrie en flux - CFSE, Cycle cellulaire)

Cytokines produites (mRNA, ELISA, ELISPOT, Cytométrie en flux - ICS)

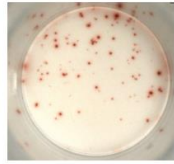
Expression de marqueurs d'activation (Cytométrie en flux - AIM)

# Identification des LT CMV-spécifiques par ELISPOT IFN- $\gamma$

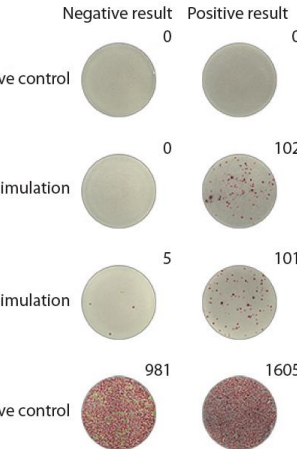
## IFN- $\gamma$ release assays (IGRAs)



-



+



Avantages :

Evaluation quantitative des LT spécifiques

Sensibilité élevée, correction des lymphopénies

Inconvénients :

Complexité analytique (PBMCs, etc)

Pas d'information phénotypique

Monofonctionnalité

T-SPOT®.CMV, T-TRACK® CMV

IE-1 et pp65

Alternative : QuantiFERON®-CMV

(sang total, dosage IFN- $\gamma$  par ELISA)

## Exemples d'immunomonitorage anti-CMV avec ELISPOT

- Neshier L *et al.* J Infect Dis 2016 : étude prospective, 63 CMV+ HSCT. Immunité cellulaire anti-CMV associée à la prévention de cs-CMVi. Sensibilité de 91% et valeur prédictive négative de 88%.
- Haddad LE *et al.* J Infect Dis 2018 : étude prospective, 55 CMV+ HSCT. Patients avec faible immunité cellulaire anti-CMV sont 8.3 fois plus à risque de cs-CMVi. Sensibilité de 94% de prédiction de cs-CMVi.
- Chemaly RF *et al.* Clin Infect Dis 2020 : étude prospective multi-centrique, 241 CMV+ HSCT. Faible immunité cellulaire anti-CMV associée aux cs-CMVi et à la mortalité. Seuil réponse faible : < 0,04% des PBMC.

# Identification des LT CMV-spécifiques par cytométrie en flux

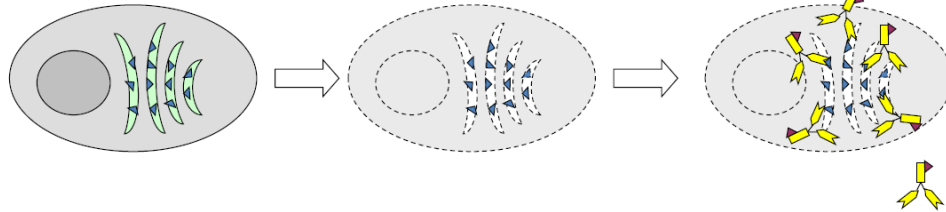
## ICS : cytokines intra-cellulaires

Activation des cellules

Marquage de membrane  
Ag de surface

Marquage intracellulaire  
cytokine

Blocage de la sécrétion



Cellules T activées traitées par un inhibiteur qui bloque le transport des protéines  
⇒ blocage des CK dans le RE

Fixation et perméabilisation des cellules

Pénétration des Ac anti CK et liaison aux CK intracytoplasmiques

d'après Immunobiology 5, C. A. Janeway

Avantages :

Evaluation quantitative des LT spécifiques

Sensibilité élevée, correction des lymphopénies

**Caractérisation phénotypique** (CD4, CD8,...) et

**Polyfonctionnalité** possible

Inconvénients :

Complexité analytique (PBMCs, etc) et post-analytique

Standardisation inter-laboratoires difficile

# Sensibilité équivalente ELISPOT/ICS

Comparison between frequencies of HIV-specific CD8 T cells as measured by ICS and ELISpot assay

Patient	Peptide	HLA type	ICS %IFN $\gamma$ +CD8+	ELISpot		CD8%
				SFC/10 <sup>6</sup> PBMC	%IFN $\gamma$ + CD8+	
02.011PR00	Gag263–272	A11; B7/27	0.29	2060	0.74	28
	Env848–856		0.15	1830	0.65	
04.023PR00	Gagp24	A1/24; B8/44 (12)	0.16	960	0.19	50
	Nef90–97		0.2	1060	0.21	
04.044PR00	Gag20–27	A2/3; B27/51 (5)	0.63	1760	0.68	26
	Gag77–85		0.68	1740	0.67	
	Gag263–272		0.52	1560	0.6	
04.053PR00	Gag77–85	A2/3; B27/57 (17)	0.8	>3000	>0.61	49
	Gag263–272		2.4	>3000	>0.61	
	Nef73–82		0.37	>3000	>0.61	
04.071PR20	Gag77–85	A2/23 (9); B57 (17)	0.35	507	0.15	34
	Nef136–145		0.23	663	0.2	
1.213PR10	Gag18–26	A3/29; B35/44 (12)	0.45	1245	0.37	34
	Nef135–143		0.73	2145	0.63	
2.248PR10	Gag167–175	A24(9)/26 (10)	0.18	707	0.13	55
	Gag298–306	B14/39 (16)	1.14	877	0.16	
	Env584–592		0.17	473	0.09	
Mean $\pm$ SD			0.56 $\pm$ 0.55		0.43 $\pm$ 0.24	39 $\pm$ 12

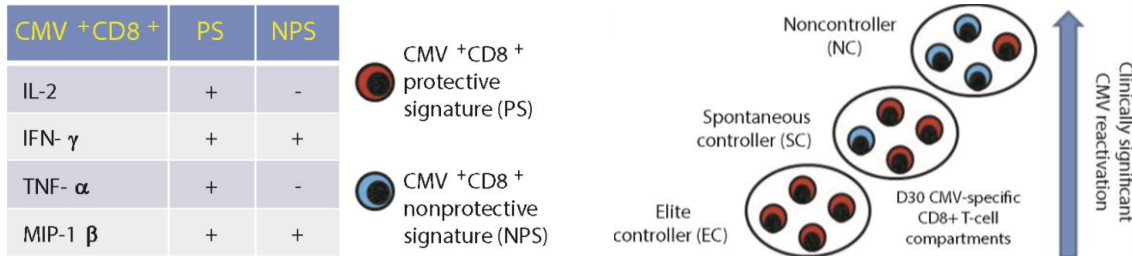
Wilcoxon test:  $p > 0.05$ , Spearman correlation:  $r = 0.33$ ,  $p > 0.05$ .

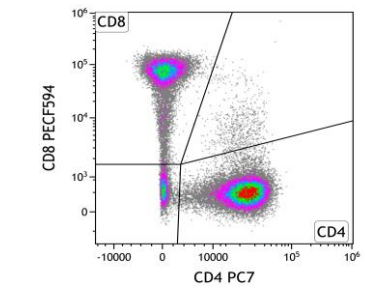
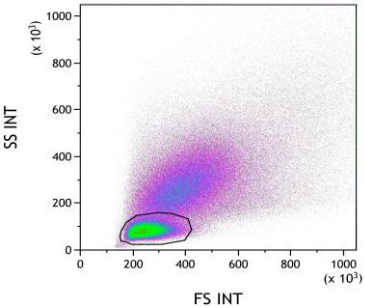
# Exemples d'immunomonitorage anti-CMV avec ICS

Lilleri D *et al.* Haematologica 2008 : étude prospective, 45 CMV+ HSCT. Cut-offs CD4+ >1 cell/ $\mu$ L et CD8+ >3 cells/ $\mu$ L anti-CMV pour protection contre cs-CMVi (80% de valeur prédictive positive). Importance des LT bifonctionnels IFN- $\gamma$ +/IL-2+

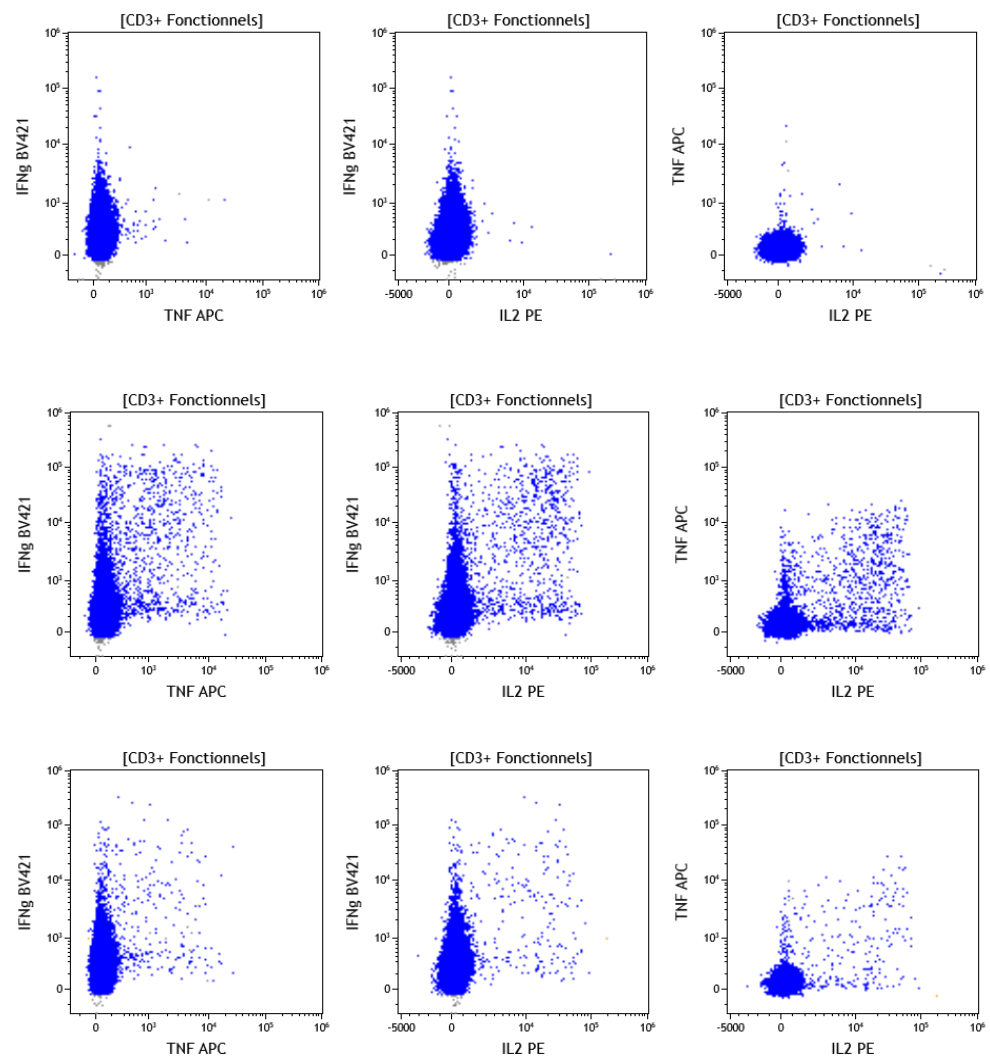
Tormo N *et al.* Bone Marrow Transplant 2011 : étude prospective, 133 CMV+ HSCT. Cut-offs CD4+ >1,2 cell/ $\mu$ L et CD8+ >1 cells/ $\mu$ L anti-CMV pour protection contre CMV DNAémie (valeurs prédictives à J+30 : 61% et 68% respectivement).

Camargo JF *et al.* Blood 2018 : étude prospective, 42 CMV+ HSCT. LT CD8 anti-pp65 polyfonctionnels associés à la protection contre CMV DNAémie et cs-CMVi.





Cellules CD3+



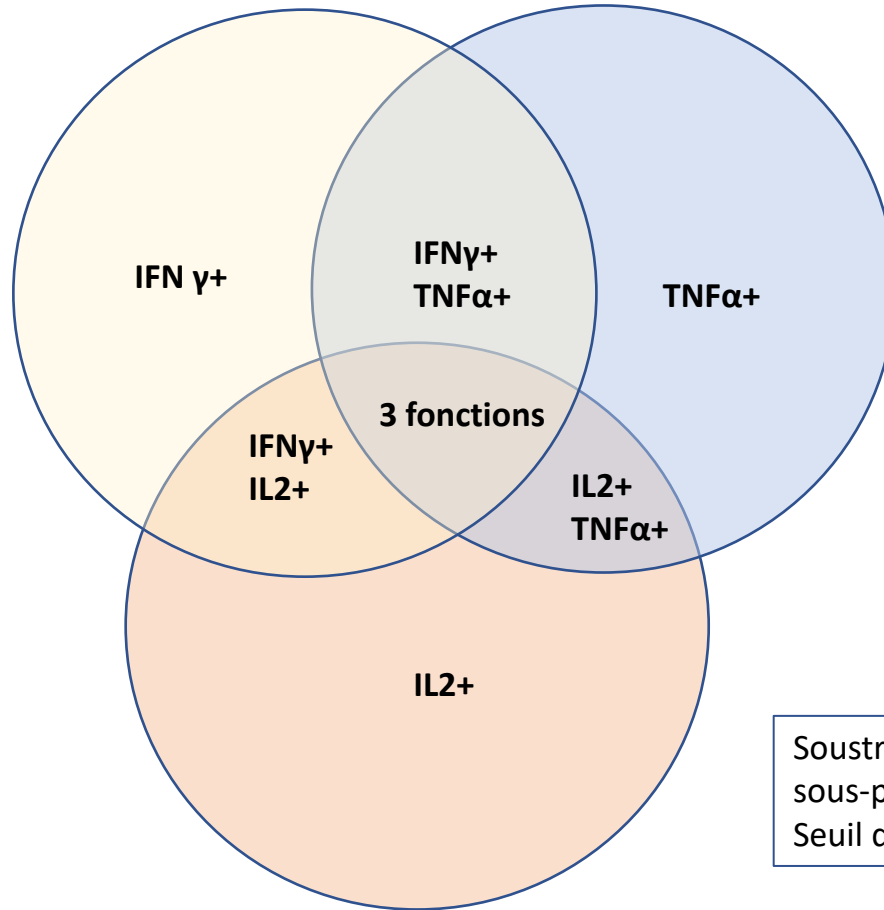
Medium

CMV Peptides pp65

CMV Peptides IE-1



# Opérations booléennes et détermination des 7 sous-populations produisant de cytokines



IFN  $\gamma$ + monofonctionnelles

TNF  $\alpha$ + monofonctionnelles

IL2+ monofonctionnelles

IFN  $\gamma$  +TNF  $\alpha$  + bifonctionnelles

IFN  $\gamma$  +IL2+ bifonctionnelles

TNF  $\alpha$  +IL2+ bifonctionnelles

IFN  $\gamma$  +TNF  $\alpha$  +IL2+ trifonctionnelles

Soustraction de la production spontanée (medium) de chaque sous-population  
Seuil de positivité :  $\Delta > 0,02\%$

Les cellules **polyfonctionnelles** sont les **plus efficaces** dans le contrôle des infections (« **qualité** » supérieure) (Anders Boyd et al, PLoS one 2014)

Corrélation inverse entre charge virale et nombre de LT polyfonctionnels (Roederer et al, Nat Rev Immunol 2008)

Pathogen-Specific T Cell Polyfunctionality Is  
a Correlate of T Cell Efficacy and Immune  
Protection

PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0128714 June 5, 2015

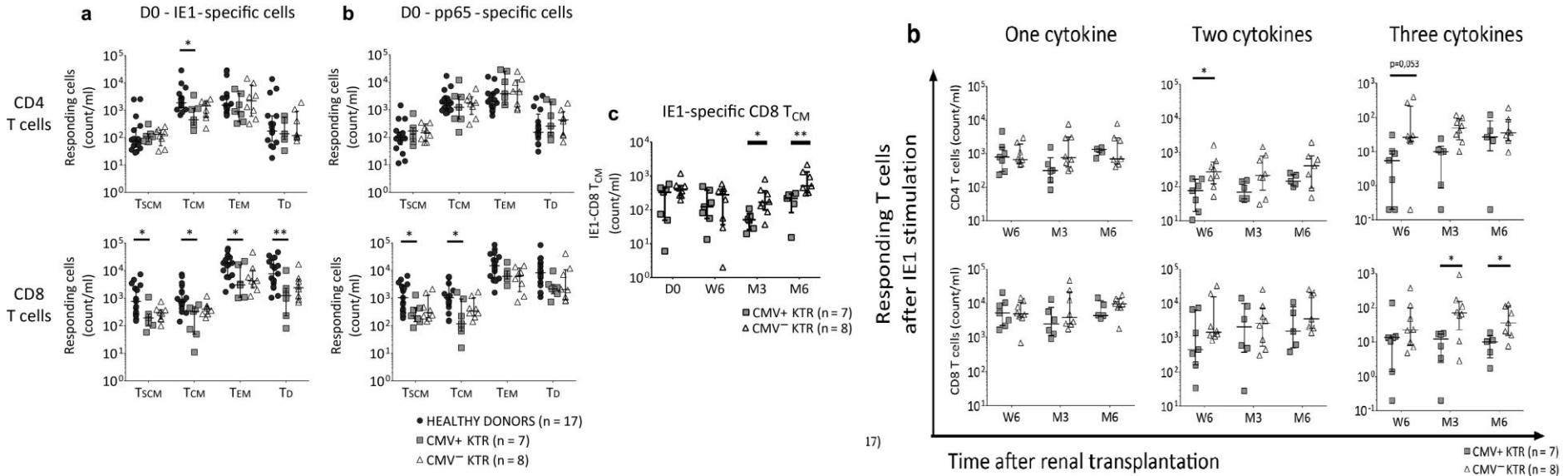
Anders Boyd<sup>1</sup>, Jorge R. Almeida<sup>2</sup>, Patricia A. Darrah<sup>3</sup>, Delphine Sauce<sup>2</sup>, Robert A. Seder<sup>3</sup>,  
Victor Appay<sup>2</sup>, Guy Gorochov<sup>2,4,5</sup>, Martin Larsen<sup>2,4,5\*</sup>

Multifunctional T<sub>H</sub>1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*

NATURE MEDICINE VOLUME 13 | NUMBER 7 | JULY 2007

Patricia A Darrah<sup>1</sup>, Dipti T Patel<sup>1</sup>, Paula M De Luca<sup>1</sup>, Ross W B Lindsay<sup>1</sup>, Dylan F Davey<sup>1</sup>, Barbara J Flynn<sup>1</sup>, Søren T Hoff<sup>2</sup>, Peter Andersen<sup>2</sup>, Steven G Reed<sup>3</sup>, Sheldon L Morris<sup>4</sup>, Mario Roederer<sup>5</sup> & Robert A Seder<sup>1</sup>

## An Early Immediate Early Protein IE1-Specific T-Cell Polyfunctionality Is Associated With a Better Control of Cytomegalovirus Reactivation in Kidney Transplantation



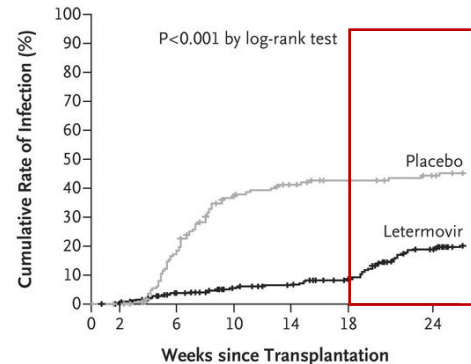
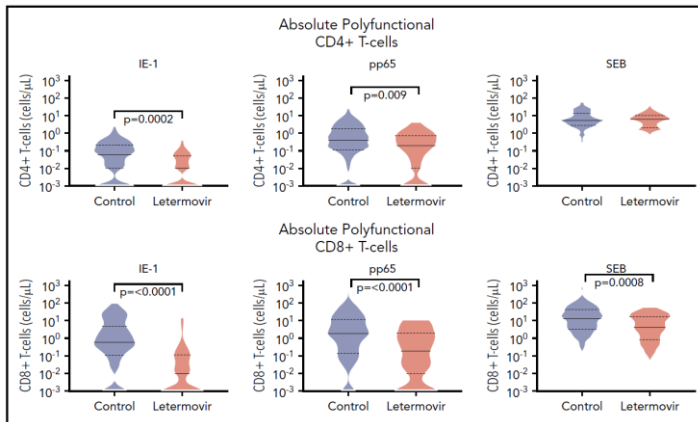
# Impact du Letermovir sur la reconstitution immunitaire anti-CMV

## Cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution following letermovir prophylaxis after hematopoietic cell transplantation

Zamora D *et al.* Blood (2021) 138 (1): 34-43.

Etude prospective 56 patients avec prophylaxie au Letermovir, comparaison avec 93 patients thérapie préemptive GCV

A M+3, diminution des LT CD4 et CD8 polyfonctionnels spécifiques de pp65 et IE-1 chez les patients traités par Letermovir : retard dans la reconstitution des LT polyfonctionnels par diminution de l'exposition antigénique *in vivo*?



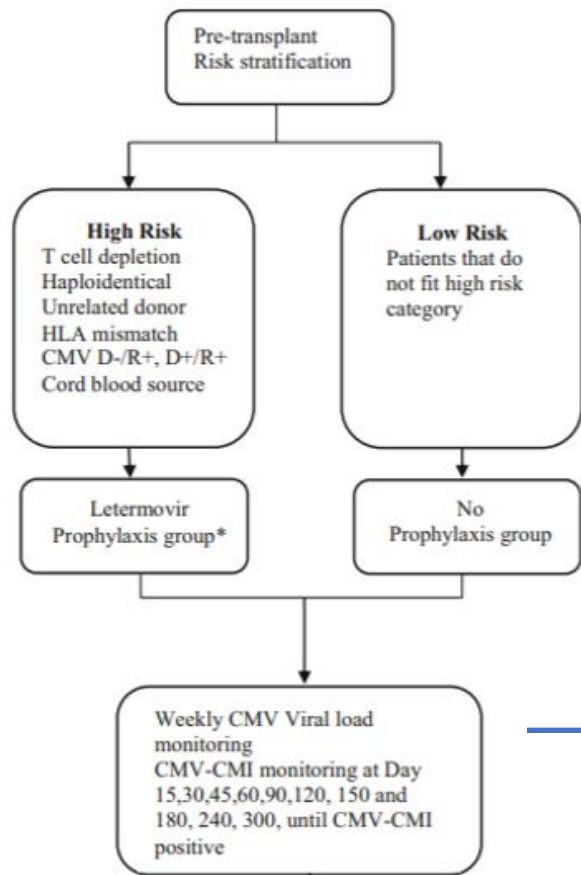
Comment on Zamora *et al.*, page 34

## Letermovir and HCT: too much of a good thing?

Mark R. Schleiss | University of Minnesota Medical School

Explication pour l'augmentation tardive des cs-CMV ?

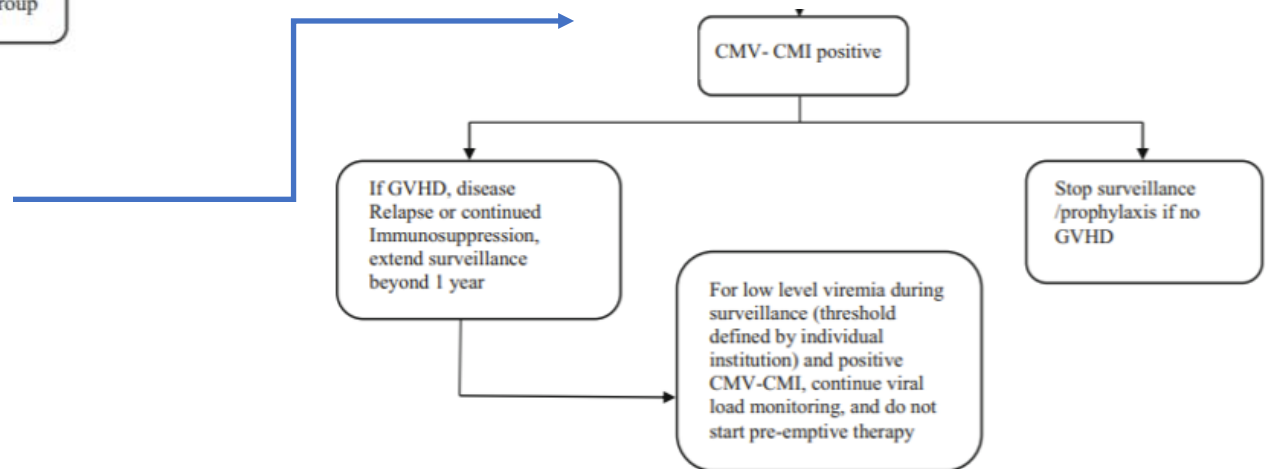
Marty *et al.* N Engl J Med 2017



## Proposition d'un algorithme décisionnel

CMV Infection in HSCT : Prevention and Treatment Strategies.

N Jakharia, D Howard, DJ Riedel. Curr Treat Options Infect Dis 2021.



Difficultés pour recommandations universelles

Variabilité des facteurs influençant la reconstitution immunitaire anti-CMV :

- Sérologie donneur/receveur
- Degré de compatibilité HLA
- Type de conditionnement et de greffon
- Prévention / traitement de la GvH
- Méthodologie d'immunomonitorage (Ags, techniques, ...)

Importance d'un suivi personnalisé, longitudinal, co-évaluation avec charge virale

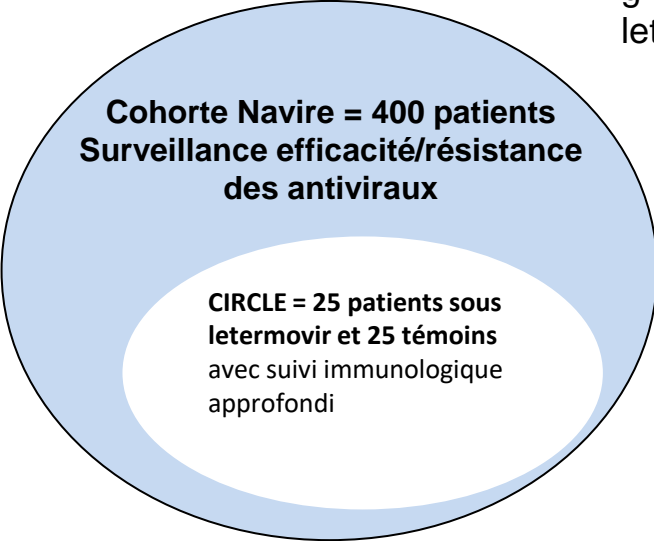
*Importance des LT polyfonctionnels ?*

# Etude CIRCLE

## Reconstitution immune après allogreffe en cas de prophylaxie anti-CMV par letermovir

**Objectif principal:** Décrire la reconstitution immunologique globale et anti-CMV **avec et sans letermovir** chez les patients greffés R+ à haut risque d'infection à CMV. PI : Pr S Alain, CHU de Limoges

**Evaluation de la réponse cellulaire et humorale:** J-8, J20 (prise de greffe), J100, J200 (fin de prophylaxie pour les patients traités par letermovir) et un mois après réactivation éventuelle



**Cohorte Navire = 400 patients**  
**Surveillance efficacité/résistance**  
**des antiviraux**

**CIRCLE = 25 patients sous**  
**letermovir et 25 témoins**  
avec suivi immunologique  
approfondi

### 1- Evaluation de l'immunité innée :

- Etude qualitative et fonctionnelle des cellules NK,
- ARN CD74 test Monitor™ (Qiagen),
- Taux de cellules myéloïdes suppressives circulantes

### 2- Evaluation de l'immunité spécifique :

- Quantiféron CMV, Elispot CMV, ICS
- Quantification des IgG spécifiques du CMV dans le plasma

Merci de votre attention

[marcelo.decarvalho@univ-lorraine.fr](mailto:marcelo.decarvalho@univ-lorraine.fr)

