



HAL
open science

L'expansion des lymphocytes T gamma-delta peut-elle prédire la résolution de l'infection ou l'émergence d'une souche virale mutée chez les patients transplantés rénaux ?

Hannah Kaminski

► To cite this version:

Hannah Kaminski. L'expansion des lymphocytes T gamma-delta peut-elle prédire la résolution de l'infection ou l'émergence d'une souche virale mutée chez les patients transplantés rénaux ?. Médecine humaine et pathologie. 2014. dumas-01077807

HAL Id: dumas-01077807

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01077807v1>

Submitted on 10 Nov 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux
Collège science de la santé
Faculté de Médecine

Année 2014

Thèse n°3014

THÈSE

Pour l'obtention du

DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ de BORDEAUX

Présentée et soutenue publiquement

Le 04/04/2014

Par Hannah KAMINSKI

Née le 10/02/1984 à Fontenay sous Bois (94)

Directeur de thèse :

Pr Pierre MERVILLE

L'expansion des lymphocytes T gamma-delta peut-elle prédire la résolution de l'infection à CMV ou l'émergence d'une souche virale mutée chez les patients transplantés rénaux ?

Membres du Jury

M. le Professeur Pierre MERVILLE, néphrologue

M. le Professeur Jean-François MOREAU, immunologiste

M. le Professeur Didier NEAU, infectiologue

Mme le Docteur Julie DECHANET-MERVILLE, immunologiste

M. le Professeur Christian COMBE, néphrologue

M. le Docteur Lionel COUZI, néphrologue

M. le Professeur Rodolphe THIEBAUT, biostatisticien

Directeur

Président

Rapporteur

Juge

Juge

Juge

Juge

A mon grand-père,

A ma grand-mère,

A mes parents,

A ma sœur et à mon frère,

Remerciements

Je remercie infiniment le **Professeur Pierre Merville** de m'avoir fait confiance pour ce travail et de m'avoir soutenue pour le mener à bien sur ces quelques trois années. Je vous remercie de m'avoir mise sur ce chemin parfois périlleux mais si riche d'enseignements. C'est avant tout le chemin et non le résultat auquel j'ai attaché de l'importance, celui qui m'a fait découvrir et aimer l'immunologie mêlé d'infectiologie et de statistiques. Merci pour votre patience et pour votre écoute.

Je remercie le **Docteur Julie Déchanet-Merville**, d'accepter de juger ce travail. Merci à toi de m'avoir initiée à la recherche fondamentale en m'accueillant chaleureusement à l'UMR 5164 CIRID où je retournerais avec grand plaisir. J'ai été impressionnée par ton esprit aiguisé et optimiste, ainsi que par la précision de tes connaissances. Ce fut pour moi une expérience riche sur le plan scientifique et humain. J'y ai vécu de curiosité scientifique, de discussions, et de bonne humeur, aux côtés de Romain et de toute l'équipe de recherche, et à ton contact.

Je remercie le **Professeur Jean-François Moreau** d'accepter de présider ce jury. C'est pour moi un grand honneur de vous compter parmi les juges de ce travail. Je vous remercie d'avoir fait en sorte que l'enseignement de l'immunologie soit de ce niveau à Bordeaux, en y formant une équipe de qualité. Je vous remercie pour l'attention que vous m'avez portée dans ces discussions tantôt scientifiques et tantôt culturelles, témoin de l'étendue de vos connaissances et aussi de vos qualités humaines.

Je remercie le **Professeur Neau** d'avoir accepté de rapporter et de juger ce travail. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez portée depuis mon premier semestre d'internat jusqu'au clinicat que je suis heureuse de réaliser dans votre service. Vous avez respecté et encouragé ma décision de ne pas choisir entre la Néphrologie et l'Infectiologie, merci encore pour votre soutien.

Je remercie le **Professeur Combe** d'accepter de juger ce travail. Je vous remercie pour votre enseignement et vos connaissances en Néphrologie, pour votre goût de rendre service, qui selon moi est la première raison de vouloir exercer ce métier. J'ai appris dans votre service, l'exercice d'une médecine responsable et raisonnable.

Je remercie le **Professeur Rodolphe Thiébaud** d'accepter de juger ce travail mais surtout d'avoir accepté d'accompagner et de soutenir ce projet. Les biostatistiques sont une matière difficile à aborder pour une non-initiée et j'ai essayé d'apprendre au maximum de ton enseignement. Je te remercie pour l'enthousiasme et l'intérêt que tu as mis dans ce travail. J'espère que tu accepteras de poursuivre ton enseignement à travers d'autres projets.

Je remercie le **Docteur Lionel Couzi** d'accepter de juger ce travail. Ton expertise dans le domaine et finalement ton regard plus extérieur sont pour moi très importants dans l'analyse des résultats. Par ailleurs, je te remercie pour l'enseignement implicite que tu m'as apporté lors de mes deux passages dans le service de Transplantation rénale : raisonnement rigoureux, pragmatisme, contact avec les patients et avec l'équipe, avec une pointe de décontraction et de bonne humeur.

Je remercie le **Docteur Isabelle Garrigue**, pour son soutien dans les débuts de ce travail. Je me souviens avec le sourire de ces moments passés à -20°C, gantés, à chercher des alicots dans les méandres de la sérothèque de Virologie. Merci à toi pour ta gentillesse et la relecture de ce travail.

Je remercie **Benjamin Taton**, pour son amitié et son aide dans les subtilités du langage informatique de R.

Le rendu et la soutenance de mon travail de thèse de médecine est l'occasion pour moi de saluer les personnes qui ont marqué mon parcours.

Je salue et remercie les enseignants qui ont guidé mes premiers pas en médecine : le Pr Matheron (Infectiologie, Bichat Claude Bernard), le Pr Fantin (Médecine Interne, Beaujon), le Dr Agnès Le Fort (Médecine Interne, Beaujon), le Pr Maillard, Victoire.

Je remercie les chefs de clinique qui ont participé à ma formation au fil des différents semestres de mon internat : Thomas Bachelet (x2), Caroline Lалуque, Sébastien Hélou, Gabrielle Duneau.

Je remercie l'équipe médicale des services de dialyse, néphrologie, et transplantation de Pellegrin, auprès de qui il est agréable d'apprendre, par la diversité de compétence de chacun et le goût du compagnonnage : Valérie De Précigout, Yahsou Delmas, Renaud De la Faille, Karine Moreau, Delphine Morel, Benoît Vendrely, Claire Rigother.

Je remercie les médecins de réanimation médicale Aile 1 de Pellegrin de m'avoir confié, les premiers, la responsabilité de malades, en tant que médecin senior de garde (je n'aurais jamais pensé en être capable et j'ai eu confiance parce que vous aviez confiance en moi) : Pr Didier Gruson, Dr Alexandre Boyer, Dr Benjamin Clouzeau, Dr Odile Pillet.

Je remercie les équipes paramédicales des services de Maladies Infectieuses, de Réanimation Médicale et du département de Néphrologie de Pellegrin avec qui on partage l'envie de soigner.

Je salue mes co-internes actuels et passés avec qui j'ai passé de bons moments en stage et en dehors : Aurélien, Stéphanie, Lucile, Juliette, Marie, Louis, Mélanie, Laure, Maxime, Philippine, Aurore, Agathe, Pauline, Mathilde, Charlotte, Simon.

Enfin, je salue mes amis d'enfance et ceux qui le sont devenus plus récemment : Laurence, Benoît, Aurélie et Etienne, Constance, Lucie, Caroline et Benjamin, Delphine, Muriel, Mathilde, Florent, Anna et Irène. Une attention particulière à Karine, pour son amitié et son efficacité (trois quart d'heure pour faire le Nord et le Jaune sans appel en suivant... une prouesse !)

Sommaire

• Abréviations	6
• Introduction	7
I. Le CMV, un vieil hôte de l'homme	8
A. Structure virale	9
B. Réplication virale	9
II. La réponse immunitaire anti-CMV : relation dynamique hôte-pathogène	11
A. La réponse innée	12
B. La réponse NK	13
C. La réponse humorale	14
D. La réponse cellulaire T	14
1. Les lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels	14
2. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ V $\delta 2^{\text{neg}}$	15
III. L'immuno-surveillance en situation à risque d'infection à CMV et sa place dans la prise en charge de la maladie	16
A. Prise en charge actuelle du CMV en transplantation	16
B. Place potentielle de l'immuno-surveillance dans la prise en charge du CMV en transplantation	19
1. Surveillance de la réponse NK	19
2. Surveillance de la réponse humorale	20
3. Surveillance de la réponse T spécifique	20
4. Commentaires sur les études réalisées	24
5. Perspectives	25
6. Notre étude et place des lymphocytes T $\gamma\delta$ V $\delta 2^{\text{neg}}$ dans l'immuno-surveillance de l'infection à CMV chez les transplantés rénaux	26
IV. Références	27
• Article produit au cours de la thèse :	32
Dynamics of V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells can predict the resolution of CMV infection and the emergence of a mutant viral strain in kidney transplant recipients	33
Abstract	33
Introduction	34
Patients and Methods	36
Results	38
1. Baseline characteristics of patients	38
2. Kinetics of V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells in kidney transplant recipients	40
3. Determination of the rate of V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells expansion	42
4. Delay for V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells expansion is correlated with the time of CMV resolution	44
5. Factors influencing the delay of expansion of V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells in D+R- patients	46
6. Anti-viral drug resistance occurs in the absence of viral clearance 39 days after V $\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells expansion	46
Discussion	49
References	52
• Annexes	55
• Serment de l'ordre français des médecins	58

• Abréviations

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

CD : Cluster de Différenciation

CMV : Cytomégalovirus

TCR : Récepteur T à l'antigène

D/R : Donneur-Receveur (séro-statut CMV positif ou négatif du donneur et du receveur lors d'une greffe d'organe)

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

HLA : Human Leukocyte Antigen

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IFN : Interféron

KIR: Killer cell Ig-like receptor

LT : Lymphocyte T

LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} : Lymphocyte T $\gamma\delta$ V δ 2 négatif

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

mTORi : inhibiteur de la voie des mTOR

NK : Natural Killer

PCR : Polymerase chain reaction

PD-1 : Programmed Cell Death 1

PDL-1 : Ligand de PD-1

TLR : Toll-Like Receptor

VPP : Valeur prédictive positive

VPN : Valeur prédictive négative

• Introduction

A l'heure où la solution de la transplantation s'est imposée comme le traitement de choix de l'insuffisance rénale¹, les enjeux s'orientent vers l'amélioration de la prise en charge des complications du traitement immunosuppresseur au long cours. Les infections représentent la deuxième cause de mortalité chez le transplanté d'organes solides^{2,3} et l'infection à CMV est la plus fréquente de ces complications infectieuses, avec un effet direct démontré à la fois sur la survie du greffon mais aussi du patient⁴. La prise en charge de l'infection à CMV chez le transplanté d'organes solides fait l'objet de recommandations internationales régulièrement mises à jour dont les dernières publiées en août 2013 résument les avancées en termes de diagnostic virologique, de prévention, de surveillance et de traitement.

La prise en charge actuelle repose sur la prévention de la survenue de l'infection. Une stratégie dite de prophylaxie universelle qui consiste à débiter un traitement antiviral à dose préventive au cours des premiers mois post-transplantation peut être réalisée. Une stratégie préemptive est également possible, avec surveillance régulière pendant les premiers mois post-transplantation de l'ADNémie CMV par PCR quantitative en temps réel, en débutant un traitement curatif à partir d'un certain seuil de charge virale, pour lequel il n'existe actuellement pas de consensus. Les deux stratégies permettent une prévention correcte de la maladie à CMV dans l'attente du développement d'une réponse immune efficace, sur le plan quantitatif et fonctionnel, de la part de l'hôte immunodéprimé. En ce sens, la transplantation d'organes solides représente un modèle unique pour identifier et mieux comprendre le rôle des principales composantes immunologiques responsables du contrôle du virus, dans le contexte d'une immunosuppression induite⁵.

Si le contrôle de l'infection à CMV chez le transplanté est la résultante du traitement antiviral et de la réponse immune, plusieurs questions restent à résoudre : Comment mesurer la réponse immune anti-CMV afin de prédire le risque d'infection ou de maladie à différents moments de la transplantation ? Le traitement préventif gêne-t-il la mise en place d'une réponse efficace ? Ce retard de développement de la réponse immune explique-t-il la survenue des infections tardives à l'arrêt de la prophylaxie ? Quelle prise en charge, prophylactique ou préemptive, favorise-t-elle le mieux la mise en place d'une

réponse adéquate de l'hôte ? La réponse à ces questions, grâce à une mesure de la réponse immunologique spécifique du CMV, permettrait à la fois une surveillance plus précise des conséquences directes et indirectes de l'infection à CMV et une épargne de molécules antivirales avec leur propre toxicité. Une mesure de la réponse immunologique spécifique du CMV pourrait également s'intégrer dans de futures avancées apportées par une stratégie vaccinale ou par la modulation du traitement immunosuppresseur afin de proposer une prise en charge optimale des patients.

Dans cette revue, nous proposons une synthèse des connaissances actuelles sur le CMV, les mécanismes de défense immunologique, et, en corollaire, les différents tests immunologiques permettant de caractériser cette réponse dans le contexte de la transplantation d'organes. Enfin, nous nous attarderons sur un des acteurs de cette réponse immunitaire anti-CMV, le lymphocyte T $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} qui a été au centre des recherches de notre équipe au cours des quinze dernières années, et nous verrons en quoi il peut être utile comme outil de surveillance immunologique du CMV en transplantation rénale.

I. Le CMV, un vieil hôte de l'homme

Son nom, « maladie des inclusions cytomégaliennes », vient à l'origine de l'aspect des cellules humaines lors de leur infection. L'origine virale est suspectée par Lipschutz qui constate en 1921 la similitude de ces cellules avec la lésion herpétique⁶, puis son nom lui est donné par Weller en 1961 après des expériences confirmant la réplication virale dans des fibroblastes humains infectés à partir de tissus ou produits humains de différentes origines (glandes salivaires, tissu adénoïdien, foie, urines)^{7,8}.

Le CMV humain n'infecte que l'homme par contact étroit avec différents liquides biologiques ou par transfert de cellules vivantes infectées (transfusion sanguine, greffe de cellules souches hématopoïétiques ou transplantation d'organes solides). Les conditions socioéconomiques influencent la séroprévalence, qui est d'autant plus importante qu'elles sont précaires. En France, la fréquence de sujets séropositifs est voisine de 50% et augmente avec l'âge⁹. Chez la majorité des individus, ce large portage asymptomatique n'a aucune conséquence pathologique, et est lié au statut d'*immunocompétence*.

Les connaissances concernant la physiopathologie du cycle viral (latence, réactivation, dissémination, infection avec atteinte d'organes) et le contrôle par le système immunitaire ont pu progresser dans les rares situations où l'infection était symptomatique : l'infection materno-fœtale, les déficits immunitaires à prédominance cellulaire comme le VIH et la transplantation d'organes solides ou la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

A. Structure virale

Le CMV humain est le plus grand des virus du groupe herpes (HHV5 sous famille β) avec un génome d'environ 235 kilobases codant pour 165 gènes.

Le virion est composé d'ADN viral linéaire double brin organisé en deux segments uniques longs (UL) et courts (US), associés aux protéines spermine et spermidine pour former le *core*, contenu dans une nucléocapside icosaédrique, et entouré d'une matrice appelée tégument. Il s'agit d'un virus enveloppé d'une bicouche lipidique dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines du virus. La taille des virions matures varie entre 200 et 300 nm.

Les protéines du tégument jouent principalement un rôle structural dans l'assemblage du virion et le désassemblage des particules après l'entrée, ainsi qu'un rôle de modulation de la réponse immunologique cellulaire de l'hôte. On retiendra deux phosphoprotéines du tégument constitutives à elles seules de 35% de la masse protéique de la particule : pp65 (ppUL83) et pp150 (ppUL32). Les protéines d'enveloppe sont impliquées dans les phénomènes d'attachement et de pénétration du virus et sont aussi les cibles des anticorps neutralisants, notamment gB et gH.

B. Réplication virale

Elle commence par l'entrée du virus dans la cellule. Certains récepteurs cellulaires ont été décrits mais restent mal caractérisés : l'héparan sulfate et l'annexine A2 permettent une fixation non spécifique du virus, le récepteur pour l'EGF (*epidermal growth factor*)¹⁰ et l' $\alpha v\beta 3$ intégrin¹¹ ont également été impliqués.

Les protéines virales gB par interaction avec DC-SIGN¹², gM/gN et gH participent ensuite à l'entrée cellulaire du virus avec pour finir la fusion des membranes. Plus récemment, le complexe gH/gL/UL128/UL130/UL131A a été décrit comme nécessaire à l'entrée du virus dans les cellules endothéliales et épithéliales¹³. Il est ciblé par certains anticorps neutralisants chez des individus séropositifs et fait actuellement l'objet d'essais cliniques de biothérapie¹⁴.

La transcription du génome se déroule en trois phases : la phase très précoce (*immediate early*, IE) débute en l'absence de synthèse *de novo* de protéines virales, la phase précoce (*early*, E) débute après l'expression des protéines très précoces et se termine quand commence la synthèse de l'ADN viral et enfin la phase tardive (*late*, L), pendant laquelle sont transcrits la plupart des gènes codant les protéines de structure.

Les ADN viraux synthétisés s'organisent en concatémères qui sont clivés et empaquetés dans les capsides qui s'assemblent dans le noyau. En quittant le noyau, la nucléocapside s'enveloppe dans la membrane interne du noyau. Elle perd cette enveloppe provisoire pour acquérir les protéines du tégument dans le cytoplasme. L'enveloppe définitive est acquise quand la particule bourgeonne dans la lumière d'un compartiment dérivé du système sécrétoire cellulaire, le compartiment d'assemblage, de nature encore mal connue⁹.

Le virus a un large tropisme cellulaire. Il peut infecter un vaste panel de cellules humaines : cellules épithéliales, cellules endothéliales, fibroblastes, cellules musculaires lisses, cellules dendritiques, monocytes, macrophages, lymphocytes, progéniteurs granulaires, granulocytes. En revanche, il ne se réplique que dans les cellules différenciées. Ce virus peut ne pas être infectieux : cela caractérise l'état de latence, avec la présence d'ADN viral sans production de protéines et de nouvelles particules virales, mise en évidence au niveau de monocytes, macrophages, cellules dendritiques, progéniteurs CD34+, cellules endothéliales.

Le virus est également capable de détourner certaines voies d'activation cellulaire pour assurer sa propre répllication. Ce mécanisme a été bien démontré pour la voie mTORC1 alors que celle-ci est normalement inhibée en période de stress cellulaire, il a été montré le maintien de l'activité de la kinase mTOR dans les cellules infectées à CMV^{15,16}. Ces constatations rejoignent les observations cliniques qui montrent un effet favorable des inhibiteurs de mTOR (mTORi) dans le contrôle viral.

Des observations initiales ont suggéré que le sirolimus combiné avec le ganciclovir pouvait être bénéfique chez les patients atteints de souches virales résistantes¹⁷, et plusieurs études ont rapporté une incidence plus faible d'infection à CMV avec une utilisation *de novo* de mTORi après transplantation rénale, cardiaque ou hépatique comparée à la ciclosporine ou tacrolimus¹⁸⁻²⁰. Enfin, un examen systématique de la littérature, et une méta-analyse, suggèrent une réduction du risque d'infection à CMV avec les mTORi *versus* les immunosuppresseurs de type anti-prolifératifs (à base d'acide mycophénolique)^{21,22}. Les résultats d'essais prospectifs sont attendus pour améliorer le niveau de preuve scientifique validant l'effet anti-CMV des mTORi en pratique clinique.

II. La réponse immune anti-CMV : relation dynamique hôte-pathogène

Les moyens mis en jeu par le système immunitaire pour se défendre contre le CMV sont multiples et se sont diversifiés au cours de l'évolution, avec les stratégies développées par le CMV pour s'évader de ce contrôle immunologique (échappement viral). Le schéma général de mise en place de la réponse immune spécifique du CMV est illustré par la Figure 1.

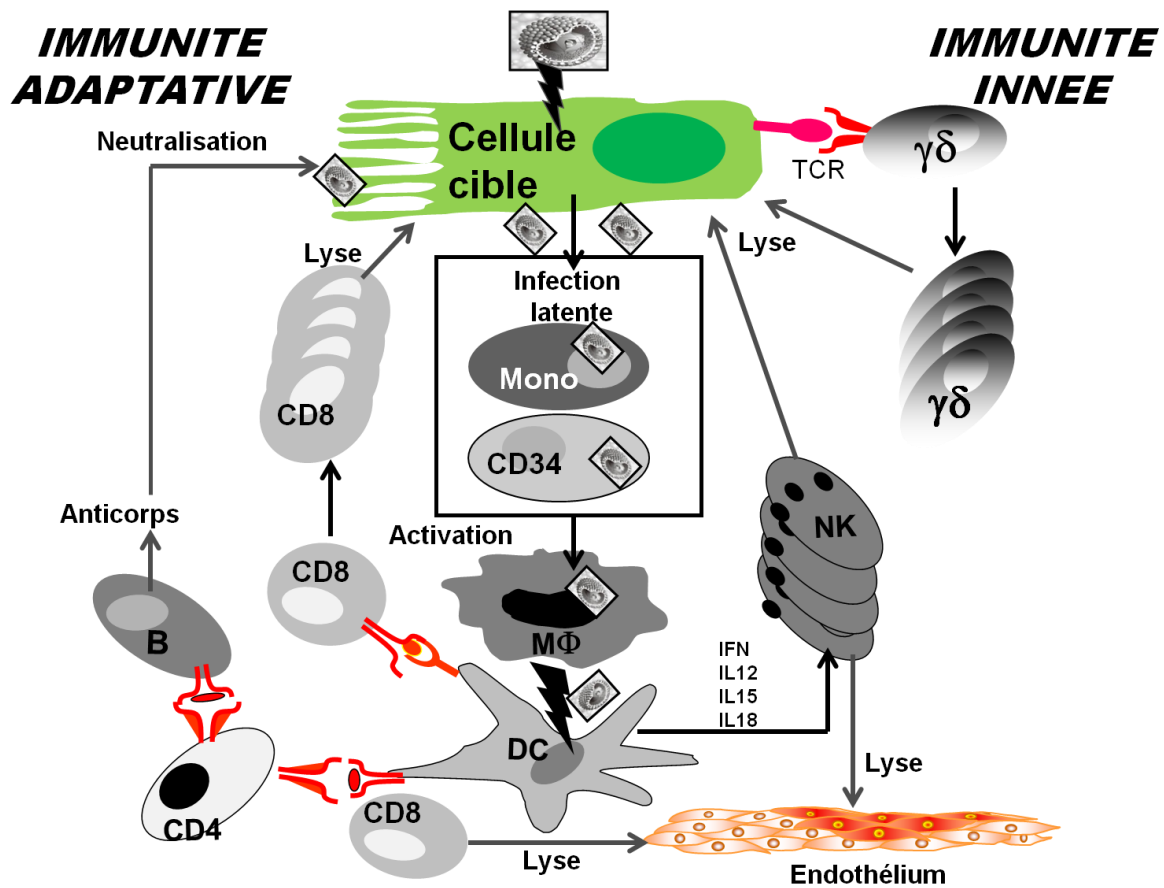


Figure 1 : Schéma général de la réponse immunitaire spécifique du CMV

La primo-infection par le CMV chez les individus sains se traduit par une phase de réplication dans l'épithélium des muqueuses, à partir duquel le virus se dissémine aux cellules endothéliales, aux fibroblastes mais également aux monocytes et aux progéniteurs CD34+ de la moelle osseuse. La différenciation de ces monocytes infectés par le CMV en macrophages peut initier une infection productive. Les particules virales sont alors apprêtées par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (*ie* cellules dendritiques), qui sont ensuite en mesure de mettre en œuvre une stimulation spécifique des cellules T, CD8 et CD4, et des cellules B, permettant la génération d'anticorps neutralisants. Parallèlement à cette réponse adaptative, une réponse innée se met en place : les cellules NK et les lymphocytes T $\gamma\delta$ qui peuvent induire la lyse directe des cellules infectées par le virus ou bloquer la réplication du virus par la sécrétion de cytokines (IFN- γ et TNF- α).

A. La réponse innée

La stimulation des Toll-Like Recepteurs (TLR) par des agents pathogènes tels que le CMV humain active les voies de transduction de signaux qui induisent la sécrétion de cytokines inflammatoires

elles-mêmes recrutant les cellules du système immunitaire inné. Les TLR opèrent de plus une régulation positive de molécules co-stimulatrices telles que CD80 et CD86, qui sont importantes pour l'activation de l'immunité adaptative^{23,24}. TLR9 et TLR3 sont des éléments essentiels dans la réponse innée contre le cytomégalovirus murin²⁵⁻²⁷. Après inoculation virale, leurs voies de signalisation sont activées, ce qui conduit à la production d'IFN I par les cellules dendritiques et les macrophages ainsi que par la suite les cellules NK²⁵⁻²⁷. Chez l'homme, TLR2 a été décrit pour activer la production de cytokines inflammatoires grâce à l'interaction avec gB/gH^{24,28,29}. Cette réponse est décrite comme très rapide, dans les premières heures qui suivent l'infection.

B. La réponse NK

Elle contribue au contrôle de l'infection par production de cytokines type IFN γ , cytotoxicité directe et dépendante du complément (ADCC, *antibody-dependent cell mediated cytotoxicity*) avec une activité débutant 15 jours après le début de l'infection³⁰. Ils prolifèrent dans le sang périphérique pendant une virémie, avec à la phase aiguë l'expression du récepteur NKG2C et un fort potentiel de production d'IFN γ . Puis ils acquièrent un phénotype mature CD56+ lors d'une réactivation qui contribue ainsi au contrôle de l'infection au long cours³⁰. De plus, le CMV entraîne une expansion clonale des cellules NK dans le sang de sujets sains. En effet, l'analyse du répertoire des récepteurs activateurs ou inhibiteurs de cytotoxicité (KIR) sur les cellules NK chez 200 donneurs a montré que seul le CMV induisait une expansion clonale des cellules NK (exprimant un motif clonal de KIR)³¹.

En transplantation rénale, la réponse NK augmente dans les primo-infections et les réactivations à CMV³². Dans un rapport de cas, la déficience en cellules NK a été associée à une primo-infection herpétique sévère, y compris la maladie à CMV³³. Chez 43 patients traités par allogreffe de cellules souches hématopoïétiques atteints de CMV, le niveau de cytotoxicité des cellules NK était corrélé avec la capacité du patient à contrôler l'infection³⁴. Zaia et al. ont montré que la présence, dans le sang des patients, de cellules NK exprimant majoritairement des récepteurs activateurs (KIR 2DS2 et 2DS4), était associée à une diminution de réactivation virale³⁵.

C. La réponse humorale

Les anticorps spécifiquement dirigés contre le virus apparaissent dans les 2 à 4 semaines suivant l'infection³⁶, ont pour cibles principales les protéines de l'enveloppe et ciblent donc essentiellement les virus extracellulaires : gB (jusqu'à 70% des anticorps produits³⁷), H, L, pUL128-131³⁶.

Les anticorps anti-CMV sont impliqués dans le contrôle de la dissémination virale et diminuent la gravité de la maladie. Ils peuvent être neutralisants, induire l'apoptose, former des complexes immuns, participer à la clairance antigénique, et par leur fragment constant induire une activation du complément ou une activation de cellules cytotoxiques effectrices par l'intermédiaire du CD16. Ce mécanisme a récemment été décrit pour les lymphocytes T (LT) $\gamma\delta$ capables de diminuer la réplication virale en produisant de l'IFN γ après activation via leur CD16 par des complexes immuns virions-IgG anti-CMV³⁸.

La réponse humorale est toutefois peu efficace pour empêcher la transmission directe d'une cellule à une autre.

D. La réponse cellulaire T

L'infection à CMV est majoritairement contrôlée par la réponse cellulaire T, l'infection étant invasive uniquement en cas d'immunodépression prédominant sur cette réponse. La réponse cellulaire T fait appel aux lymphocytes T conventionnels, $\alpha\beta$, de type CD4+ (LTCD4+) et CD8+ (LTCD8+) et à des lymphocytes T non conventionnels, les LT $\gamma\delta$.

1. Les lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels

Ils s'amplifient 4 à 6 semaines après le début de l'infection.

Les lymphocytes T CD8 : leur implication dans le contrôle viral a été démontrée à plusieurs niveaux : Dans les modèles murins, la déplétion en LTCD8+ augmente le taux de réplication virale et sa dissémination ; le transfert adoptif de LTCD8+ spécifiques restaure une réponse anti-CMV chez les souris immunodéficientes^{39,40}.

Chez les individus sains, 10% du répertoire des LTCD8+ d'un adulte d'âge moyen et 40 % pour un sujet âgé, est dirigé contre une spécificité antigénique du CMV. Par ailleurs, il a été montré que le répertoire CD8+ et CD4+ d'un individu pouvait reconnaître 70% des peptides (au nombre de 13687) codés par l'ensemble des 213 cadres de lecture du génome viral du CMV⁴¹.

En transplantation de cellules souches hématopoïétiques, l'utilisation en thérapie cellulaire de LTCD8+ spécifiques permet une protection contre les atteintes d'organes liées à l'infection par le CMV^{42,43}. En transplantation rénale, la mise en évidence d'une réponse CD8+ spécifique est liée à une virémie moindre et à l'absence de maladie⁴⁴⁻⁴⁶.

Les lymphocytes T CD4 : ils sont également impliqués dans la réponse anti-CMV :

Chez des souris déplétées en LTCD8+, ils interviennent dans le contrôle d'une primo-infection. Une déplétion de LTCD4+ entraîne une augmentation des récurrences de la maladie^{47,48}.

En greffe de cellules souches hématopoïétiques, la présence de LTCD4+ auxiliaires est associée à une protection virale⁴⁹. Ces LTCD4+ spécifiques conditionnent la reconstitution endogène de la réponse CD8+ cytotoxique⁵⁰. En transplantation rénale, ils augmentent plus tardivement que les LTCD8+, avec un rôle dans le maintien d'une réponse anti-virale soutenue⁴⁶. Certaines études cliniques montrent même qu'ils prédisent mieux l'absence d'infection ou de maladie à CMV que la réponse T CD8+⁵¹⁻⁵³.

2. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 2^{neg}

Il s'agit d'une sous-population de lymphocytes T puisqu'ils expriment un TCR mais à la différence des lymphocytes T conventionnels exprimant un TCR constitué d'une chaîne α et β , ils expriment un TCR constitué d'une chaîne γ et δ . Ils sont caractérisés par immunophénotypage en cytométrie en flux à partir du sang total des patients.

On distingue chez l'homme deux populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ en fonction de leur chaîne δ : les lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 2 prédominent dans le sang périphérique, et les lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} (majoritairement V δ 1, 3 et 5) sont présents essentiellement au niveau des organes.

Les LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} ont plus récemment été mis en évidence dans la réponse immunitaire spécifique anti-CMV chez l'homme.

Notre équipe a prouvé leur implication spécifique dans la réponse anti-CMV par une première observation montrant leur expansion dans le sang périphérique des patients transplantés de rein uniquement après une infection à CMV^{54,55}. Puis il a été montré leur augmentation avec la prédominance d'un phénotype mémoire corrélée à une sérologie CMV positive dans le sang périphérique de sujets sains et avant transplantation⁵⁶. Leur activation est en partie spécifique du TCR avec amplification clonale puis acquisition d'un phénotype mémoire. Initialement, cette activation spécifique du TCR a été démontrée en reproduisant une réactivité spécifique par transfert de TCR $\gamma\delta$ ⁵⁷ et plus récemment par la caractérisation de certains ligands antigéniques. Ceux-ci sont reconnus sous leur forme native (contrairement aux antigènes reconnus sous forme peptidique au sein d'une molécule HLA pour le TCR $\alpha\beta$) et sont impliqués dans les signaux de stress cellulaire lors d'une infection à CMV⁵⁸. La localisation tissulaire et la reconnaissance d'antigènes natifs sont des caractéristiques de l'immunité innée permettant une réponse rapide à l'agression par le pathogène. L'activation spécifique du TCR avec amplification clonale⁵⁵ et l'acquisition d'un phénotype mémoire⁵⁹ permettant un contrôle plus efficace lors d'un nouveau contact avec le pathogène sont des caractéristiques de l'immunité adaptative⁵⁶. A l'interface de ces deux immunités, les LT $\gamma\delta$ sont des cellules de surveillance du stress cellulaire, ce qui en fait un objectif intéressant d'étude dans la surveillance immunologique de l'infection à CMV en pratique clinique.

III. L'immuno-surveillance en situation à risque d'infection à CMV et sa place dans la prise en charge de la maladie.

A. Prise en charge actuelle du CMV en transplantation

Les dernières recommandations axent la prise en charge de la maladie à CMV sur la stratification du risque avant la greffe pour décider du mode de prévention, le diagnostic de l'infection et de la maladie à CMV, le traitement curatif et la prise en charge des résistances. Le Tableau 1 résume ces données.

Tableau 1 : Définitions et recommandations actuelles sur la prise en charge du CMV en transplantation d'organes solides

DEFINITIONS ET RECOMMANDATIONS	
INFECTION	PCR virale en temps réel (ADNémie) positive dans le sang sans symptômes
MALADIE	Syndrome viral à CMV : Infection + fièvre, arthromyalgie, leucopénie, thrombopénie, cytolyse hépatique Maladie invasive à CMV : atteinte d'organe et mise en évidence du virus <i>in situ</i> .
RECIDIVE DE LA MALADIE	Deux ADNémies consécutives positives survenant après une première infection traitée et guérie
INFECTION TARDIVE	Deux ADNémies consécutives positives survenant après au moins 3 mois de greffe et après la fin du traitement préventif (dépend donc de la durée du traitement préventif : 3 ou 6 mois)
EFFETS DIRECTS	Dysfonction de l'organe infecté, syndrome à CMV
EFFETS INDIRECTS	Chez le greffé : facteur de risque indépendant de mortalité, d'autres infections opportunistes, de syndromes lymphoprolifératifs. Chez le greffon : diminution de la survie du greffon (fibrose interstitielle et atrophie tubulaire), rejet, sténose de l'artère du greffon
OUTILS DIAGNOSTIQUES	PCR CMV dans le sang en UI/ml pour le diagnostic de l'infection et du syndrome, le suivi en préemptif, la réponse au traitement Immunohistochimie ou hybridation <i>in situ</i> pour le diagnostic d'atteinte d'organe Si la PCR sang et l'immunohistochimie sont négatives, la PCR <i>in situ</i> aide au diagnostic d'atteinte d'organe
PREVENTION	Prophylaxie universelle : VALGANCICLOVIR à posologie adaptée au débit de filtration glomérulaire estimé selon la formule de DFG (Cockcroft et Gault) 3 à 6 mois post greffe. Traitement préemptif : surveillance de l'ADNémie par PCR dans le sang et traitement au-delà d'un seuil non consensuel fixé par le centre. La surveillance est hebdomadaire dans les trois premiers mois, puis la fréquence lors l'espacement n'est pas consensuelle
TRAITEMENT CURATIF	VALGANCICLOVIR 900mg/12h = GANCICLOVIR 5mg/kg/12h : maladie non grave GANCICLOVIR systématique : enfant, maladie grave, trouble d'absorption par voie orale Durée : obtention de deux ADNémies négatives à deux semaines d'intervalle, avec un minimum de 15 jours Traitement prophylactique : VALGANCICLOVIR 900mg/jour, 1 à 3 semaines peut être administré en suivant
RESISTANCE	Epidémiologie : survenue dans 6 à 17% des infections à CMV, impact sur la mortalité et sur la fonction du greffon. Suspicion clinique : exposition > 6semaines au GANCICLOVIR, non amélioration >2semaines de GANCICLOVIR IV pleine dose. Diagnostic : séquençage ciblé de l'ADN codant pour UL97 (kinase) ou UL54 (ADN polymérase) Traitement : GANCICLOVIR forte dose/FOSCAVIR/diminution du traitement immunosuppresseur

Après transplantation rénale, il est préconisé de stratifier le risque de survenue de maladie à CMV par la sérologie du donneur et du receveur⁶⁰. Dans tous les cas, une stratégie préventive est recommandée en dehors des patients D-R-.

Chez les D+R-, il est possible de pratiquer une stratégie préemptive ou une prophylaxie universelle pendant 3 à 6 mois, en privilégiant une durée de 6 mois⁶¹.

Chez les patients R+, les deux stratégies sont également possibles, avec une durée de trois mois de prophylaxie universelle. Le Tableau 2 résume les résultats actuels de l'une ou l'autre stratégie dans les

groupes à risque d'infection. Bien que globalement efficaces, ces stratégies n'empêchent pas la survenue d'une infection ou d'une maladie dans un nombre significatif de cas.

Tableau 2 : Taux d'infection ou de maladie à CMV en fonction du statut du donneur et du receveur avant la greffe rénale et en fonction de la stratégie de prévention.

	EN L'ABSENCE DE TRAITEMENT			REFERENCES
	D+R-	D+R+	D-R+	
INFECTION/MALADIE	68 %	63 %	50 %	62-66
	AVEC UNE PROPHYLAXIE UNIVERSELLE			
INFECTION	3 mois : 51 % 6 mois : 37 %	3 mois : 25 %	3 mois : 23 %	61-65,67
MALADIE	3 mois : 26 % 6 mois : 16 %	3 mois : 7 %	3 mois : 2 %	61,62,67
	AVEC UN TRAITEMENT PREEMPTIF			
INFECTION	68 %	63 %	50 %	62-66
MALADIE	20 %	5 %	2 %	62,64,66-68

Prophylaxie universelle et traitement préemptif sont également efficaces pour prévenir la maladie à CMV. La prophylaxie universelle diminue donc principalement la survenue d'infection. Cette notion est importante au regard des effets indirects du CMV et de la prévention d'autres infections herpétiques couvertes par le VALGANCICLOVIR.

En revanche, le taux similaire de maladie suggère que le traitement préventif déplacerait uniquement le problème dans le temps, avec la survenue d'infection tardive à la fin du traitement. Cette infection peut être de diagnostic tardif et revêtir des caractères de gravité. Ceci soulève la question de la mise en place d'une réponse immune efficace sous traitement antiviral. Quant à la stratégie préemptive, elle pose le problème d'une organisation logistique astreignante pour la surveillance hebdomadaire des patients, l'obtention rapide du résultat et la mise en place précoce du traitement, avec des résultats

satisfaisants si ces conditions sont réunies^{62,69}. Il existe donc des avantages et des inconvénients à chacune de ces deux options et aucune étude ne permet pour l'instant de trancher.

Enfin, les facteurs favorisant la survenue de résistance commencent à être connus et la réponse immunitaire semble y être significativement associée : receveur naïf, intensité du traitement immunosuppresseur, notamment déplétant les populations lymphocytaires. Toutefois, à ce jour, il n'a pas été identifié de biomarqueurs capables de prédire le risque de survenue d'une souche mutée au cours d'une maladie à CMV.

Quand on considère ces différentes questions, l'intérêt de l'immuno-surveillance au cours de l'infection à CMV se situe à plusieurs niveaux. Chez les patients R+ à la transplantation : doit-on utiliser un traitement ? Chez les patients D+/R- à la fin des 3 à 6 mois de prophylaxie universelle: la prophylaxie doit-elle être poursuivie ou faut-il s'abstenir de traitement chez les patients ayant développé une réponse immune efficace ? Chez les patients avec un faible taux d'ADNémie : doit-on traiter ? A la résolution d'un premier épisode infectieux : Doit-on poursuivre la surveillance virologique ? Doit-on entreprendre une prophylaxie secondaire ? Existe-t-il un risque d'émergence d'une souche virale mutée ?

Pour trouver une réponse à ces questions, nous nous sommes tournés vers l'examen de la littérature actuelle dont l'objet est la surveillance de la réponse immune anti-CMV en pratique clinique.

B. Place potentielle de l'immuno-surveillance dans la prise en charge du CMV en transplantation

1. Surveillance de la réponse NK

En transplantation rénale, Stern a mis en évidence une corrélation entre la protection vis-à-vis d'une infection à CMV et l'haplotype KIR B/X du receveur. L'haplotype KIR A/A correspond à l'expression sur les cellules NK d'un seul KIR activateur : KIR 2DS4, contrairement aux autres haplotypes (KIR B/X) responsables de l'expression d'un plus grand nombre de KIR activateurs.

Dans l'étude de Stern en 2008, les receveurs porteurs d'un haplotype KIR A/A *versus* B/X étaient significativement plus à risque de faire une maladie à CMV et l'effet protecteur augmentait avec le nombre de KIR activateurs donné par l'haplotype⁷⁰.

Toutefois, un essai récent en transplantation de cellules souches hématopoïétiques ne montre pas d'intérêt prédictif du suivi des NK exprimant les KIR activateurs (NKG2C positifs) chez les patients déficients en réponse T CD4+ et T CD8+ spécifique du CMV ⁷¹.

2. Surveillance de la réponse humorale

Le séro-statut du donneur et du receveur est surtout utile pour stratifier le risque d'infection après la greffe. En 2005, il a été montré que la séroconversion chez le patient R- n'était pas prédictive du risque de maladie après trois mois de prophylaxie malgré l'observation d'une séroconversion IgG dans 26.9% des cas à 3 mois, 63.4% à 6 mois et 75.3% à 12 mois⁷⁰.

3. Surveillance de la réponse T spécifique

L'essentiel des études de la réponse immune anti-CMV est basée sur l'utilisation de tests *in vitro*, dont l'objectif est de caractériser les cellules T spécifiques du virus.

L'idée générale est de stimuler *ex vivo* les LTCD8+ et CD4+ spécifiques à partir des cellules mononucléées du sang ou directement à partir du sang total des patients, avec des antigènes viraux (lysate de fibroblastes infectés autologues, peptides, mitogènes, particules virales, cellules dendritiques autologues) puis de mesurer l'intensité de la réponse immune spécifique du CMV :

- par cytométrie en flux : marquage intra-cellulaire d'IFN γ , tétramère spécifique d'un peptide viral couplé à un fluorochrome.
- par ELISA : quantification de production d'IFN γ (QUANTIFERON CMV) ou d'un profil cytokinique.
- par ELISPOT : méthode apparentée à l'ELISA capturant la production, par cellule, d'une cytokine (IFN γ).

La Figure 2 illustre les techniques utilisées dans ces différents tests.

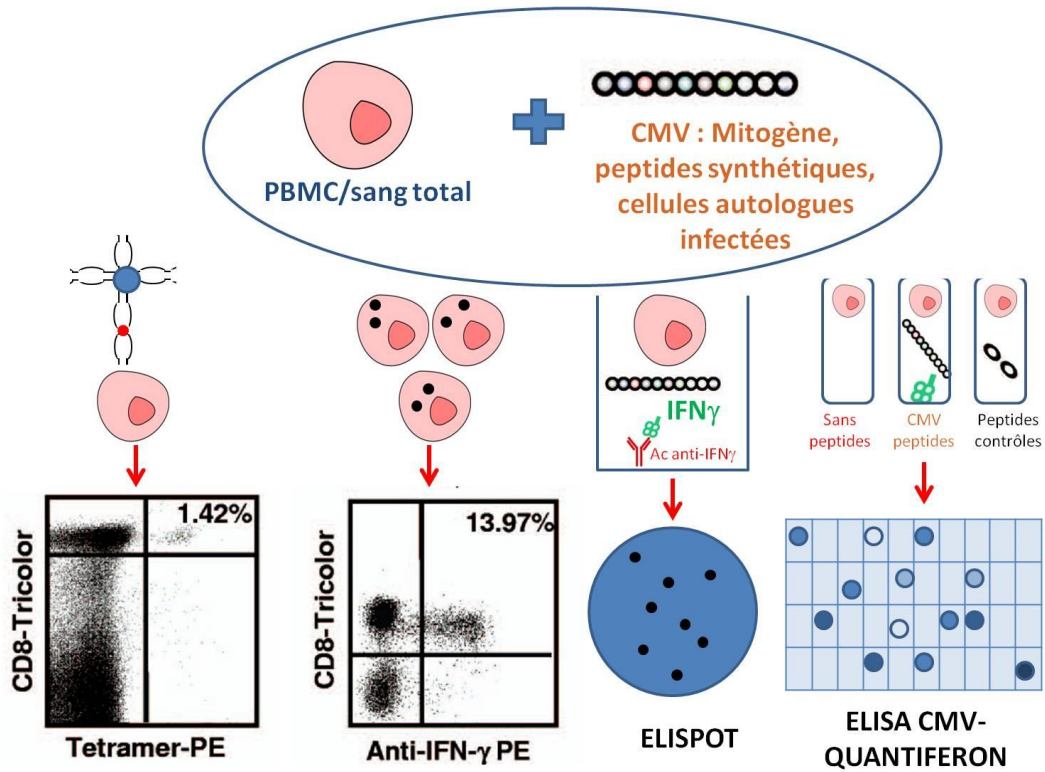


Figure 2 : Schéma récapitulatif des différentes techniques de mesure de la réponse spécifique CD4+ et CD8+.

Nous avons synthétisé dans le Tableau 3 les détails techniques de chaque test avec ses avantages et ses limites. On constate une bonne faisabilité des tests, l'ELISPOT nécessitant un lecteur spécifique. L'inconvénient principal et commun à l'ensemble des tests reste l'absence de seuil validé pour leur utilisation en pratique clinique. Le QUANTIFERON-CMV présente un seuil mais certaines études utilisent 0.1UI/mL⁷² et d'autres 0.2UI/mL⁷³. Ce seuil n'est d'ailleurs pas validé sur des grands effectifs de patients immunodéprimés potentiellement lymphopéniques, situation où sa fiabilité est prise en défaut.

Tableau 3. Avantages et limites des tests mesurant la réponse CD4+ et CD8+ spécifique du CMV.

TESTS	AVANTAGES	LIMITES
ICS	Rapidité : Lecture en cytométrie en flux Sang total ou PBMC Informations sur les CD4+ et les CD8+	Pas de seuil validé
TETRAMERES	Rapidité (1 à 2h) Lecture en cytométrie en flux Sang total ou PBMC	Pas d'aspect qualitatif Prédictif uniquement en association avec un phénotypage ou un test fonctionnel Restreint aux haplotypes HLA fréquents Mesure uniquement la réponse CD8+ (tétramères de classe I) Pas de seuil validé
ELISPOT	Réponse quantitative et qualitative Sensibilité supérieure au QUANTIFERON-CMV si lymphopénie Réponse CD4+ et CD8+	Extraction de PBMC sur grand volume de sang Ne différencie pas CD8+ et CD4+ Lecteur ELISPOT Technique en cours d'optimisation (particules virales vs. pool de peptides)
QUANTIFERON-CMV	Faible quantité de sang nécessaire Sang total Faisabilité Seuil validé Norme CEE	Sensible à la lymphopénie Mesure les CD8+ uniquement Quelques faux négatifs (peptides CMV ne couvrant pas tous les HLA)

ICS: intracellular cytokine staining, PBMC: peripheral blood mononuclear cells

L'intérêt en pratique clinique de ces tests immunologiques disponibles pour évaluer la réponse T a fait l'objet d'études. Le Tableau 4 résume les résultats principaux de ces études réalisées à différents temps par rapport à la greffe, ou à la survenue de l'infection.

Tableau 4. Résultats des principales études d'immunosurveillance de l'infection à CMV en transplantation d'organes solides.

TEST	POPULATION	RESULTAT PRINCIPAL DU TEST	SEUIL	REFERENCES
A J0 DE GREFFE				
ICS	27R+ et 6D+R-KTR	corrélation avec l'absence de virémie	non	Radha ⁴⁴
	48 R+ KTR	prédiction de l'absence de virémie	>0,03% CD4+ pp65	Egli ⁵¹
	76 R+ KTR vs. 42 sujets sains	corrélation avec la sérologie	non	Sester ⁵²
	33 KTR vs 17 sujets sains	corrélation avec la sérologie	non	Radha ⁴⁴
TETRAMERES	25 R+ KTR	non prédictif seul, associé à l'ELISPOT: corrélation avec l'absence de virémie	non	Mattes ⁷⁴
ELISPOT	10 R+ HTR	corrélation avec l'absence de maladie	non	Abate ⁷⁵
	37R+ et 21 D+R-KTR	prédiction de l'absence de virémie: VPP 89,5% pour les D+R- et 95,7% pour les R+	7-8 spots 3 10 ⁵ PBMC	Bestard ⁷⁶
QUANTIFERON-CMV	11D+ R- et 44R+ KTR et LTR	prédiction de l'absence de virémie VPP 83,7% (test positif uniquement chez les R+)	0,2UI/ml	Cantisani ⁷⁷
	39 R+ et 17 D+R-LTR	corrélation avec l'absence de virémie	non	Weselsindtner ⁷⁸
	12R+ et 2D+R-KTR	corrélation avec l'absence de virémie	non	Lochmanova ⁷⁹
	25 KTR vs 37 sujets sains	corrélation avec la sérologie à 97%	0,2UI/ml	Walker ⁸⁰
EN FIN DE PROPHYLAXIE				
ICS	44 KTR (D+R- et R+)	pas de corrélation avec la virémie	non	Eid ⁸¹
ELISPOT	48 R+ HTR	corrélation avec l'absence de maladie	non	Abate ⁷⁵
QUANTIFERON	124 D+R- KTR	prédiction de l'absence d'infection VPP 90% (VPN 27%)	0,2UI/ml	Manuel ⁷³
	35 D+R- et 73 R+ KTR	prédiction de l'absence d'infection VPP 95% sur 38 patients positifs, possible faux négatifs)	0,1UI/ml	Kumar ⁷²
TEST REPETE DANS LE TEMPS DEPUIS LA TRANSPLANTATION				
ICS	17 R + KTR	Corrélation baisse de la réponse CD4+ et maladie	<0.25%	Sester ⁵²
	17 R+ KTR	corrélation diminution du % CMV-pp65 CD4+ à 2 mois et niveau de virémie	non	Sund ⁵³
	17 D+R- Liver transplant	pas de prédiction de virémie	non	La Rosa ⁸²
ELISPOT	20 R+ LTR	corrélation inverse avec le seuil de virémie	non	Costa ⁸³
	10R+ greffe multi-organe	corrélation reconstitution <1 mois postTx avec absence de virémie et taux de virémie	non	Chiereghin ⁸⁴
	10 R+ transplantation pédiatrique	diminution lors de l'infection et reconstitution lors de la guérison	non	Patel ⁸⁵
QUANTIFERON	24 R+	non prédictif de virémie	non	Westall ⁸⁶
	8 D+R- LTR	en cas de virémie, prédit la clairance spontanée à 92%	>0,2UI/ml	Lisboa ⁸⁷
	37 R+		>0,4% IE CD8+	Bunde ⁸⁸
	27 R+ HTR et LTR	prédiction de l'absence d'infection		
	22 D+R- LTR	ne prédit pas la rechute après une première infection	non	Pipelng ⁸⁹

KTR: kidney transplant recipient, LTR: lung transplant recipient, HTR: heart transplant recipient, ICS: intracellular cytokine staining, PBMC: peripheral blood mononuclear cells, VPP: valeur predictive positive, VPN: valeur predictive negative

4. Commentaires sur les études réalisées

L'un des problèmes actuels est la détermination du seuil à utiliser pour chacun des tests afin d'améliorer cette prédiction. Seul le QUANTIFERON-CMV propose un seuil de prédiction de 0.1UI/ml⁷² ou 0.2IU/ml⁷³ avec des limites liées aux faibles effectifs de patients et aux faiblesses méthodologiques des études disponibles. Ainsi, il n'existe pas d'étude randomisée, contrôlée, comparant une stratégie avec et sans surveillance immunologique, qui utiliserait des critères principaux de jugement incontestables tels que la maladie à CMV ou la survie du patient ou du greffon.

Par ailleurs, il existe des résultats discordants entre les études dans la capacité des tests à prédire la maladie ou l'infection (probablement en raison de techniques de stimulation différentes). Ainsi, certaines études montrent que la présence d'une réponse T basée sur le dosage d'IFN γ intracellulaire dans les LTCD4+ et CD8+ n'empêche pas la survenue de maladie à CMV chez les D+R-⁸². Ceci confirme la nécessité de comparer les différentes techniques au sein d'un même test et entre les différents tests.

Il est important de souligner que certaines études permettent tout de même :

- A J0 chez les R+ qui ont déjà une réponse cellulaire et humorale, d'améliorer la stratification du risque de maladie par rapport à la sérologie seule et de guider la stratégie thérapeutique.
- En cas de virémie, de prédire la clairance spontanée, là aussi uniquement chez les R+ pour surveiller sans traiter.

Dans leur ensemble, les tests actuels analysent surtout l'état de la reconstitution immunitaire ou la réponse immune déjà formée à un temps donné. Certaines études commencent toutefois à analyser la réponse dynamique pendant l'infection sans proposer de seuil de réponse qui serait utilisable en clinique. Cette approche est cependant intéressante et probablement plus proche de la complexité de la réalité car elle prend en compte les interactions dynamiques qui existent entre l'infection virale, la réponse immune et l'état d'immunodépression. Un tel seuil pourrait permettre de prédire une guérison soutenue après le traitement d'une infection à CMV chez les R+. Très peu de données utilisables en clinique sont disponibles chez les patients naïfs R- ayant reçu un greffon d'un donneur séropositif.

Enfin, la survenue d'une souche virale mutée pose des problèmes de précocité de diagnostic car les recommandations actuelles ne définissent pas de moment formel dans l'histoire d'une maladie à CMV pour la rechercher. Pourtant sa prise en charge n'est pas à négliger car la mortalité associée au CMV en est augmentée : 19 à 22% de mortalité chez les patients présentant une infection à CMV avec souche virale mutée lié à l'augmentation des récurrences à l'arrêt du traitement, aux infections à taux de virémies élevés⁹⁰. Certaines études commencent à mettre en lumière le rôle d'une réponse immunologique tardive dans la survenue de résistance^{51,91} mais là encore, les preuves sont faibles et l'étude de la réponse immunologique pour valider un outil aidant au diagnostic d'émergence d'une souche virale mutée pourrait trouver une place dans la prise en charge de cette complication sérieuse. En résumé, les tests immunologiques actuellement disponibles ne sont pas recommandés pour prédire le risque de virémie et de maladie car le niveau de preuve reste faible. Le QUANTIFERON-CMV est le test le plus avancé, il a obtenu la licence européenne d'utilisation et semble prédictif de la survenue de la maladie.

5. Perspectives

La réponse CD4⁺ et CD8⁺ spécifique avec analyse de plusieurs cytokines (IFN γ et IL2, dite polyfonctionnelle) est pour l'instant à l'état de recherche avec peu d'études prédisant l'absence d'infection en présence d'un test positif. Un seuil de 0.1% de LTCD4+IL2⁺ dans les 20 jours post transplantation donne une valeur prédictive positive à 92% de ne pas faire de réplication virale, un seuil de 0.4% de CD8+IFN γ ⁺ une valeur prédictive positive à 100%, chez 29 patients greffés hépatiques⁹².

Certains auteurs ont recherché l'existence d'une signature phénotypique lymphocytaire caractéristique du CMV. Les LTCD4⁺ CD28-CD27⁻ et les LTCD8⁺ CD45RA⁺ CD27⁻ (TEMRA pour T effecteur mémoire RA⁺, faible capacité de prolifération mais fort pouvoir cytotoxique) sont connus pour être associés au CMV⁹³.

L'expression du récepteur PD-1 (Programmed Cell Death 1) sur les CD4⁺ spécifique du CMV a été associée à la survenue de virémie post-transplantation. En effet, cette protéine en se fixant à ses récepteurs PDL1 ou PDL2 entraîne un signal inhibiteur lymphocytaire⁹⁴. De plus, sa surexpression fait

partie des mécanismes conduisant à l'épuisement clonal et à l'échappement viral dans les infections virales chroniques⁹⁵. Récemment, il a été montré qu'une augmentation de l'expression de PD-1 sur les CD4+CD27-CD28- était corrélée à une primo-infection et à une réactivation virale⁹⁶. De même, au cours de l'infection à CMV symptomatique tous les patients expriment PD-1 sur leurs cellules T CD8+ spécifique du CMV⁹⁷. Enfin, aucune étude à ce jour n'a testé si les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4+ CD28- CD27-, les lymphocytes T CD8+ CD45RA+CD27- ou les lymphocytes $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} avaient la capacité de prédire correctement la survenue ultérieure d'une infection ou d'une maladie à CMV.

6. Notre étude et place des lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} dans l'immuno-surveillance de l'infection à CMV chez les transplantés rénaux

Les LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} ont une place importante dans la réponse immune spécifique anti-CMV, mis en évidence en transplantation rénale, notamment par notre groupe. Nous avons en effet montré que le nombre, l'oligoclonalité et le pouvoir cytotoxique sur des fibroblastes infectés par le CMV des LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} à la greffe ou chez des sujets sains étaient corrélés à la sérologie⁵⁶. De plus, il s'agit surtout de LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} de phénotype TEMRA (lymphocytes T effecteurs mémoires, faible capacité de prolifération mais fort pouvoir cytotoxique) majoritaires chez les patients R+ et subissant une expansion chez les D+R- après infection à CMV. Une étude plus récente a montré que ce phénotype TEMRA à J0 ou J15 de greffe rénale était un marqueur très fiable pour prédire l'absence d'infection/maladie à CMV dans une petite cohorte de 23 patients R+. (Couzi et al, in prep).

Notre étude est basée sur l'immuno-surveillance des LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} réalisée depuis 2003 en routine à intervalles réguliers chez les transplantés rénaux. Elle a porté sur la capacité des LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} totaux à prédire la guérison de l'infection chez 104 R+ et chez 167 D+R-. Il s'agissait donc d'une approche longitudinale, sur plusieurs années après la greffe et l'infection à CMV, permettant de caractériser un seuil d'expansion des LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} correspondant à la dynamique d'une réponse immune T $\gamma\delta$ soutenue prédictive de la résolution de l'infection.

Nous nous sommes également intéressés à la description de la réponse T $\gamma\delta$ lors de l'émergence d'une souche virale mutée. Nous avons montré que le retard d'expansion des LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} était prédictif

d'une souche virale mutée. De plus, le retard de guérison après une expansion était également prédictif de l'émergence d'une mutation.

Ces différents résultats mettent en lumière que les LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg}, acteurs spécifiques de la réponse immune anti-CMV dans un contexte d'immunodépression permettent une immuno-surveillance utile de l'infection à CMV. Ce nouvel outil peut être utilisé à différents temps : au moment de la greffe pour identifier les patients chez lesquels un traitement ne sera pas nécessaire ; après une infection, pour prédire la guérison, adapter la suite de prise en charge, ou guider la recherche d'une souche virale mutée.

IV. Références

1. Tonelli, M., *et al.* Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **11**, 2093-2109 (2011).
2. Halloran, P.F. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *The New England journal of medicine* **351**, 2715-2729 (2004).
3. Fishman, J.A. Infection in solid-organ transplant recipients. *The New England journal of medicine* **357**, 2601-2614 (2007).
4. Weclawiak, H., *et al.* [Cytomegalovirus effects in solid organ transplantation and the role of antiviral prophylaxis]. *Nephrol Ther* **6**, 505-512 (2010).
5. Crough, T. & Khanna, R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical microbiology reviews* **22**, 76-98, Table of Contents (2009).
6. Andrewes, C.H. Tissue-culture in the study of immunity to herpes. *The Journal of Pathology and Bacteriology* **33**, 301-312 (1930).
7. Hanshaw, J.B. & Weller, T.H. Urinary excretion of cytomegaloviruses by children with generalized neoplastic disease. Correlation with clinical and histopathologic observations. *The Journal of pediatrics* **58**, 305-311 (1961).
8. Weller, T.H., Hanshaw, J.B. & Scott, D.E. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* **12**, 130-132 (1960).
9. MC, M. infections à cytomégaloVirus. *elsevier masson* (2009).
10. Wang, X., Huang, S.M., Chiu, M.L., Raab-Traub, N. & Huang, E.S. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**, 456-461 (2003).
11. Wang, X., Huang, D.Y., Huang, S.M. & Huang, E.S. Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nature medicine* **11**, 515-521 (2005).
12. Halary, F., *et al.* Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* **17**, 653-664 (2002).
13. Ryckman, B.J., *et al.* Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *Journal of virology* **82**, 60-70 (2008).
14. Wussow, F., *et al.* A Vaccine Based on the Rhesus Cytomegalovirus UL128 Complex Induces Broadly Neutralizing Antibodies in Rhesus Macaques. *Journal of virology* **87**, 1322-1332 (2013).
15. Kudchodkar, S.B., Yu, Y., Maguire, T.G. & Alwine, J.C. Human cytomegalovirus infection induces rapamycin-insensitive phosphorylation of downstream effectors of mTOR kinase. *Journal of virology* **78**, 11030-11039 (2004).
16. Kudchodkar, S.B., Del Prete, G.Q., Maguire, T.G. & Alwine, J.C. AMPK-mediated inhibition of mTOR kinase is circumvented during immediate-early times of human cytomegalovirus infection. *Journal of virology* **81**, 3649-3651 (2007).
17. Ozaki, K.S., *et al.* The use of sirolimus in ganciclovir-resistant cytomegalovirus infections in renal transplant recipients. *Clinical transplantation* **21**, 675-680 (2007).
18. Ekberg, H., *et al.* Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *The New England journal of medicine* **357**, 2562-2575 (2007).

19. Vigano, M., *et al.* Lower incidence of cytomegalovirus infection with everolimus versus mycophenolate mofetil in de novo cardiac transplant recipients: a randomized, multicenter study. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* **12**, 23-30 (2010).
20. Tedesco Silva, H., Jr., *et al.* Everolimus plus reduced-exposure CsA versus mycophenolic acid plus standard-exposure CsA in renal-transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **10**, 1401-1413 (2010).
21. Brennan, D.C., *et al.* Cytomegalovirus incidence between everolimus versus mycophenolate in de novo renal transplants: pooled analysis of three clinical trials. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **11**, 2453-2462 (2011).
22. Nashan, B., *et al.* Review of cytomegalovirus infection findings with mammalian target of rapamycin inhibitor-based immunosuppressive therapy in de novo renal transplant recipients. *Transplantation* **93**, 1075-1085 (2012).
23. Boehme, K.W. & Compton, T. Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *Journal of virology* **78**, 7867-7873 (2004).
24. Compton, T., *et al.* Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *Journal of virology* **77**, 4588-4596 (2003).
25. Delale, T., *et al.* MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN-alpha release and initiation of immune responses in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **175**, 6723-6732 (2005).
26. Hokeness-Antonelli, K.L., Crane, M.J., Dragoi, A.M., Chu, W.M. & Salazar-Mather, T.P. IFN-alpha-mediated inflammatory responses and antiviral defense in liver is TLR9-independent but MyD88-dependent during murine cytomegalovirus infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **179**, 6176-6183 (2007).
27. Tabeta, K., *et al.* Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3516-3521 (2004).
28. Boehme, K.W., Guerrero, M. & Compton, T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **177**, 7094-7102 (2006).
29. Juckem, L.K., Boehme, K.W., Feire, A.L. & Compton, T. Differential initiation of innate immune responses induced by human cytomegalovirus entry into fibroblast cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**, 4965-4977 (2008).
30. Foley, B., *et al.* Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood* **119**, 2665-2674 (2012).
31. Beziat, V., *et al.* NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* **121**, 2678-2688 (2013).
32. Venema, H., *et al.* Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *Journal of medical virology* **42**, 188-192 (1994).
33. Biron, C.A., Byron, K.S. & Sullivan, J.L. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *The New England journal of medicine* **320**, 1731-1735 (1989).
34. Quinnan, G.V., Jr., *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* **307**, 7-13 (1982).
35. Palmer, J.M., Rajasekaran, K., Thakar, M.S. & Malarkannan, S. Clinical relevance of natural killer cells following hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Cancer* **4**, 25-35 (2013).
36. Genini, E., *et al.* Serum antibody response to the gH/gL/pUL128-131 five-protein complex of human cytomegalovirus (HCMV) in primary and reactivated HCMV infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **52**, 113-118 (2011).
37. Britt, W.J., Vugler, L., Butfiloski, E.J. & Stephens, E.B. Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *Journal of virology* **64**, 1079-1085 (1990).
38. Couzi, L., *et al.* Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human gammadelta T cells expressing CD16 (FcgammaRIIIa). *Blood* **119**, 1418-1427 (2012).
39. Mutter, W., Reddehase, M.J., Busch, F.W., Buhring, H.J. & Koszinowski, U.H. Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *The Journal of experimental medicine* **167**, 1645-1658 (1988).

40. Reddehase, M.J., *et al.* Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *Journal of virology* **55**, 264-273 (1985).
41. Sylwester, A.W., *et al.* Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *The Journal of experimental medicine* **202**, 673-685 (2005).
42. Riddell, S.R., *et al.* Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science (New York, N.Y.)* **257**, 238-241 (1992).
43. Walter, E.A., *et al.* 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 (1995).
44. Radha, R., *et al.* Cellular immune responses to cytomegalovirus in renal transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **5**, 110-117 (2005).
45. Reusser, P., Cathomas, G., Attenhofer, R., Tamm, M. & Thiel, G. Cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immunity after renal transplantation mediates protection from CMV disease by limiting the systemic virus load. *The Journal of infectious diseases* **180**, 247-253 (1999).
46. Sester, M., *et al.* Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **13**, 2577-2584 (2002).
47. Polic, B., *et al.* Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *The Journal of experimental medicine* **188**, 1047-1054 (1998).
48. Jonjic, S., Pavic, I., Lucin, P., Rukavina, D. & Koszinowski, U.H. Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *Journal of virology* **64**, 5457-5464 (1990).
49. Hebart, H., *et al.* 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 (2002).
50. Reusser, P., Riddell, S.R., Meyers, J.D. & Greenberg, P.D. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* **78**, 1373-1380 (1991).
51. Egli, A., *et al.* Cytomegalovirus-specific T-cell responses and viral replication in kidney transplant recipients. *Journal of translational medicine* **6**, 29 (2008).
52. Sester, M., *et al.* Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* **71**, 1287-1294 (2001).
53. Sund, F., *et al.* CMV-specific T-cell immunity, viral load, and clinical outcome in seropositive renal transplant recipients: a pilot study. *Clinical transplantation* **24**, 401-409 (2010).
54. Dechanet, J., *et al.* Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *The Journal of infectious diseases* **179**, 1-8 (1999).
55. Dechanet, J., *et al.* Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *The Journal of clinical investigation* **103**, 1437-1449 (1999).
56. Pitard, V., *et al.* Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood* **112**, 1317-1324 (2008).
57. Spada, F.M., *et al.* Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *The Journal of experimental medicine* **191**, 937-948 (2000).
58. Willcox, C.R., *et al.* Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nature immunology* **13**, 872-879 (2012).
59. Couzi, L., *et al.* Common features of gammadelta T cells and CD8(+) alphabeta T cells responding to human cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *The Journal of infectious diseases* **200**, 1415-1424 (2009).
60. Kotton, C.N., *et al.* Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* **96**, 333-360 (2013).
61. Humar, A., *et al.* The efficacy and safety of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **10**, 1228-1237 (2010).
62. Khoury, J.A., *et al.* Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **6**, 2134-2143 (2006).

63. Kliem, V., *et al.* Improvement in long-term renal graft survival due to CMV prophylaxis with oral ganciclovir: results of a randomized clinical trial. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **8**, 975-983 (2008).
64. Reischig, T., *et al.* Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **8**, 69-77 (2008).
65. van der Beek, M.T., *et al.* Preemptive versus sequential prophylactic-preemptive treatment regimens for cytomegalovirus in renal transplantation: comparison of treatment failure and antiviral resistance. *Transplantation* **89**, 320-326 (2010).
66. Atabani, S.F., *et al.* Cytomegalovirus replication kinetics in solid organ transplant recipients managed by preemptive therapy. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **12**, 2457-2464 (2012).
67. Couzi, L., *et al.* High incidence of anticytomegalovirus drug resistance among D+R- kidney transplant recipients receiving preemptive therapy. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **12**, 202-209 (2012).
68. Witzke, O., *et al.* Valganciclovir prophylaxis versus preemptive therapy in cytomegalovirus-positive renal allograft recipients: 1-year results of a randomized clinical trial. *Transplantation* **93**, 61-68 (2012).
69. Reischig, T., *et al.* Long-term outcomes of pre-emptive valganciclovir compared with valacyclovir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus in renal transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **23**, 1588-1597 (2012).
70. Stern, M., *et al.* The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **8**, 1312-1317 (2008).
71. Munoz-Cobo, B., *et al.* An evaluation of the role of NKG2C natural killer cells in protection from cytomegalovirus DNAemia early following allogeneic stem cell transplantation. *Journal of medical virology* (2013).
72. Kumar, D., *et al.* Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **9**, 1214-1222 (2009).
73. Manuel, O., *et al.* Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **56**, 817-824 (2013).
74. Mattes, F.M., *et al.* Functional impairment of cytomegalovirus specific CD8 T cells predicts high-level replication after renal transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **8**, 990-999 (2008).
75. Abate, D., *et al.* Human cytomegalovirus-specific T-cell immune reconstitution in preemptively treated heart transplant recipients identifies subjects at critical risk for infection. *Journal of clinical microbiology* **50**, 1974-1980 (2012).
76. Bestard, O., *et al.* Pretransplant immediately early-1-specific T cell responses provide protection for CMV infection after kidney transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **13**, 1793-1805 (2013).
77. Cantisan, S., *et al.* Pretransplant interferon-gamma secretion by CMV-specific CD8+ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **13**, 738-745 (2013).
78. Weseslindtner, L., *et al.* Prospective analysis of human cytomegalovirus DNAemia and specific CD8+ T cell responses in lung transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **12**, 2172-2180 (2012).
79. Lochmanova, A., *et al.* Quantiferon-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplantation proceedings* **42**, 3574-3577 (2010).

80. Walker, S., *et al.* Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* **9**, 165-170 (2007).
81. Eid, A.J., *et al.* A prospective longitudinal analysis of cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ and CD8+ T cells in kidney allograft recipients at risk of CMV infection. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* **23**, 506-513 (2010).
82. La Rosa, C., Limaye, A.P., Krishnan, A., Longmate, J. & Diamond, D.J. Longitudinal assessment of cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses in liver transplant recipients at high risk for late CMV disease. *The Journal of infectious diseases* **195**, 633-644 (2007).
83. Costa, C., *et al.* Evaluation and significance of cytomegalovirus-specific cellular immune response in lung transplant recipients. *Transplantation proceedings* **43**, 1159-1161 (2011).
84. Chiereghin, A., *et al.* Monitoring cytomegalovirus T-cell immunity in small bowel/multivisceral transplant recipients. *Transplantation proceedings* **42**, 69-73 (2010).
85. Patel, M., *et al.* Dynamics of cell-mediated immune responses to cytomegalovirus in pediatric transplantation recipients. *Pediatric transplantation* **16**, 18-28 (2012).
86. Westall, G.P., Mifsud, N.A. & Kotsimbos, T. Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8+ T-cell immunity. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **8**, 1749-1754 (2008).
87. Lisboa, L.F., Kumar, D., Wilson, L.E. & Humar, A. Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation* **93**, 195-200 (2012).
88. Bunde, T., *et al.* Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *The Journal of experimental medicine* **201**, 1031-1036 (2005).
89. Pipeling, M.R., John, E.R., Orens, J.B., Lechtzin, N. & McDyer, J.F. Primary cytomegalovirus phosphoprotein 65-specific CD8+ T-cell responses and T-bet levels predict immune control during early chronic infection in lung transplant recipients. *The Journal of infectious diseases* **204**, 1663-1671 (2011).
90. Le Page, A.K., *et al.* Clinical aspects of cytomegalovirus antiviral resistance in solid organ transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **56**, 1018-1029 (2013).
91. Emery, V.C. & Griffiths, P.D. Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8039-8044 (2000).
92. Nebbia, G., *et al.* Polyfunctional cytomegalovirus-specific CD4+ and pp65 CD8+ T cells protect against high-level replication after liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **8**, 2590-2599 (2008).
93. Kuijpers, T.W., *et al.* Frequencies of circulating cytolytic, CD45RA+CD27-, CD8+ T lymphocytes depend on infection with CMV. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **170**, 4342-4348 (2003).
94. Zhang, X., *et al.* Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity* **20**, 337-347 (2004).
95. Benedict, C.A., Loewendorf, A., Garcia, Z., Blazar, B.R. & Janssen, E.M. Dendritic cell programming by cytomegalovirus stunts naive T cell responses via the PD-L1/PD-1 pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**, 4836-4847 (2008).
96. Dirks, J., *et al.* PD-1 analysis on CD28(-) CD27(-) CD4 T cells allows stimulation-independent assessment of CMV viremic episodes in transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **13**, 3132-3141 (2013).
97. La Rosa, C., *et al.* Programmed death-1 expression in liver transplant recipients as a prognostic indicator of cytomegalovirus disease. *The Journal of infectious diseases* **197**, 25-33 (2008).

- **Article produit au cours de la thèse :**

L'expansion des lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} peut prédire la résolution de l'infection à CMV et l'émergence d'une souche virale mutée chez les transplantés rénaux

Résumé :

Introduction

Le cytomégalovirus (CMV) en transplantation d'organe solide est associé à une morbidité et une mortalité accrue, en particulier dans le cas de l'émergence d'une souche mutée avec résistance aux traitements anti-viraux. Les études sur l'immunosurveillance devraient fournir des informations cliniques pertinentes sur l'utilité d'étudier la réponse cellulaire T spécifique du CMV. Depuis de nombreuses années, nous avons montré que les lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} sont impliqués dans le contrôle de l'infection à CMV. Le but de cette étude était d'évaluer si la cinétique des lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} pouvait prédire la résolution de l'infection à CMV chez les patients à haut risque : D+ R- et R+ avec thymoglobuline (R+/ATG), ou l'émergence d'une souche mutée.

Méthodes

La cinétique des lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} a été décrite chez des patients D+ R- et R+ /ATG, receveurs d'une greffe rénale entre 2003 et 2011. Cette cinétique a été comparée entre les patients infectés et non infectés et entre les patients avec et sans mutation. L'expansion des lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} a été estimée par un modèle linéaire mixte, le temps d'expansion a été défini comme étant la date de survenue de cette expansion depuis le début de l'infection.

Résultats

167 patients D+R- (93 avec infection et 74 sans infection) et 104 patients R+/ATG (74 avec infection et 30 sans infection) ont été inclus. L'expansion des lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} après une infection à CMV était comparable chez les patients D+ R- et R+/ATG. Le temps d'expansion des LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} était fortement corrélé avec la durée de virémie et la résolution de l'infection ($r = 0,91$; $p < 0,0001$). Près de 90 % des patients ont eu une réponse virale soutenue avec virémies négatives dans les 30 jours suivant l'expansion. Le retard d'expansion des LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} était étroitement associé à la présence d'une souche mutée ($p < 0,0007$). Cette mutation était prédite par la persistance d'une virémie positive 39 jours après l'expansion des LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} T (AUC=0,77).

Conclusion

Chez les patients à haut risque, l'expansion des LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} est lié à la résolution de l'infection à CMV. A l'inverse, le retard de l'expansion et la persistance d'une virémie positive après expansion sont prédictifs de la survenue d'une souche mutée. L'immunosurveillance des LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} pourrait être utile lors de l'infection à CMV afin de prédire la résolution de l'infection et l'apparition d'une souche virale mutée.

Dynamics of $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells can predict the resolution of CMV infection and the emergence of a mutant viral strain in kidney transplant recipients

Abstract

Purpose

Cytomegalovirus (CMV) infection in solid organ transplantation is associated with increased morbidity and mortality, particularly in the case of the emergence of a CMV mutant strain with anti-viral drug resistance. In this situation, immune monitoring assays should provide relevant clinical information on efficient CMV-specific T cells response. For many years, we have shown that $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells are involved in the control of CMV infection. The purpose of this study was to assess if $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells kinetics can predict the resolution of CMV infection in high risk patients: D+R- and R+ with anti-thymocyte globulin (R+/ATG), or the emergence of a mutant strain.

Methods

$V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells kinetics has been described in D+R- or R+/ATG kidney transplant recipients between 2003 and 2011. This kinetics was compared between infected and non infected patients and between patients with and without mutation. $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion was estimated by a linear mixed model, the time of expansion was defined as the date of occurrence of this expansion from the beginning of infection.

Results

167 patients D+R- (93 infected and 74 non-infected) and 104 R+/ATG (74 infected and 30 non-infected) patients were included. The $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion following CMV infection was comparable in D+R- and R+/ATG patients. Time of $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion was highly correlated with the duration of DNAemia and the resolution of infection ($r=0.91$, $p < 0.0001$). Almost 90% of patients had a sustained viral response with negative DNAemias within 30 days of expansion. The delay in $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion was closely associated with the presence of a mutant strain ($p < 0.0007$). This mutation was predicted by persistent DNAemias after 39 days of $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion (AUC= 0.77).

Conclusion

In high risk patients, the rate of expansion of $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells is related to the resolution of CMV infection. Conversely, the delay of expansion and the persistence of DNAemias after expansion are predictive of the occurrence of a mutant strain. Monitoring $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells could be useful during CMV infection in order to predict the resolution of the infection and the emergence of a mutant viral strain.

Introduction

Optimal management of CMV infection remains a challenge in solid organ transplantation and consequences of CMV disease/DNAemia may translate in deleterious direct and/or indirect effects. Today, this management is based on the prevention of CMV disease with antiviral drugs until the acquisition by the host of an efficient CMV-specific immune response. The interplay between CMV and the immunocompromised host's immune system is complex, involving both innate and adaptive immunity¹. Innate components of the immune response, either soluble such as inflammatory cytokines, or cellular, such as NK cells, play a critical role in the control of CMV infection since (i) they function as a first-line defence prior the establishment of the adaptive cellular immune response (ii) they are considered to display resistance to post-transplant immunosuppressive medication, whereas the adaptive counterpart may be durably affected several months post-transplantation². Among these innate mediators, we evidenced several years ago a distinct subset of $\gamma\delta$ T cells characterised by the expression of V δ 1, V δ 3 as well as V δ 5 chains, while the most common subset in the peripheral blood of normal individuals expressing the association between δ 2 and γ 9 variable regions V γ 9/V δ 2 T cells never expanded. Following CMV infection, these so-called V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells undergo massive expansion in the blood of kidney transplant recipients³ and this cellular amplification occurs concurrently with the resolution of CMV infection, suggesting a protective role for $\gamma\delta$ T cells in the control of CMV infection⁴. Consequently, V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells are part of the cell-mediated immunity (CMI) against CMV and their monitoring may help guide clinical decision-making. During the last decade, a variety of assays have been developed to measure CMV-specific cellular responses. Most of these assays are based on the detection of IFN- γ after stimulation of peripheral blood mononuclear cells or whole blood with CMV specific antigens, either by testing the release of IFN- γ by CD8+ cells (QuantiFERON-CMV assay)⁵, or by enumerating the number of IFN- γ -secreting cells (ELISPOT)⁶, or by the analysis of intra-cellular cytokine using flow cytometry⁷. Alternatively, CMV-specific T cells may be directly identified using peptide-conjugated MHC class I tetramers, providing that the patients' HLA type is known⁸. It is probably in the highest risk groups of patients for CMV disease, donor

seropositive, recipient seronegative (D+R-) and anti-thymocyte globulins (ATG)-treated R+ patients, for whom new immune markers would be of great clinical utility. For instance, it has been shown that 16.1 % of D+R- patients developed CMV disease following 200 days of valganciclovir prevention, and 36.8 % following 100 days⁹. In this setting, an appropriate immune assay would allow to predict this late-onset disease and tailor therapeutic decision. On the other hand, immune monitoring could help to predict recurrent DNAemia or disease following a course of treatment. Finally, chronic CMV DNAemia in the presence of prolonged antiviral therapy is at high risk of anti-viral drug resistance, an event that mainly occurs in D+R- patients and can lead to serious clinical complications¹⁰. The identification of a peculiar immune parameter in front of this chronic CMV replication would be of interest to alert clinicians on the risk of onset of anti-viral drug resistance. During the last ten years, several studies have addressed some of these questions, mostly in R+ patients and a few of them in the D+R- group of solid-organ transplant patients. These studies used different assays such as IFN γ ELISPOT assay¹¹, intracellular cytokines detected by flow cytometry¹²⁻¹⁵ or QuantiFERON-CMV assay¹⁶⁻¹⁹. Their results are sometimes conflicting and limited by a small number of patients, 35¹⁷ for one of them. A recent one analyzed 124 D+R- patient but with a poor negative predictive value of 27%²⁰. Moreover, most of these studies do not take into account the dynamics of the immune response interplaying with the evolution of the viral load, but focus on the identification at a given time of a threshold of cell-mediated immunity able to predict CMV DNAemia or disease^{12,17,18,20}. Since measurement of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells in peripheral blood is simple to perform, inexpensive, and highly reproducible, we had the opportunity to repeat this assay several times, during both the pre-transplant and the post-transplant period, and during this last period, both before and after the onset of CMV infection, along the monitoring of viral load. In this retrospective study, we wondered whether the response of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells, analyzed as a time-dependent variable, may help to capture the dynamic interplay between virus and host, and optimize the management of infection in high risk patients: D+R- kidney transplant recipients and ATG-treated R+ patients (R+/ATG).

Patients and Methods

Study design and patients

We retrospectively included 272 kidney transplant recipients between January 1, 2003 and December 31, 2011 for whom clinical, virological and immunological data were available.

During this period, different strategies of CMV treatment were used in the department. In a first period, from January 1, 2003 to November 30, 2006, 48 D+R- and 23 R+/ATG patients received universal prophylaxis for 3 months (valganciclovir 900 mg daily). In a second period, from December 1, 2006 to June 30, 2010, 80 D+R- and 72 R+/ATG patients were preemptively followed and treated when the whole-blood quantitative CMV real-time PCR (WB CMV PCR) result reached 2000 copies/mL. Finally, from June 2010 to December 2011, 40 D+R- patients received universal prophylaxis for 6 months (valganciclovir 900 mg daily). During the whole period of study, the same WB CMV PCR assay was used to monitor all of the included patients. The assay was performed once a week for the first three months, then once a month between month 3 and 6, and finally every two months up until one year.

Intravenous (IV) ganciclovir (5 mg/kg two times a day) or oral valganciclovir (900 mg two times a day) were used for curative treatment. IV ganciclovir was administered for 2–3 weeks and was always followed by valganciclovir treatment at a prophylactic dose for 3-4 additional weeks, as previously described²¹. The anti-CMV treatment was stopped after two consecutive negative WB CMV PCR results. The daily total doses of IV ganciclovir or valganciclovir for patients with impaired renal function was adjusted according to the manufacturer's recommendations (using the Cockcroft-Gault formula).

Definitions

CMV manifestations were defined, based on standardized criteria, as CMV infection (CMV viral load proven by two consecutive positive WB CMV PCR results) or CMV disease, either as CMV syndrome (unspecific clinical symptoms and detectable CMV DNAemia in blood) or CMV tissue-invasive disease (proven CMV-related organ dysfunction or failure)²¹.

CMV DNAemia duration was defined as the time between the first positive CMV DNAemia to the last positive CMV DNAemia result. CMV DNAemia was considered positive when detectable, namely over 500 copies/mL. CMV resolution was defined for a given patient when he presented with successive negative CMV DNAemias for a minimum of one year follow-up.

Anti-CMV drug resistance was investigated when a significant increase of CMV DNAemia load ($>1 \log_{10}$ copies/mL) was observed during antiviral therapy with valganciclovir or IV ganciclovir and was defined as the presence of resistance-associated mutations in the *UL97* and/or *UL54* genes¹⁰. Expanded criteria donor (ECD), and delayed graft function (DGF) were defined as previously described^{22 23}.

CMV monitoring

The detection of CMV IgG in serum was performed following the manufacturer's recommendations (Enzygnost anti-CMV/IgM and IgG, Dade Behring, Marburg, Germany). WB CMV PCR was performed as previously described²⁴. Genotypic resistance testing was performed at the French National Cytomegalovirus Reference Center (Limoges, France). The full-length *UL97* and *UL54* genes were sequenced from DNA extracted from clinical samples. Sequences were compared with the AD169 reference sequence using the Gene Librarian 3.2TM software (Visible Genetics Inc., Siemens, France) for the identification of known resistance-related mutations, polymorphisms and new mutations, whether or not they were within suspected resistance loci^{25,26}.

Flow Cytometric Analysis and monitoring of $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells

Whole blood was incubated with different monoclonal antibodies (anti-CD45 and anti-CD3 from BD Bioscience, anti-pan γ and anti- $V\delta 2$ from Beckman Coulter). After red cell lysis and fixation, at least 5000 lymphocytes were processed by the FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences 2350 Qume Drive, San Jose, California, USA), and the percentages of cell populations were obtained using the CELLQUEST software (BD Bioscience, 2350 Qume Drive, San Jose, California, USA). Absolute counts of lymphocytes were obtained using the single platform lyse/no wash Trucount (BD Bioscience). In the center, our routine monitoring of $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells is based on a measurement at

day 0 of the graft, M3, M6, M12, then every year. In case of CMV infection, repeated V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells determinations have been performed. For each patient, a maximal interval of 100 days between two determinations of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells phenotype was allowed, otherwise these patients were not included in the analysis of the kinetics of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells. Thirty D+/R- and 23 R+/ATG patients were excluded from the analysis of the kinetics in that way.

Statistical Analysis

Analyses were performed using conventional statistical methods using the R statistical software (V 3.10.1) and its associated lme4 and ROCR packages²⁷. Wilcoxon test was used when appropriate. P<0.05 was considered statistically significant. When required, threshold values and performances were evaluated using receiver operating characteristics. To calculate the rate of expansion we analyzed patient by patient the kinetics of the V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells, that is low and stable before infection, and then undergoes a period of linear expansion following infection, and finally reach a plateau. Then, for each patient, the slope of expansion was determined during the period of linear increase using a linear mixed model, which is well suited to analyze repeated, correlated and unbalanced longitudinal data.

Results

1. Baseline characteristics of patients

Table 1 compares the baseline characteristics of D+/R- and R+/ATG patients. In D+/R- patients, no significant difference was observed in the baseline characteristics between infected and non-infected patients.

In R+/ATG patients, both donors and recipients were significantly older in infected group compared to non-infected group. R+/ATG non-infected patients appeared also more sensitized than infected (p=0.001). No other difference in R+/ATG patients was noted.

Median duration of CMV DNAemia was 134 days (range: 14 to 373 days) in D+/R- patients and 24 days (6-194) in R+/ATG patients (p<0.0001).

Table 1: Baseline characteristics of patients

	D+R-			R+/ATG		
	Infected	Non infected	p-value	Infected	Non infected	p-value
	n=93	n=75		n=74	n=30	
Recipients						
Age (mean±SD , yr)	50 ± 12.3	46.8 ± 14.7	0.5	56 ± 11.6	49± 9.6	0.008
Sex (M/F)	65/28	55/20	0.7	48/26	17/13	0.5
HLA Sensitization, N (%)	26 (28)	19 (25)	0.7	36 (49)	25 (83)	0.001
Nephropathy, N			0.7			0.4
Glomerular	36	28		21	11	
Tubulo-interstitial	12	8		9	3	
Vascular	7	11		10	1	
Binephrectomy for cancer	1	0		3	0	
Diabetes	4	2		4	1	
Congenital	24	18		13	9	
Unknown	9	8		11	5	
Hemodialysis/Peritoneal Dialysis, N	89/4	73/2	0.6	67/5	26/2	1
Donors						
Age (mean ± SD, years)	47.9 ± 13.8	44.9 ± 16.6	0.2	52.6±15.3	45.1± 15.1	0.01
Expanded criteria donors, N (%)	28 (30)	17 (23)	0.3	38 (51)	12 (40)	0.2
Living donors	3	3		0	1	
HLA A/B/DQ/DR mismatches, N	3.2 ± 1.6	3.4 ± 1.3	0.6	3.4 ± 1.4	3.6 ±1.5	0.1
Total ischemia time (mean ± SD, hr)	15.6 ± 4.8	17.5 ± 6.7	0.09	18.5 ± 7.3	18.4 ± 7.6	0.2
Delayed graft function, N (%)	24 (26)	20 (27)	1	52 (70)	19 (63)	0.5
Immunosuppressive treatment						
Cyclosporine A/ Tacrolimus/mTORi, N	27/62/4	17/57/1	0.3	6/62/5	3/26/1	0.5
Mycophenolate Mofetil, N	92	74	0.6	73	30	1
Corticosteroids, N	93	75	0.9	73	28	0.9
Anti-IL2 Receptor Antibody/ATG, N	61/32	53/22	0.5	0/74	30	-
Median duration of CMV DNAemia, days (range)	126 (14-373)	-	-	24 (6-194)	-	-
CMV prophylaxis						
Preemptive therapy/Universal prophylaxis 3/6Months, N	48/27/18	32/21/22	0.3	56/18	16/14	0.03

2. Kinetics of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells in kidney transplant recipients

During the seven years follow-up, in average, ten phenotypic determinations of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells were available for each patient. In D+R- patients (Figure 1A), infected patients had a slow and progressive increase of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells percentage of total lymphocytes. The median (1st 3rd quartiles) percentage of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells increased from 0.8% (0.4%; 2.9%) before CMV infection, to 4.4% (1.4%; 10.7%) when the plateau was reached. During the same period, the median (1st; 3rd quartiles) percentage of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells in non-infected patients remained stable at 0.7% (0.5%, 1.06%).

The kinetics of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells in R+/ATG patients was depicted in Figure 1B. In infected R+/ATG patients, the median V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells percentage was 1.6% (0.8%; 3%) before CMV infection and increased to 6.1% (2.8%; 10.8) when plateau was reached. In non-infected patients, the median V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells percentage at the beginning of follow-up was significantly higher than in infected patients ($p=0.01$) and remained stable. When the kinetics of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells was expressed using absolute counts instead of percentages of total lymphocytes, similar profiles in infected and non-infected patients were observed (data not shown) and the correlation coefficient between absolute counts of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells and percentage of total lymphocytes was $r=0.76$.

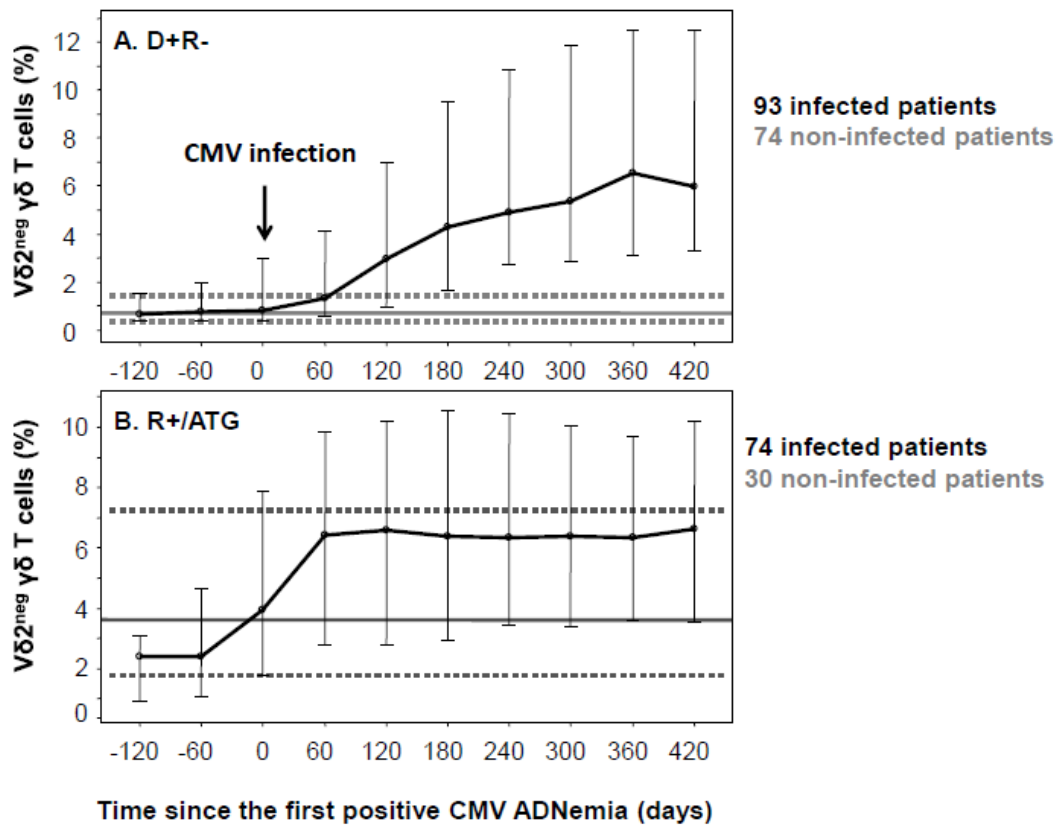


Figure 1 – Kinetics of Vδ2^{neg} γδ T cells in D+R- and R+/ATG patients from CMV infection. In infected patients (black line), data interpolated to two months of Vδ2^{neg} γδ T cells percentages (median, 1st and 3rd quartiles) are represented since the first positive CMV ADNemia. In non-infected patients (grey line), all Vδ2^{neg} γδ T cells percentage values during the follow-up period are pooled and are represented (median in solid line, 1st and 3rd quartiles in dashed lines).

3. Determination of the rate of $V\delta 2^{neg} \gamma\delta$ T cells expansion

In a preliminary approach, we wondered whether the resolution of infection, defined as a one-year successive negative DNAemias following the last positive, could be predicted by a unique percentage of $V\delta 2^{neg} \gamma\delta$ T cells. As shown in Figure 2 (A and B), a wide heterogeneity in the percentage of $V\delta 2^{neg} \gamma\delta$ T cells was observed at this time, that precluded the determination of a suitable threshold able to predict CMV resolution. Thus, we rather considered the whole dynamic evolution of the $V\delta 2^{neg} \gamma\delta$ T cells population after CMV infection. To this end, we calculated the expansion rate of $V\delta 2^{neg} \gamma\delta$ T cells in each patient using a linear mixed model. Figure 3 represents the expansion rates of all D+R- (A) and R+/ATG patients (B). Interestingly, comparison of expansion rates within both populations, D+R- and R+/ATG patients were not statistically different ($p=0.35$). We determine a threshold of 0.06% per day that captured the maximal number of patients in the positive dynamic slope of the curve, with a minimal rate of error of 8% (Figure 4).

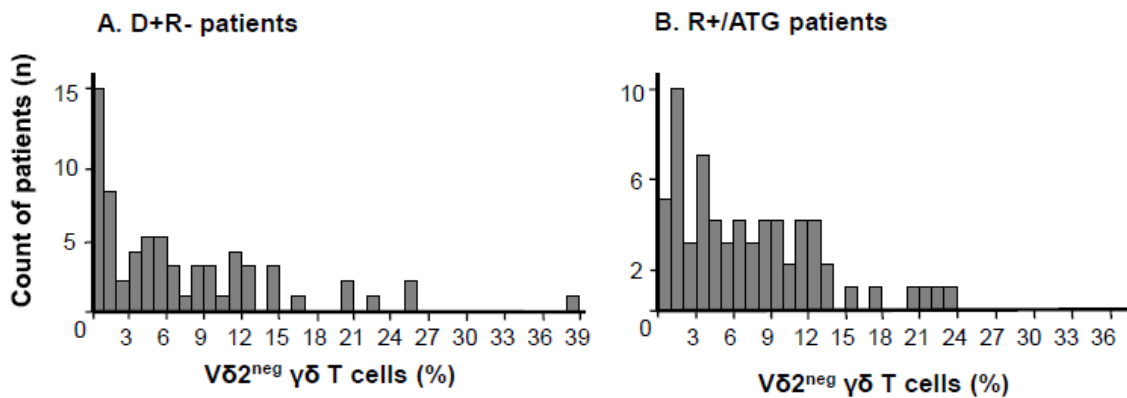


Figure 2 – Distribution of $V\delta 2^{neg} \gamma\delta$ T cells when CMV DNAemia becomes negative. In order to know if a threshold of $V\delta 2^{neg} \gamma\delta$ T cells percentage was predictive of CMV resolution, we represented the histograms of $V\delta 2^{neg} \gamma\delta$ T cells percentage at the moment of CMV DNAemia negativation for both D+R- patients (Figure 2.A) and R+/ATG patients (Figure 2.B). We can see that $V\delta 2^{neg} \gamma\delta$ T cells percentage values are widely distributed.

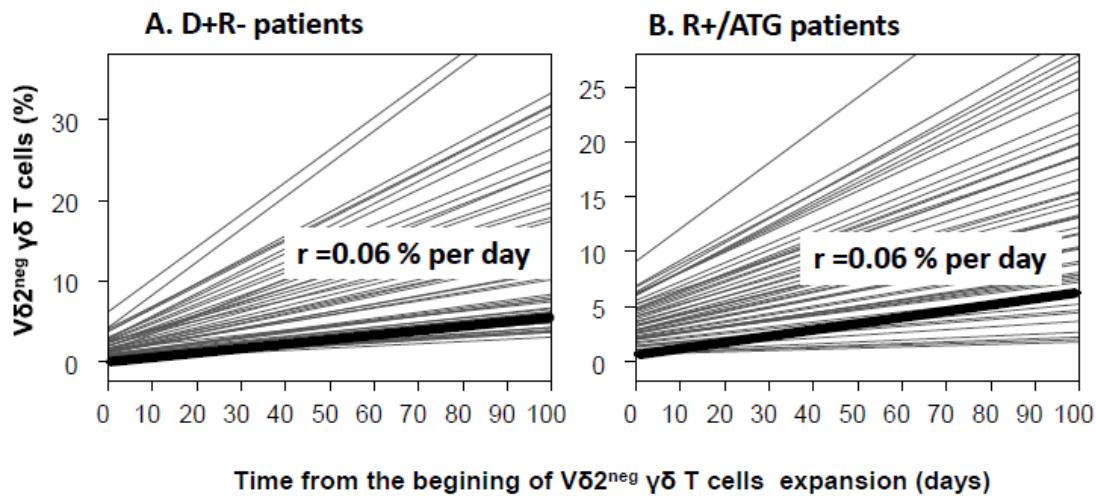


Figure 3 – Estimation of $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion using a linear mixed model. To calculate the rate of expansion we analyzed patient by patient, the kinetics of the $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells. Then for each patient, the slope of expansion was determined during the period of linear increase and the estimated expansion was made with 2 to 12 point-times on each linear expansion by patient.

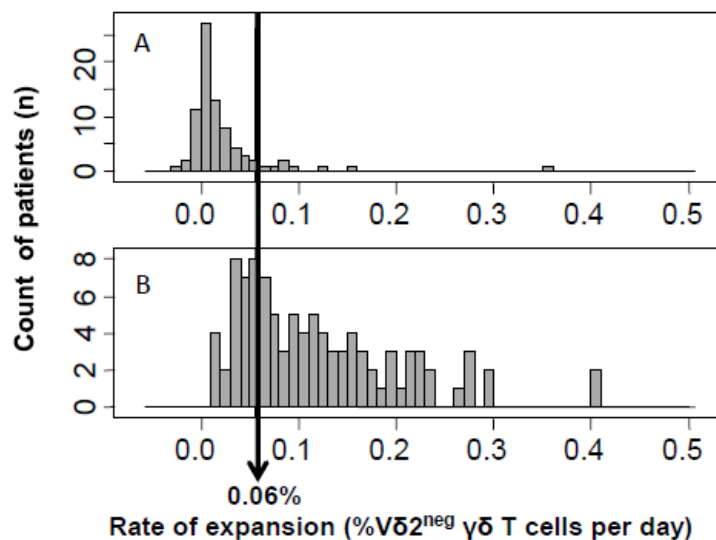


Figure 4 – Threshold to determine the positive estimated $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion.

Figure 4.A represents histogram of estimated $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion (in percentage of $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells per day) with the linear mixed model that considers the period of significant linear increase during the follow-up since CMV infection.

Figure 4.B represents histogram of maximal $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells slope between two points-times before estimated $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion (in percentage of $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells per day) with the linear mixed model. 0.06%/day was the best threshold of expansion to capture the maximum of estimated $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion with the minimum of mistake (7.8% of maximal $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells slope reached 0.06%/day).

4. Delay for $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells expansion is correlated with the time of CMV resolution

We then analyze the influence of $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells expansion, as previously defined, on the fate of CMV infection. As shown in Figure 5A, a very closed correlation was found in D+R- patients between the delay for $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells expansion and the time of resolution of CMV infection ($r=0.91$, $p<0.001$). When patients reached or exceeded an expansion rate of 0.06% per day, their CMV DNAemia became negative: 88% of D+/R- patient resolved CMV infection within 30 days after their $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells expansion. In practice, this observation was based on a routine monitoring of $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells every 2 months during one-year follow-up, period that covers the duration of positive DNAemias of most D+/R- patients in our cohort.

In R+/ATG patients, the delay of expansion was also correlated with CMV DNAemia negativation ($r=0.55$, $p<0.0001$, Figure 5B). Of note, as for D+R- patients, 92% of R+/ATG patients resolved CMV infection within the same time interval of 30 days after $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells expansion. In this category of patients, a six-month monitoring period was sufficient to capture all $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ T cells expansions leading to CMV infection resolution.

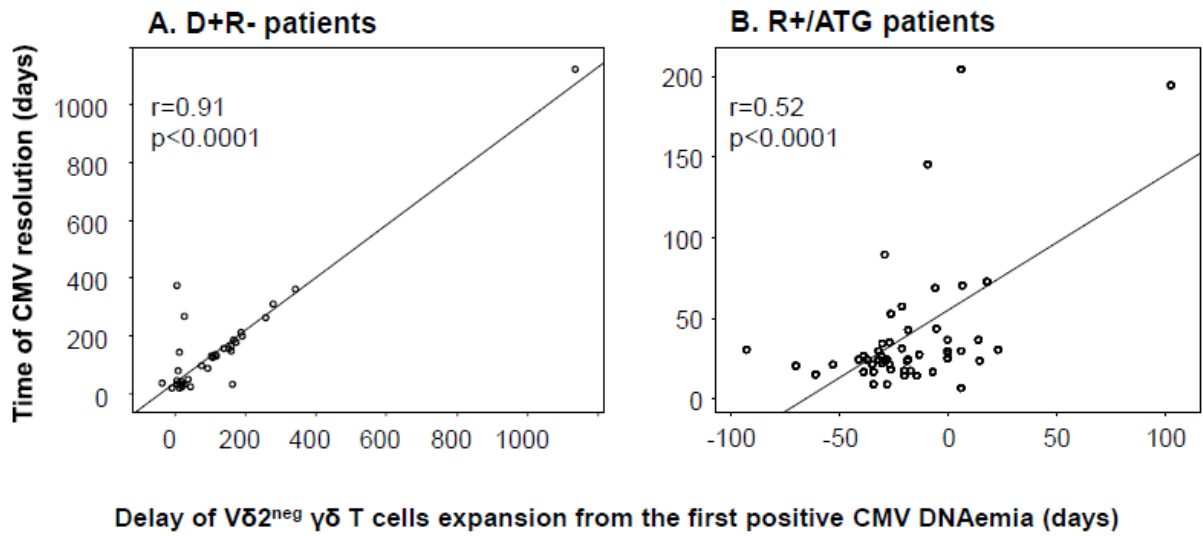


Figure 5 – Delay for $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion is correlated with time of CMV resolution. In D+R- patients (Figure 5.A) and in R+/ATG patients (Figure 5.B), linear regression are represented between time of CMV DNAemia negativation (days) and the delay for $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion from the first positive CMV DNAemia (days).

5. Factors influencing the delay of expansion of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells in D+R- patients

To better understand the long period of time required to observe the V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion in D+R- patients (all R+/ATG patients had an early expansion), an univariate analysis was performed including following parameters : recipient's age, recipient's gender, induction treatment, CMV treatment, peak viral load and anti-viral drug resistance (Table 2). Interestingly, preemptive strategy was correlated with a delayed V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion (109 days of delay in preemptive group compared to 6 months of universal prophylaxis group, p=0.002; and 93 days of delay compared to 3 months of universal prophylaxis, p= 0.05). Another finding was the significant influence of the onset of an anti-viral drug resistance on the delay of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion (p=0.01).

Table 2: Variables associated with the delay of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion in D+R- patients

Variable	Coefficient (SE) (days)	p-value
Recipient age at the time of the graft*	+ 0,45 (1,1)	0,7
Recipient's Gender (Male vs Female)	+ 8 (32)	0,8
Induction (ATG vs anti-IL2 Receptor Antibody)	+22 (32)	0,5
Anti-viral drug resistance (vs no resistance)	+30 (34)	0,01
Peak viral load**	- 8,6 (4,2)	0,8
Valganciclovir 3 months (vs. Preemptive strategy)	-93 (47)	0,05
Valganciclovir 6 months vs. Preemptive strategy	-109 (33)	0,002

* increase in the delay of expansion (days) for each additional year of age

** decrease in the delay of expansion (days) for each additional 10 000 000 of CMV copies/ml

6. Anti-viral drug resistance occurs in the absence of viral clearance 39 days after V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion

We observed that all D+R- patients with antiviral drug resistance had a significant median (1st; 3rd quartiles) delayed V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion of 100 days (18.75; 163) vs. 140 days in patients without anti-viral drug resistance (128; 243), p=0.0007 (Figure 6). Expansion after 76 days was associated with an increased risk of an anti-viral drug resistance [RR = 1.8 (1.4-2.6), p=0.0006]. Therefore, delay of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion after 76 days of consecutive positive DNAemias could be an earlier immune marker to diagnose anti-viral drug resistance due to a mutant strain (Sensitivity

100%, specificity 60%, positive predictive value 47%, negative predictive value 100%, AUC=0.74, data not shown). In patients who developed a mutant strain, V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion was not correlated with the resolution of infection ($r=0.05$, $p=0.8$, data not shown). Indeed, duration of CMV DNAemia was significantly longer after V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion in patients with mutant strain (79 vs 14 days, $p<0.001$) (Figure 7). Moreover, the persistence of a positive CMV DNAemia beyond 39 days after V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion could predict the emergence of a mutant strain, (sensitivity: 80%, specificity: 91%, positive predictive value: 71%, negative predictive value: 91%, AUC =0.77, data not shown).

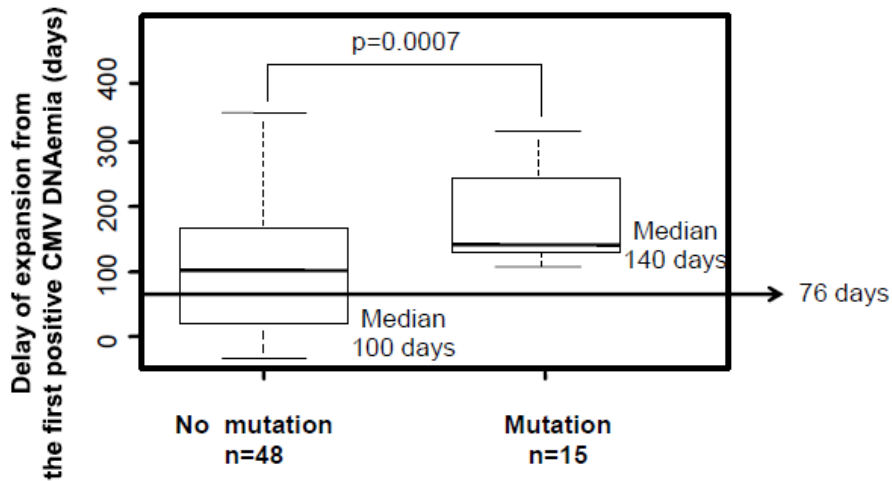


Figure 6 – Late V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion is a risk factor of antiviral drug resistance in D+R- patients. It represents box plots of delay of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion from the first positive CMV DNAemia (days) comparing D+R- infected patients with or without emergence of a mutant strain. A delay of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion of 76 days was predictive of a mutant strain (Sensitivity 100%, Specificity 60%, positive predictive value 47%, negative predictive value 100%).

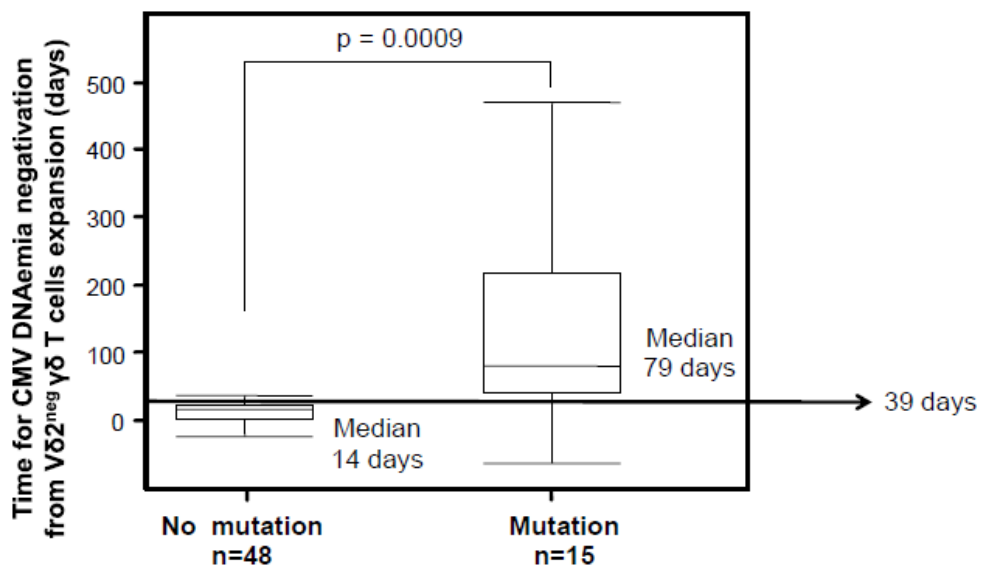


Figure 7 – Prolonged positive CMV DNAemia following V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion can predict the emergence of a mutant CMV strain. It represents box plots of time for CMV DNAemia negatvation from V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion (days) comparing D+R- infected patients with or without emergence of a mutant strain. 39 days of positive DNAemia persistence after V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion was predictive of the emergence of a mutant strain.

Discussion

In this study, our goal was to determine whether a sequential monitoring of $V\delta 2^{\text{neg}} \gamma\delta$ T cells before and after CMV infection could be of help to predict the long-term fate of infection in high risk D+R- and R+/ATG kidney transplant recipients. In both R+ and R- populations, we found a significant expansion of $V\delta 2^{\text{neg}} \gamma\delta$ T cells following CMV infection, harboring however a different kinetics, slow and gradual in D+R- patients, much faster in R+/ATG patients. In order to take into account this time-dependent variable and the large heterogeneity of the percentages of $V\delta 2^{\text{neg}} \gamma\delta$ T cells between individuals, we set up a linear mixed model, allowing us to calculate a positive rate of expansion of 0.06 % per day. Using this dynamic expression of the $\gamma\delta$ T cell response, we demonstrated that approximately 90 % of D+R- and R+/ATG patients had a long-term resolution of CMV infection within 30 days after they reached this positive rate of expansion of 0.06 % per day. Conversely, a delay in the onset of expansion rate was associated, in D+R- patients, with a risk of emergence of a mutant strain resistant to anti-viral drugs. We calculate that the persistence of positive DNAemias during 76 days in the absence of $V\delta 2^{\text{neg}} \gamma\delta$ T cells could be used as a marker of mutant strain occurrence, with 100 % sensitivity and 100 % negative predictive value.

The current epidemiology of CMV infection in solid-organ transplant recipients is mainly driven by the choice of the treatment strategy, along with the matching of CMV serostatus between donor and recipient. Both universal prophylaxis and preemptive treatment are viable approaches for the prevention of CMV disease²⁸⁻³¹, as demonstrated by randomized controlled trials and stated in the last updated international consensus guidelines³². Adequate CMV-specific immunity reconstitution in immunosuppressed patients is of paramount importance to avoid late-onset infections that is associated with a higher risk of allograft loss or mortality³³. As this complication is much less frequent with preemptive approach, compared to universal prophylaxis^{28,30}, it was claimed that the latter strategy hampered the development of specific immune response because the absence of viral antigenic trigger during prophylaxis. Considering $\gamma\delta$ T cell response, this assumption was not true since we demonstrated that a delay of expansion was associated in 93 infected D+R- patients with the preemptive approach. We hypothesize that the delay of expansion may reflect a difference in the

burden of immunosuppression. However, we did not find any significant association between the type of induction treatment used (anti-CD25 antibodies vs ATG) and the expansion of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells. Thus, from an immunological perspective, our results favor the use of universal prophylaxis strategy since it facilitates the development of a protective $\gamma\delta$ T cell response.

Our approach using V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells sequential monitoring differs from others studies based on CMI assays by several points. First, the majority of these studies included a low number of patients, mostly R+ patients, in whom immune response already exists. Secondly, when included, D+R- patients are analyzed together with R+ patients what could bias the results in predictive value of infection for positive test because CMI assays are often found positive only in R+ patients^{17,34}. In our cohort, we included a large number of high risk patients for CMV infection and analyzed separately 167 D+R- patients and 104 R+/ATG patients, allowing to demonstrate an expansion of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells in both groups. In addition, most of the assays require an activation step, often different between the tests, such as ELISPOT³⁵ or intra-cytoplasmic cytokine staining^{12,13,36}, or Quantiferon[®]-CMV assays^{16,18}). A major advantage of studying V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells relies on a simple (no stimulation required), standardized, inexpensive whole blood technique based on a immunophenotyping of those cells that are intrinsically specific of a CMV immune response. Finally, most of previous studies attempted to define a threshold of CMI at a given time point that could be predictive of a CMV event. This goal was rarely achieved except in studies using Quantiferon[®]-CMV assay, with variations in the thresholds used^{17,20}. However, data in D+R- patients are more elusive. In a study of 124 D+R- kidney transplant recipients, only 31 had a positive Quantiferon[®]-CMV assay at the end of prophylaxis and did not undergo CMV infection, leading to a good (90 %) positive predictive value of the test but a poor (27 %) negative predictive value²⁰. Furthermore, Quantiferon[®]-CMV assay is hampered by lymphopenic state, is not well validated in transplant population and mainly assesses CD8 response. Others studies using different techniques have suggested a threshold that could be of interest in clinical setting. Using *Immediate Early* pool of protein to stimulate CD8 lymphocytes, it has been demonstrated in a small cohort of R+ transplanted patients that a threshold up to 0.4% at day 0, two weeks after graft and in the first months was associated with the absence of CMV reactivation³⁷.

Others tests, such as ELISPOT showed correlation between increased immune response and absence of reactivation, in the absence of defined threshold^{11,38,39}. Here, we took advantage of the numerous phenotypic determinations of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells during the long period of follow-up. It allowed us to focus on a kinetics of expansion, rather than a unique value at a given time point, in order to obtain a more accurate reflection of this complex interaction between CMV, immune response anti-CMV and immunodeficient state. Using this approach, it is interesting to note that naïve (D+R-) patients had importantly delayed response compared to memory (R+) patients. However, once a sustained V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells was observed, the slope of expansion was identical between the two groups of patients and similarly associated with the resolution of infection. In our hands, repeated determinations (every month since infection for R+ and every two months for D+R- patients) of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells are required to know whether a patient has reached a positive rate of expansion of 0.06 % of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells per day, thus predicting the absence of relapse for 90 % of D+R- or R+ patients.

The emergence of a mutant strain resistant to anti-viral drugs is a serious concern in solid-organ transplantation because of its impact on graft¹⁰ and patient survival⁴⁰. Not surprisingly, it has been recently shown that anti-viral drug resistance is diagnosed very late, in average after 130 days of treatment⁴¹. A few previous studies hypothesized that the delay of immune response was involved in mutant strain emergence^{14,42}, but it was really demonstrated in only 3 patients¹⁴. Absence of preexisting CMV specific immunity (D+/R-) is the most consistently identified anti-viral resistance risk factor^{26,43,44} as well as the burden of immunosuppression⁴³.

Here, we showed that all 15 patients with anti-viral drug resistance had a delay in a V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion. As a threshold that could be useful in clinical setting, we show that a V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion occurring lately after 76 days of infection had a high sensitivity of 100% for mutant strain emergence. Conversely, the persistence of infection beyond 39 days after V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion was predictive of a mutant strain, maybe reflecting thus some degree of clonal exhaustion of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells, as it is often observed in chronic viral infections⁴⁵.

In conclusion, a defined rate of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells expansion is related to the resolution of CMV infection in high risk patients. The delay of expansion and the persistence of positive DNAemias after

expansion are predictive of the occurrence of a mutant strain. These results support the use of sequential monitoring of V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cells in solid-organ transplant recipients.

Acknowledgments

We thank Catherine Rio for her help as a nurse coordinator. We also acknowledge the technicians from the Laboratories of Virology and Immunology in Bordeaux Hospital and the Centre National de Référence des Cytomégalo virus for their significant contribution to this study. There was no study sponsor.

References

1. Smith, C., Miles, J.J. & Khanna, R. Advances in direct T-cell alloreactivity: function, avidity, biophysics and structure. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **12**, 15-26 (2012).
2. Gandhi, M.K. & Khanna, R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet infectious diseases* **4**, 725-738 (2004).
3. Dechanet, J., *et al.* Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *The Journal of infectious diseases* **179**, 1-8 (1999).
4. Dechanet, J., *et al.* Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *The Journal of clinical investigation* **103**, 1437-1449 (1999).
5. Abate, D., *et al.* Comparison of cytomegalovirus (CMV) enzyme-linked immunosorbent spot and CMV quantiferon gamma interferon-releasing assays in assessing risk of CMV infection in kidney transplant recipients. *Journal of clinical microbiology* **51**, 2501-2507 (2013).
6. Abate, D., *et al.* Optimization of interferon gamma ELISPOT assay to detect human cytomegalovirus specific T-cell responses in solid organ transplants. *Journal of virological methods* (2013).
7. Schmidt, T. & Sester, M. Detection of antigen-specific T cells based on intracellular cytokine staining using flow-cytometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1064**, 267-274 (2013).
8. Brooimans, R.A., *et al.* Analytical performance of a standardized single-platform MHC tetramer assay for the identification and enumeration of CMV-specific CD8+ T lymphocytes. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **73**, 992-1000 (2008).
9. Humar, A., *et al.* The efficacy and safety of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **10**, 1228-1237 (2010).
10. Couzi, L., *et al.* High incidence of anticytomegalovirus drug resistance among D+R- kidney transplant recipients receiving preemptive therapy. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **12**, 202-209 (2012).
11. Abate, D., *et al.* Evaluation of cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immune reconstitution revealed that baseline antiviral immunity, prophylaxis, or preemptive therapy but not antithymocyte globulin treatment contribute to CMV-specific T cell reconstitution in kidney transplant recipients. *The Journal of infectious diseases* **202**, 585-594 (2010).
12. Radha, R., *et al.* Cellular immune responses to cytomegalovirus in renal transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **5**, 110-117 (2005).
13. La Rosa, C., Limaye, A.P., Krishnan, A., Longmate, J. & Diamond, D.J. Longitudinal assessment of cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses in liver transplant recipients at high risk for late CMV disease. *The Journal of infectious diseases* **195**, 633-644 (2007).
14. Egli, A., *et al.* Cytomegalovirus-specific T-cell responses and viral replication in kidney transplant recipients. *Journal of translational medicine* **6**, 29 (2008).

15. Pipeling, M.R., John, E.R., Orens, J.B., Lechtzin, N. & McDyer, J.F. Primary cytomegalovirus phosphoprotein 65-specific CD8+ T-cell responses and T-bet levels predict immune control during early chronic infection in lung transplant recipients. *The Journal of infectious diseases* **204**, 1663-1671 (2011).
16. Westall, G.P., Mifsud, N.A. & Kotsimbos, T. Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8+ T-cell immunity. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **8**, 1749-1754 (2008).
17. Kumar, D., *et al.* Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **9**, 1214-1222 (2009).
18. Lisboa, L.F., Kumar, D., Wilson, L.E. & Humar, A. Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation* **93**, 195-200 (2012).
19. Weseslindtner, L., *et al.* Prospective analysis of human cytomegalovirus DNAemia and specific CD8+ T cell responses in lung transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **12**, 2172-2180 (2012).
20. Manuel, O., *et al.* Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **56**, 817-824 (2013).
21. Asberg, A., *et al.* Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **7**, 2106-2113 (2007).
22. Metzger, R.A., *et al.* Expanded criteria donors for kidney transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **3 Suppl 4**, 114-125 (2003).
23. Koning, O.H., *et al.* Risk factors for delayed graft function in cadaveric kidney transplantation: a prospective study of renal function and graft survival after preservation with University of Wisconsin solution in multi-organ donors. European Multicenter Study Group. *Transplantation* **63**, 1620-1628 (1997).
24. Garrigue, I., *et al.* Prediction of cytomegalovirus (CMV) plasma load from evaluation of CMV whole-blood load in samples from renal transplant recipients. *Journal of clinical microbiology* **46**, 493-498 (2008).
25. Chou, S., *et al.* Recombinant phenotyping of cytomegalovirus sequence variants detected after 200 or 100 days of valganciclovir prophylaxis. *Transplantation* **90**, 1409-1413 (2010).
26. Hantz, S., *et al.* Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **65**, 2628-2640 (2010).
27. Team, R.C. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2012. (ISBN 3-900051-07-0, [Available from: <http://www.R-project.org/>], 2013).
28. Khoury, J.A., *et al.* Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **6**, 2134-2143 (2006).
29. Kliem, V., *et al.* Improvement in long-term renal graft survival due to CMV prophylaxis with oral ganciclovir: results of a randomized clinical trial. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **8**, 975-983 (2008).
30. Reischig, T., *et al.* Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **8**, 69-77 (2008).
31. Witzke, O., *et al.* Valganciclovir prophylaxis versus preemptive therapy in cytomegalovirus-positive renal allograft recipients: 1-year results of a randomized clinical trial. *Transplantation* **93**, 61-68 (2012).
32. Kotton, C.N., *et al.* Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* **96**, 333-360 (2013).
33. Arthurs, S.K., *et al.* Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **46**, 840-846 (2008).

34. Cantisan, S., *et al.* Pretransplant interferon-gamma secretion by CMV-specific CD8+ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **13**, 738-745 (2013).
35. Abate, D., *et al.* Optimization of interferon gamma ELISPOT assay to detect human cytomegalovirus specific T-cell responses in solid organ transplants. *Journal of virological methods* **196**, 157-162 (2014).
36. Eid, A.J., *et al.* A prospective longitudinal analysis of cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ and CD8+ T cells in kidney allograft recipients at risk of CMV infection. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* **23**, 506-513 (2010).
37. Bunde, T., *et al.* Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *The Journal of experimental medicine* **201**, 1031-1036 (2005).
38. Costa, C., *et al.* Evaluation and significance of cytomegalovirus-specific cellular immune response in lung transplant recipients. *Transplantation proceedings* **43**, 1159-1161 (2011).
39. Patel, M., *et al.* Dynamics of cell-mediated immune responses to cytomegalovirus in pediatric transplantation recipients. *Pediatric transplantation* **16**, 18-28 (2012).
40. Limaye, A.P. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus in organ transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **35**, 866-872 (2002).
41. Le Page, A.K., *et al.* Clinical aspects of cytomegalovirus antiviral resistance in solid organ transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **56**, 1018-1029 (2013).
42. Emery, V.C. & Griffiths, P.D. Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8039-8044 (2000).
43. Limaye, A.P., Corey, L., Koelle, D.M., Davis, C.L. & Boeckh, M. Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants. *Lancet* **356**, 645-649 (2000).
44. Myhre, H.A., *et al.* Incidence and outcomes of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infections in 1244 kidney transplant recipients. *Transplantation* **92**, 217-223 (2011).
45. Day, C.L., *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**, 350-354 (2006).

- Annexes

Il nous a semblé intéressant d'ajouter en annexes les résultats complémentaires réalisés au cours de ce travail mais non intégré dans l'article.

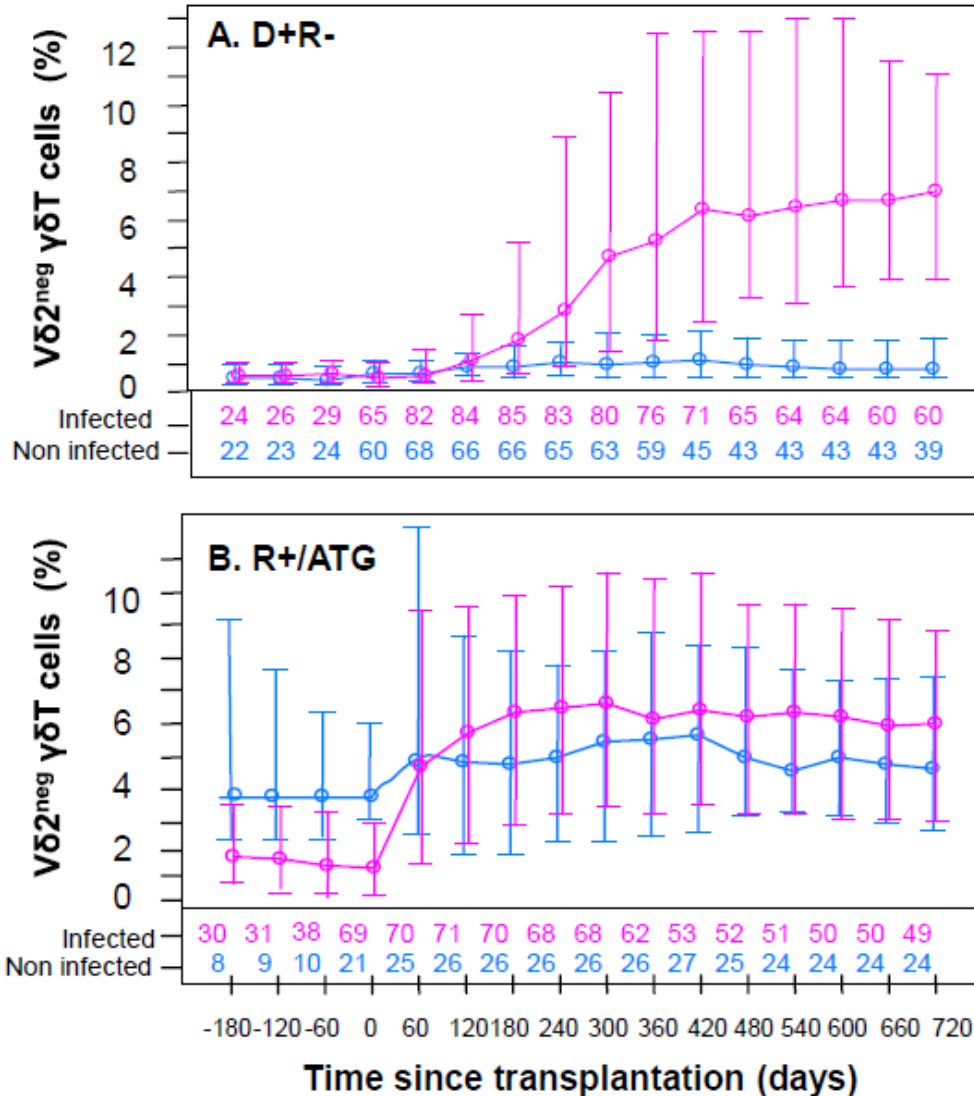


Figure 1S – Kinetics of Vδ2^{neg} γδ T cells in D+R- and R+/ATG patients since transplantation. Data interpolated to two months of Vδ2^{neg} γδ T cells percentages (median, 1st and 3rd quartiles) are represented since the transplantation. We observed in D+R- patients that Vδ2^{neg} γδ T cells percentage are equal at transplantation time and expanded only in infected patients. In R+/ATG patients, Vδ2^{neg} γδ T cells percentage was higher in non-infected at time of transplantation patients and remained stable. We observed a significant Vδ2^{neg} γδ T cells expansion in R+/ATG infected patients.

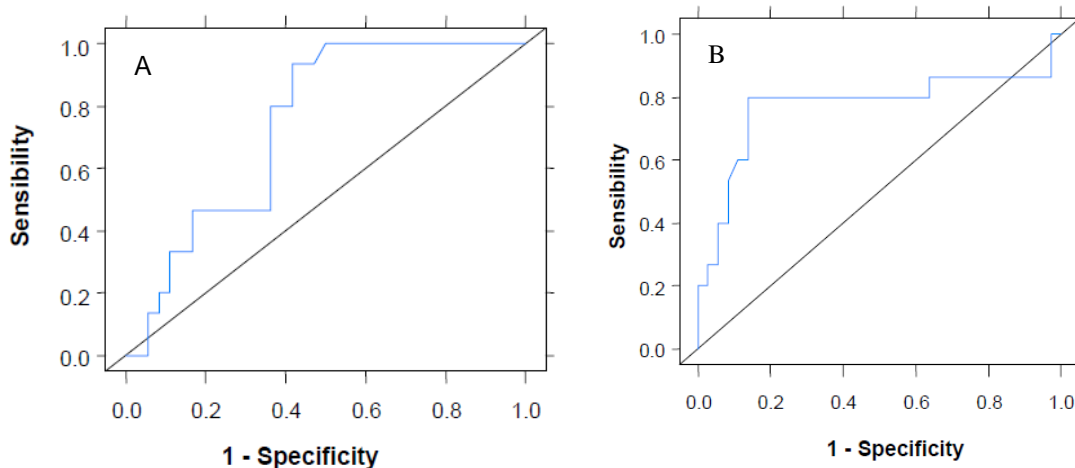


Figure 2S – ROC curves for prediction of anti-viral drug resistance. Figure 2S A represents ROC curve of anti-viral drug resistance prediction depending on time of Vδ2^{neg} γδ T cells (76 days, AUC 0.74). Figure 2S B represents ROC curves of anti-viral drug resistance prediction depending on time for CMV DNAemia negatvation from Vδ2^{neg} γδ T cells expansion (39 days, AUC 0.77)

Table 1S: Variables associated with the rate of Vδ2^{neg} γδ T cells expansion

Variable	Coefficient (SE) (%/day)	p-value
Recipient's age at the time of the graft*	+0.002(+0.001)	0,22
Recipient's gender (Male vs Female)	+ 0.08 (0.03)	0,02
Induction (ATG vs anti-IL2 Receptor Antibody)	+0,022 (0.03)	0,5
Anti-viral drug resistance (vs no resistance)	+0.03 (0.04)	0,48
Peak viral load**	- 0.001 (0.0001)	0,69
Valganciclovir 3 months (vs. Preemptive strategy)	-0.08 (-0.36)	0,05
Valganciclovir 6 months vs. Preemptive strategy	-0.12 (-0.51)	0,18

* increase in the delay of expansion (days) for each additional year of age

** decrease in the delay of expansion (days) for each additional 10 000 000 of CMV copies

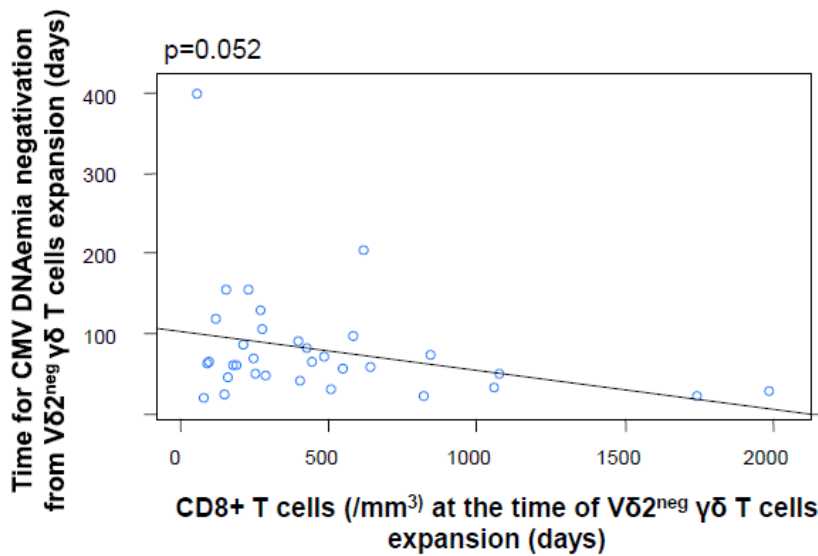


Figure 3S – Linear regression between CD8+ T cells values at the time of Vδ2^{neg} γδ T cells expansion and time for CMV DNAemia negatvation from Vδ2^{neg} γδ T cells expansion in D+R-infected patients without mutant strain. In order to explain why several patients had prolonged CMV DNAemia since Vδ2^{neg} γδ T cells expanded, we observed values of CD8+ T cells at this time. In infected patients with prolonged CMV DNAemia after Vδ2^{neg} γδ T cells expansion, CD8+T cells tended to be lower; implying a higher level of immunosuppression, but this test wasn't statistically significant.

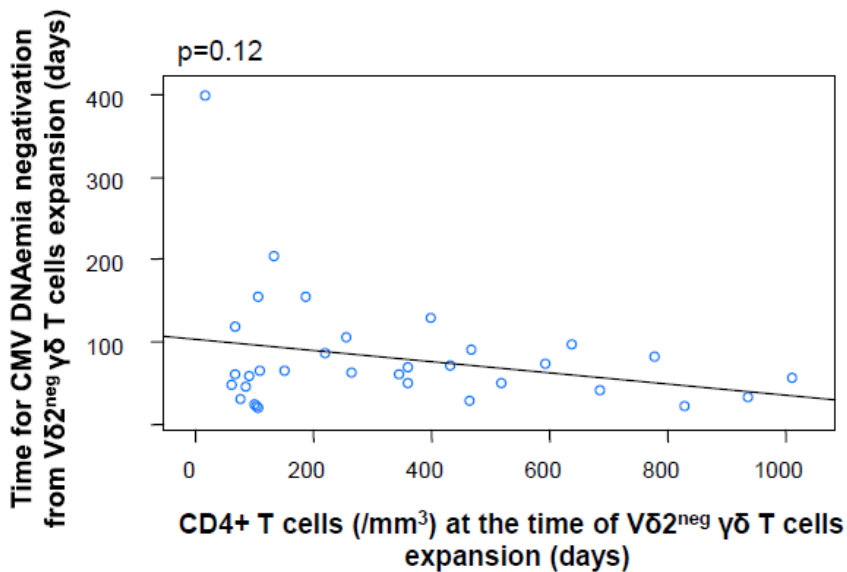


Figure 4S – Linear regression between CD4+ T cells values at the time of Vδ2^{neg} γδ T cells expansion and time for CMV DNAemia negatvation from Vδ2^{neg} γδ T cells expansion in D+R-infected patients without mutant strain. There is no correlation between prolonged CMV DNAemia after Vδ2^{neg} γδ T cells expansion and CD4+ T cells values.

- **Serment de l'ordre français des médecins**

« Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me le demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque ».

Introduction

Le cytomégalovirus (CMV) en transplantation d'organe solide est associé à une morbidité et une mortalité accrue, en particulier dans le cas de l'émergence d'une souche mutée avec résistance aux traitements anti-viraux. Les études sur l'immunosurveillance devraient fournir des informations cliniques pertinentes sur l'utilité d'étudier la réponse cellulaire T spécifique du CMV. Depuis de nombreuses années, nous avons montré que les lymphocytes T $\gamma\delta$ V $\delta 2^{neg}$ sont impliqués dans le contrôle de l'infection à CMV. Le but de cette étude était d'évaluer si la cinétique des lymphocytes T $\gamma\delta$ V $\delta 2^{neg}$ pouvait prédire la résolution de l'infection à CMV chez les patients à haut risque : D+ R- et R+ avec thymoglobuline (R+/ATG), ou l'émergence d'une souche mutée.

Méthodes

La cinétique des lymphocytes T $\gamma\delta$ V $\delta 2^{neg}$ a été décrite chez des patients D+ R- et R+ /ATG, receveurs d'une greffe rénale entre 2003 et 2011. Cette cinétique a été comparée entre les patients infectés et non infectés et entre les patients avec et sans mutation. L'expansion des lymphocytes T $\gamma\delta$ V $\delta 2^{neg}$ a été estimée par un modèle linéaire mixte, le temps d'expansion a été défini comme étant la date de survenue de cette expansion depuis le début de l'infection.

Résultats

167 patients D+R- (93 avec infection et 74 sans infection) et 104 patients R+/ATG (74 avec infection et 30 sans infection) ont été inclus. L'expansion des lymphocytes T $\gamma\delta$ V $\delta 2^{neg}$ après une infection à CMV était comparable chez les patients D+ R- et R+/ATG. Le temps d'expansion des LT $\gamma\delta$ V $\delta 2^{neg}$ était fortement corrélé avec la durée de virémie et la résolution de l'infection ($r = 0,91$; $p < 0,0001$). Près de 90 % des patients ont eu une réponse virale soutenue avec virémies négatives dans les 30 jours suivant l'expansion. Le retard d'expansion des LT $\gamma\delta$ V $\delta 2^{neg}$ était étroitement associé à la présence d'une souche mutée ($p < 0,0007$). Cette mutation était prédite par la persistance d'une virémie positive 39 jours après l'expansion des LT $\gamma\delta$ V $\delta 2^{neg}$ T (AUC=0,77).

Conclusion

Chez les patients à haut risque, l'expansion des LT $\gamma\delta$ V $\delta 2^{neg}$ est lié à la résolution de l'infection à CMV. A l'inverse, le retard de l'expansion et la persistance d'une virémie positive après expansion sont prédictifs de la survenue d'une souche mutée. L'immunosurveillance des LT $\gamma\delta$ V $\delta 2^{neg}$ pourrait être utile lors de l'infection à CMV afin de prédire la résolution de l'infection et l'apparition d'une souche virale mutée.

Purpose

Cytomegalovirus (CMV) infection in solid organ transplantation is associated with increased morbidity and mortality, particularly in the case of the emergence of a CMV mutant strain with anti-viral drug resistance. In this situation, immune monitoring assays should provide relevant clinical information on efficient CMV-specific T cells response. For many years, we have shown that V $\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells are involved in the control of CMV infection. The purpose of this study was to assess if V $\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells kinetics can predict the resolution of CMV infection in high risk patients: D+R- and R+ with anti-thymocyte globulin (R+/ATG), or the emergence of a mutant strain.

Methods

V $\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells kinetics has been described in D+R- or R+/ATG kidney transplant recipients between 2003 and 2011. This kinetics was compared between infected and non infected patients and between patients with and without mutation. V $\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion was estimated by a linear mixed model, the time of expansion was defined as the date of occurrence of this expansion from the beginning of infection.

Results

167 patients D+R- (93 infected and 74 non-infected) and 104 R+/ATG (74 infected and 30 non-infected) patients were included. The V $\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion following CMV infection was comparable in D+R- and R+/ATG patients. Time of V $\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion was highly correlated with the duration of DNAemia and the resolution of infection ($r=0.91$, $p < 0.0001$). Almost 90% of patients had a sustained viral response with negative DNAemias within 30 days of expansion. The delay in V $\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion was closely associated with the presence of a mutant strain ($p < 0.0007$). This mutation was predicted by persistent DNAemias after 39 days of V $\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells expansion (AUC= 0.77).

Conclusion

In high risk patients, the rate of expansion of V $\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells is related to the resolution of CMV infection. Conversely, the delay of expansion and the persistence of DNAemias after expansion are predictive of the occurrence of a mutant strain. Monitoring V $\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ T cells could be useful during CMV infection in order to predict the resolution of the infection and the emergence of a mutant viral strain.