

# Université Bordeaux II Victor Segalen

Année 2013

Thèse n°2091

## THESE

pour le

### DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX II

**Mention : Sciences, Technologie, Santé**

**Option : Microbiologie-Immunologie**

**Présentée et soutenue publiquement**

*Le 22 novembre 2013*

*Par Thomas BACHELET*

*Né le 01/07/1980 à Alfortville*

## **Réponse des Lymphocytes T Gamma-Delta à Deux Complications de la Transplantation Rénale : Le Cytomégalovirus et Les Anticorps Spécifiques Du Donneur**

### **Membres du Jury**

Mr le Pr Nassim Kamar, PU-PH, Université Toulouse.....Président  
Mr le Dr Olivier Thauinat, PU, Université Lyon.....Rapporteur  
Mr le Dr Christophe Picard, DR, EFS Marseille.....Rapporteur  
Mr le Pr Jean-Luc Taupin, PU-PH, Université de Bordeaux.....Examinateur  
Mr le Pr Pierre Merville, PU-PH, Université de Bordeaux.....Examinateur  
Mr le Pr Jean-François Moreau, PU-PH, Université de Bordeaux.....Membre Invité  
Mme le Dr Julie Déchanet-Merville, DR, CNRS.....Directrice de Thèse

## REMERCIEMENTS

- ✓ Je remercie Julie Déchanet-Merville pour m’avoir accueilli au sein de son équipe et encadré pour ce travail.
  
- ✓ Je remercie Nassim Kamar, d’avoir accepté de présider ce jury.
  
- ✓ Je remercie Olivier Thaumat, d’avoir accepté de juger ce travail et de siéger dans ce jury.
  
- ✓ Je remercie Christophe Picard, d’avoir accepté de juger de travail et de siéger dans ce jury.
  
- ✓ Je remercie Jean-Luc Taupin, pour ses idées et son expertise créatrice.

## REMERCIEMENTS

- ✓ Je remercie Pierre Merville, de m'avoir intégré dans l'équipe et fait entrevoir la possibilité d'un exercice dynamique de la transplantation.
  
- ✓ Je remercie Jean-François Moreau, de m'avoir initié à l'immunologie.
  
- ✓ Je remercie Lionel Couzi et Vincent Pitard de m'avoir guidé et accompagné.
  
- ✓ Je remercie Chrytelle Harly du travail initié.
  
- ✓ Je remercie toute l'équipe  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> pour son enthousiasme, et plus particulièrement à Romain, Hannah, Anna, Camille, Sonia, Sophie, Myriam, Jonathan, Santiago, Benjamin et Xavier.
  
- ✓ Je remercie tous les membres du CIRID passés et présents pour ces années passées à vos côtés

## TABLE DE MATIERES

I.	TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	6
II.	PRINCIPALES ABBREVIATIONS.....	8
III.	INTRODUCTION.....	9
A.	RATIONNEL.....	10
B.	LE CMV.....	12
1.	Historique.....	12
2.	Virus.....	12
3.	Immunologie du CMV.....	15
4.	Evasion virale.....	20
5.	Diagnostic de l'infection à CMV.....	22
6.	Epidémiologie et manifestations du CMV.....	24
7.	Le CMV en transplantation d'organes solides.....	25
C.	Les Anticorps spécifiques du donneur (DSA).....	33
1.	Immunogénicité du système HLA.....	34
2.	Dépistage et Identification des DSA.....	34
3.	Phénotype du rejet à médiation humorale.....	42
4.	Histoire naturelle.....	45
5.	Thérapeutique.....	46
6.	Lésions de l'allogreffe.....	47
D.	Les lymphocytes T $\gamma\delta$ .....	48
1.	Génétique et Structure.....	48
2.	Ontogénie.....	51
3.	Les antigènes activateurs des TCR $\gamma\delta$ .....	54
4.	Tropisme tissulaire des lymphocytes T $\gamma\delta$ .....	62
5.	FONCTIONS DES LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$ .....	63
6.	Implication pathologique.....	64
E.	EphA2 et le couple Eph/ephrin récepteurs.....	68
1.	Généralités.....	68
2.	Implications physiologiques et physiopathologiques.....	69
3.	Signalisation bidirectionnelle du système Eph/ephrin et implication dans la tumorigénèse.....	70
4.	Modalités d'activation.....	71
5.	Eph/ephrin et fonctions immunes.....	73
F.	BIBLIOGRAPHIE INTRODUCTION.....	77
IV.	RESULTATS.....	105

A.	Article I : Effect of a CMV infection on the subsequent Banff phenotype. Highlighting the CMV-induced transplant vascular sclerosis in kidney allograft.....	106
B.	Article II : Kidney intragraft Donor-Specific Antibodies as determinant of antibody-mediated lesions and poor graft outcome.....	106
C.	Article III : Cytomegalovirus-responsive $\gamma\delta$ T cells: A novel cell effector in antibody-mediated microcirculation lesions. ....	106
D.	Article IV : Cytomegalovirus and Tumor stress surveillance by human V $\delta$ 1 $\gamma\delta$ -TCR binding to Ephrin Receptor A2.....	106
E.	Article V : Engagement of ephrins A1 and A4 on lymphocytes modulates T cell activation. ....	106
V.	CONCLUSIONS et PERSPECTIVES .....	223
VI.	CURRICULUM VITAE et TITRES ET TRAVAUX.....	231
VII.	SERVICES RENDUS .....	235
VIII.	ANNEXE.....	237

## I. TABLE DES ILLUSTRATIONS

### Figures

- Figure 1 : Structure du cytomegalovirus et particules virales en microscopie électronique.
- Figure 2. Modèle de virion des virus du groupe herpes et du cycle lytique de réplication virale.
- Figure 3. Modèle pour l'infection du CMV humain et de sa dissémination chez l'hôte.
- Figure 4. Partenaires impliqués dans les phases précoces de l'infection à CMV.
- Figure 5. Mécanismes de reconnaissance et d'activation de l'immunité innée par les herpesvirus.
- Figure 6. Représentation schématique de l'effet du CMV humain sur UPR.
- Figure 7. Représentation schématique de la réponse immune anti-CMV.
- Figure 8. Des protéines codées par le CMV humain sont capables de moduler la reconnaissance des cellules infectées par les cellules NK.
- Figure 9. Méthodes de mesure de la réponse cellulaire T spécifique du CMV.
- Figure 10. Effets directs et indirects de l'infection à cytomegalovirus après greffe rénale.
- Figure 11. Effet pro-angiogénique du CMV.
- Figure 12. Différents tests classiquement utilisés pour la détection des DSA.
- Figure 13. Méta-analyse de l'effet des DSA à J0 sur le risque d'AMR et de perte du greffon.
- Figure 14. Expérience bordelaise de l'impact des DSA préformés en fonction des résultats du FCXM.
- Figure 15. Phénotype des rejets à médiation humorale.
- Figure 16. Dualité d'action des anti-HLA sur la cellule endothéliale.
- Figure 17. Histoire naturelle de la détérioration de l'allogreffe médiée par les anticorps anti-donneur.
- Figure 18. Diversité potentielle des séquences d'acides aminés des récepteurs immuns.
- Figure 19. Distribution de la longueur des CDR3 de différentes chaînes de récepteurs immuns spécifiques d'antigène.
- Figure 20. La génération de cellules  $\gamma\delta$  T murines suit un développement programmé.
- Figure 21. Evolution des phénotypes naïfs dans différentes sous-populations lymphocytaires chez l'homme.
- Figure 22. Diagramme schématique des changements dans la diversité du répertoire au cours du développement chez l'homme.
- Figure 23. Changement dans la fréquence des sous-types de cellules  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2neg et V $\delta$ 2pos avec l'âge et l'infection à CMV.
- Figure 24. Représentation simplifiée du continuum de la protection immune et l'homéostasie des cellules T  $\gamma\delta$  entre les cellules NK innées et les cellules T  $\alpha\beta$  adaptatives.
- Figure 25. Axes moléculaires de l'interaction de l'épithélium avec les cellules immunes.
- Figure 26. Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  pourraient emprunter un chemin alternatif pour obtenir une large réponse immune systémique et contribuer à la surveillance lymphocytaire du stress.
- Figure 27. Récepteurs membranaires des cellules T  $\gamma\delta$ .
- Figure 28. Principales fonctions associées aux lymphocytes T  $\gamma\delta$ .
- Figure 29. Structure des Eph récepteurs et de leurs ligands les ephrins et interactions principales entre les différents Eph et ephrins.
- Figure 30. Suppression tumorale via la signalisation bidirectionnelle du couple Eph/ephrin.
- Figure 31. Effet protumoral du système Eph/ephrin.
- Figure 32. Modèle d'agrégation et d'activation des Eph récepteurs.
- Figure 33. Modélisation du transport membranaire des clusters d'EphA2-ephrinA1 par un test d'obstacle nanométrique.
- Figure 34. Exemples documentés d'adhésion ou de répulsion des leucocytes avec les cellules endothéliales médiées par le système Eph/ephrin.
- Figure 35. Expression lymphocytaire des ephrins.

## Tableaux

- Tableau 1. Protéines impliquées dans l'évasion immune par le CMV humain.
- Tableau 2. Avantages et inconvénients des différents tests d'immunomonitoring du CMV.
- Tableau 3. Aspects cliniques de l'infection à CMV chez l'homme.
- Tableau 4. Incidence (%) des infections et maladies à CMV à l'ère moderne, en fonction de la stratégie de prévention appliquée.
- Tableau 5. Scénarios cliniques potentiels et périodicité des différents tests d'immunomonitoring du CMV.
- Tableau 6. Mécanismes supposés de détérioration endothéliale et épithéliale médiée par le CMV.
- Tableau 7. Avantages et limites des tests Luminex SAFB.
- Tableau 8. Différentes études ayant évalué l'impact des DSA préformés.
- Tableau 9. Protocole de prise en charge à J0 de la transplantation rénale à Bordeaux.
- Tableau 10. Principales études ayant évalué l'incidence et l'impact des DSA de novo.
- Tableau 11. Classification histologique internationale de Banff d'analyse de biopsies de greffon rénales.
- Tableau 12. Différentes présentations des lésions à médiation humorale en pratique clinique.
- Tableau 13. Mécanismes supposés de détérioration endothéliale et épithéliale médiée par les DSA.
- Tableau 14. Différences entre les trois compartiments du système immunitaire adaptatif : lymphocytes T  $\alpha\beta$ , lymphocytes T  $\gamma\delta$  et lymphocytes B.
- Tableau 15. Exemples d'antigènes activateurs de TCR  $\gamma\delta$ .
- Tableau 16. Différentes situations pathologiques où l'implication des lymphocytes T  $\gamma\delta$  a été rapportée.
- Tableau 17. Différents cancers où les lymphocytes infiltrant les tumeurs comprenaient des lymphocytes T  $\gamma\delta$ .
- Tableau 18. Rôle physiologique et implication pathogénique décrite pour Eph/ephrin.

## II. PRINCIPALES ABBREVIATIONS

- ADCC : Cytotoxicité Dépendante de l'Anticorps
- AMR : Antibody Mediated Rejection (Rejet à Médiation Humorale)
- BOOP : Bronchiolite oblitérante (Bronchiolite Oblitérante)
- CAV : Cardiac Allograft Vasculopathy (Coronaropathie d'allogreffe)
- CDR : Complementary-Determining Region (Région Hypervariable)
- CMH : Complexe Majeur Histocompatibilité.
- CMI : Cell Mediated Immunity assay (test d'immunomonitoring cellulaire)
- CMV : Cytomégalovirus
- D/R : statut sérologique Donneur/Receveur
- DETC : Dendritic Epidermal T Cell (Cellule T  $\gamma\delta$  murines de l'épiderme)
- DSA : Anticorps Spécifiques du Donneur
- EphA2 : Erythropoietin-producing hepatocyte kinase
- eA : Ephrine A.
- Fc $\gamma$ RIIIA : Récepteur activateur au fragment Fc des immunoglobulines de type G (CD16)
- g : glomerulite
- GPI : glycosylphosphatidylinositol.
- HCV : Virus de l'Hépatite C
- HHV8 : Virus Herpes Humain 8
- HLA : Human Leukocyte Antigen
- HSPG : héparanes sulfates protéoglycanes
- IFTA : Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy (Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire).
- IL : Interleukine
- IKK : I $\kappa$ B kinase
- INF-I : Interféron de type I (INF-I).
- IRF : INF Regulatroy Factor
- IS : immunosuppression
- KIR : Récepteurs inhibiteurs des cellules NK
- KTR : Kidney Transplant Recipient (Receveurs de Transplant Rénal)
- MFI : Mean Fluorescence Intensity (Intensité Moyenne de Fluorescence)
- miRNAs : micro-ARNs
- NEMO : NF $\kappa$ B essential modulator
- NK : Natural Killer
- RE : réticulum endoplasmique
- RIG-I : retinoic acid-inducible gene I
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- ptc : capillarite péri-tubulaire
- TCR : Récepteur Cellulaire T
- TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
- TEMRA : T Effecteurs Mémoires à différenciation terminale avec réexpression du CD45RA
- TG : Transplant Glomerulopathy (Glomérulopathie d'allogreffe)
- TLR : Toll Like Receptor
- TOS : Transplantation d'Organe Solide
- TVS : Transplant Vascular Sclerosis (Vasculopathie du transplant)
- UPR : Unfolded Protein Response
- V-D-J : segments variables (V), de diversité (D), de jonction (J)
- XM : crossmatch

# III. INTRODUCTION

---

## A. RATIONNEL

La transplantation d'organe solide (TOS) est la stratégie de suppléance d'organes vitaux dysfonctionnels la plus performante. Les technologies alternatives de suppléance d'organe sont limitées à la phase aiguë pour le cœur, les poumons et le foie (cœur-assistance cardio-circulatoire, poumons-assistance ventilatoire, membranes d'oxygénation extracorporelle ECMO, foie- système de détoxification des protéines liées à l'albumine type MARS® Molecular Adsorbents Recirculating System), ou moins efficace au long cours pour prévenir la mortalité pour le rein (dialyse chronique) (Wolfe et al., 1999). Depuis la première transplantation rénale réalisée chez l'homme en 1952 (Kreis et al., 2013), la compréhension des phénomènes immunologiques mis en jeu -identification des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (Dausset et al., 1965); reconnaissance du rôle des anticorps dirigés contre le donneur (Kissmeyer-Nielsen et al., 1966)- a permis de systématiser la prise en charge de ces malades autour du maniement de molécules suppressives du système immunitaire. Au-delà de la performance chirurgicale que représente l'implantation d'un organe vascularisé, c'est bien le maintien d'une immunosuppression prolongée qui permet de conserver fonctionnel un allogreffeon d'organe solide. Du fait du nombre de transplantations réalisées et du nombre de patients suivis, la prise en charge en transplantation rénale est à l'avant-garde des évolutions du domaine. De façon générale, les stratégies thérapeutiques des dernières années ont conduit au renforcement de la pression immunosuppressive, ciblant principalement la réponse cellulaire (Meier-Kriesche et al., 2006). L'analyse de cette évolution est nécessaire (Lamb et al., 2011) : pour, améliorer nos pratiques d'une part ; et pour comprendre les futurs enjeux de recherche transversale de la discipline, d'autre part.

La diminution du taux de rejets aigus dans la 1<sup>ère</sup> année, au profit de rejets aigus persistants plus sévères sans amélioration de la survie à long terme ont permis de réévaluer l'importance de la réponse allogénique humorale (Einecke et al., 2009; El-Zoghby et al., 2009; Gaston et al., 2010), moins bien contrôlée par les immunosuppresseurs actuellement utilisés (anticalcineurines, antimétabolites de type anti purine et corticostéroïdes). Les anticorps dirigés contre le donneur, notamment contre les molécules du système HLA du donneur (DSA) s'avèrent jouer un rôle essentiel dans la détérioration aiguë ou progressive du greffeon (Jeannet et al., 1970; Lee et al., 2002; Terasaki et al., 2007).

Dans le même temps, la pression immunosuppressive expose les patients à deux types de complications majeures : infectieuses et néoplasiques. La complication infectieuse la plus fréquente est l'infection à cytomégalovirus (CMV) qui s'associe à une morbi-mortalité significative (Sagedal et al., 2004). Quant au risque de cancers, il est entre 2,5 et 4 fois plus important que chez des patients non soumis à un traitement immunosuppresseur au long cours (Engels et al., 2013; Zafar et al., 2008).

Forts de ces pistes de réflexion, nous avons identifié deux contributeurs majeurs à la détérioration du greffeon susceptibles d'impacter la transplantation à l'ère moderne: DSA et CMV. Dans le déroulement de l'introduction, nous verrons comment ils interagissent avec les cellules stromales d'interface que sont les cellules endothéliales et les cellules épithéliales. L'intégrité de ces deux interfaces est corrélée au maintien de la fonction de l'organe. L'agression par le CMV ou les DSA induit une palette de réponses allant de la lyse cellulaire à la modification de la biologie cellulaire. L'intégration des différents signaux d'agression/de danger (Matzinger, 2002) par ces deux types cellulaires et la réponse qu'ils y apportent est déterminante dans la génération du processus de détérioration terminale de l'organe. La particularité de la transplantation rénale est qu'elle leur associe la pression de la réponse cellulaire allogénique.

Dans le cadre du travail réalisé pour cette thèse, nous étudierons d'abord l'implication du CMV et des DSA dans l'histopathogénie du transplant rénal, selon deux axes originaux.

Nous nous concentrerons ensuite sur un acteur particulier de l'immunité cellulaire, un sous-groupe lymphocytaire T: le lymphocyte T  $\gamma\delta$ . Il s'agit de cellules d'interface intervenant dans une immunité de type transitionnelle associant propriétés innées et adaptatives (Bonneville et al., 2010). Elles représentent un paradigme immunologique intéressant: censeurs du stress cellulaire elles sont capables d'interpréter les signatures de soi dérégulé au niveau endothélial et épithélial à la phase afférente de la réponse immunologique; hautement réactives et différenciées, elles sont également susceptibles d'intervenir à la phase effectrice de la réponse immunologique et dans le maintien de l'intégrité tissulaire (Vantourout and Hayday, 2013). Des efforts considérables ont été réalisés au cours des dernières années pour comprendre la spécificité antigénique des lymphocytes T  $\gamma\delta$  et leur contribution aux réponses immunitaires.

Le groupe de Julie Déchanet-Merville a montré qu'un sous-groupe de lymphocytes T  $\gamma\delta$  (les LT  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{\text{neg}}$ ) était impliqué dans la réponse dirigée contre le CMV, a fortiori dans un contexte de déficit de l'immunité cellulaire T  $\alpha\beta$  (Dechanet et al., 1999b). Ces lymphocytes T  $\gamma\delta$  induits par le CMV sont capables, par leur TCR, de reconnaître à la surface des cellules infectées ou tumorales des antigènes endogènes communs induits par le stress (Halary et al., 2005). En plus de proposer un stimulus antigénique chronique, la transplantation rénale et l'immunosuppression prolongée qu'elle implique offrent ces conditions.

Nous verrons qu'en cherchant à caractériser leur bioréactivité, un nouvel antigène de TCR  $\gamma\delta$  a pu être identifié: EphA2. Il s'agit d'un récepteur à activité tyrosine kinase largement exprimé, qui possède de nombreuses propriétés physiologiques mais a en plus la particularité d'être impliqué lui aussi dans le maintien de l'intégrité épithéliale (Pasquale, 2010). Dans la partie introductive, nous reviendrons sur les caractéristiques de cette molécule et de ses ligands naturels (système des éphrines-ephrin). Dans le travail supportant cette thèse, nous tenterons de caractériser son rôle immunologique dans la réponse T.

Enfin, nous montrerons comment les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{\text{neg}}$  pourraient participer à la phase effectrice de la réponse allogénique en faisant le lien entre CMV et DSA via un mécanisme de lyse dépendante de l'anticorps (ADCC) impliquant le CD16.

## B. LE CMV

### 1. Historique

Les modifications cellulaires caractéristiques de l'infection par le CMV humain (CMV), (élargissement de la cellule et présence d'inclusions intranucléaires), ont d'abord été observées dans les tissus de nouveau-nés atteints et ont conduit à désigner cette affection du nom de maladie des inclusions cytomégaliqes (Ribbert, Jesionek, 1881) (Riley, 1997). L'origine virale de cette cytomégalie a été suspectée en 1921 (Goodpasture) et établie de façon indépendante par trois équipes différentes en 1956 (Smith, 1956) (Rowe et al., 1956) (Craig et al., 1957). Le nom de « cytomégalovirus » a été proposé en 1960 par l'équipe de Weller pour désigner le « virus des glandes salivaires » compte tenu des conditions initiales de son identification (Weller, 1971a; Weller, 1971b).

### 2. Virus

Le CMV humain (HHV5 sous famille  $\beta$ ) a le génome le plus important des virus du groupe herpes avec environ 235 kilobases codant 165 gènes. Le virion est composé d'ADN viral linéaire double brin, associé aux protéines spermine et spermidine pour former le core, contenu dans une nucléocapside icosaédrique, et entouré d'une matrice appelée tégment. Il s'agit d'un virus enveloppé d'une bicouche lipidique dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines du virus ( $\geq 11$ ). La taille des virions matures varie entre 200 et 300 nm. Les protéines du tégment 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 tégment constitutives à elles seules de 35% de la masse protéique de la particule : pp65 (ppUL83) et pp150 (ppUL32). Les protéines de l'enveloppe sont impliquées dans les phénomènes d'attachement et de pénétration du virus ; elles sont aussi les cibles des anticorps neutralisants (Crough and Khanna, 2009).

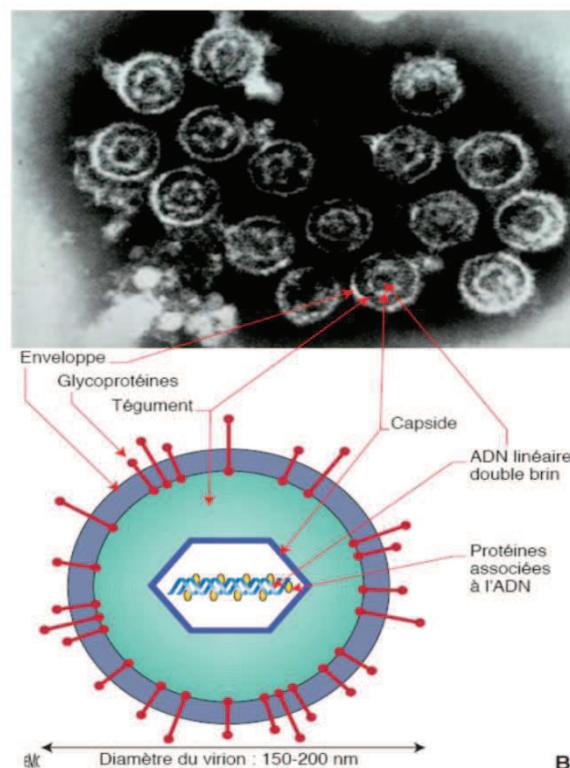


Figure 1 : Structure du cytomégalovirus et particules virales en microscopie électronique, d'après Mazon MC et al, EMC 2009 (Mazon et al., 2009)

Après pénétration du virus dans sa cellule cible, une infection productive comporte trois phases (Figure). La phase très précoce (IE *immediate early*) survient dans les deux premières heures et comporte la synthèse de facteurs de transcription très précoce (IE1 et IE2 notamment) qui coordonnent les étapes de la phase précoce (E *early*) dans les 24 premières heures suivant l'infection, conduisant à la synthèse d'une ADN polymérase virale fonctionnelle, permettant la synthèse de l'ADN viral, et de certaines protéines du tégument (pp65, pp52). Puis vient la phase tardive (L *late*) et la synthèse des protéines structurales (gB, gH). Le cycle de réplication du CMV est lent ; dans des fibroblastes humains infectés, la libération des nouveaux virions commence au mieux après 48 à 72h. La quantité libérée est maximale à partir de 72 à 96 heures. Plusieurs milliers de copies de génomes sont produits dans la cellule infectée et les virions sont libérés sur une période de 24 à 48 heures (Penfold and Mocarski, 1997). La cellule peut mourir après 4 ou 5 jours.

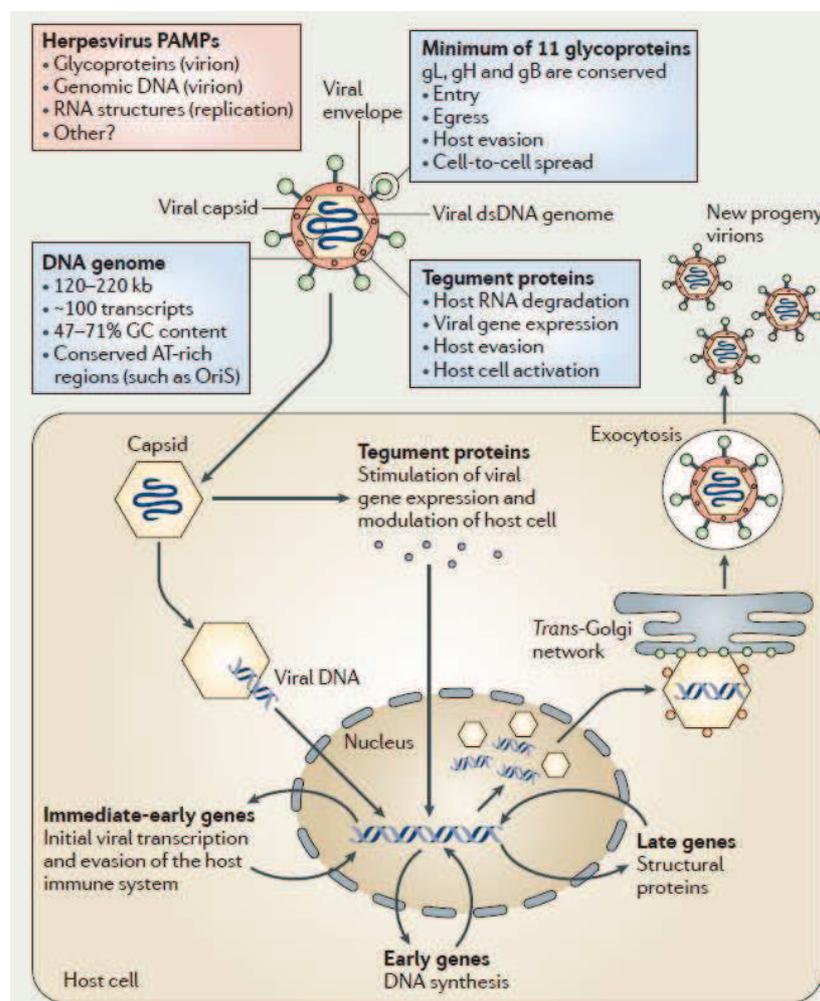
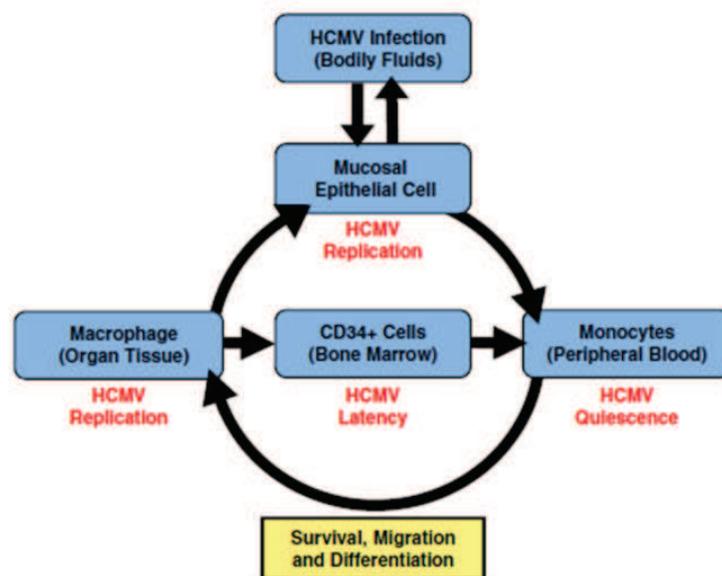


Figure 2. Modèle de virion des virus du groupe herpes et du cycle lytique de réplication virale (Paludan et al., 2011).

Il a été montré qu'un quart seulement du génome est consacré à la réplication virale (Dunn et al., 2003). Le reste du génome permet au virus d'échapper au contrôle du système immunitaire et de développer également un mode d'infection originale : après une primo-infection, il a la capacité d'entrer en phase de latence (présence d'ADN viral en l'absence d'expression protéique), entrecoupée de phases de réactivations (infection active productive). Les mécanismes de la latence sont mal connus (l'implication de miRNA codés par le virus répresseurs des gènes de la phase très précoce est

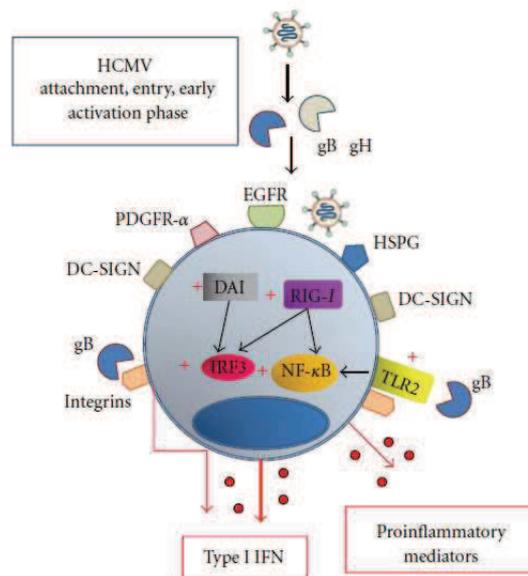
suggérée) et cette capacité d'hébergement du virus n'a été clairement démontrée que pour les monocytes du sang périphérique (environ 1 monocyte sur 10000 infecté de façon latente chez l'individu sain) et les progéniteurs CD34+ de la moelle osseuse. La réactivation survient probablement de façon périodique et asymptomatique chez le sujet immunocompétent, mais aussi classiquement à la faveur d'une immunosuppression, d'une co-infection, d'un stress, d'une inflammation. L'illustration clinique de cette réactivation a récemment été démontrée chez les patients hospitalisés en réanimation (Limaye et al., 2008). On sait aussi depuis longtemps que la stimulation allogénique des cellules mononuclées du sang favorise la réactivation du CMV (Soderberg-Naucler et al., 1997b). Un des médiateurs clés de cette réactivation est le TNF- $\alpha$  qui après avoir engagé son récepteur, active la Protéine Kinase C et le NF- $\kappa$ B pour entraîner la transcription des gènes IE du CMV et déclencher sa réplication (Docke et al., 1994; Soderberg-Naucler et al., 1997a).

Le CMV peut infecter une large gamme de cellules de l'hôte, comprenant à la fois des cellules parenchymateuses des cellules de tissus conjonctif et celles de n'importe quel organe ainsi que la plupart des cellules hématopoïétiques. Les souches virales de laboratoire présentent souvent des restrictions spécifiques à certains types cellulaires in vitro (principalement dépendantes de l'altération du locus UL128-131 et les protéines de pénétration virale). In vivo, les cellules épithéliales, endothéliales, fibroblastiques musculaires lisses sont les principales cibles de l'infection (Sinzger et al., 2008). Selon toute vraisemblance, la transmission inter-individuelle est basée sur l'infection du système épithélial et la dissémination de l'infection vers les cellules endothéliales et hématopoïétiques (Smith et al., 2004). La modulation du système monocytaire et son utilisation comme véhicule de dissémination virale a récemment été documentée (Nogalski et al., 2011).



**Figure 3. Modèle pour l'infection du CMV humain et de sa dissémination chez l'hôte** (Nogalski et al., 2011). Les cellules épithéliales de l'hôte sont infectées par le CMV contenu dans les fluides corporels. Le CMV se réplique ensuite et diffuse aux monocytes du sang périphérique par un mécanisme inconnu, où il apparaît établir une infection dite quiescente. Il a été suggéré que l'infection primaire des monocytes induit leur migration dans les tissus des différents organes, ainsi que leur survie et leur différenciation en macrophages à longue durée de vie, qui restent permissifs à la réplication virale. Ces macrophages peuvent devenir des sites de persistance de l'infection à CMV dans les tissus de l'hôte. Il a aussi été suggéré que les macrophages induits par l'infection à CMV pouvaient migrer dans la moelle osseuse et infecter les progéniteurs myéloïdes CD34+, également considérés comme des sites de latence du virus.

Dans les dix dernières années, des progrès notables ont été effectués dans la compréhension des modifications cellulaires associées aux phases précoces de l'infection ; de l'attachement, de l'entrée et des phases intracellulaires du cycle viral (Boehme et al., 2006; Halary et al., 2002; Nogalski et al., 2011; Soroceanu et al., 2008; Wang et al., 2005; Wang et al., 2003). Par ses différents récepteurs, le CMV génère au niveau des monocytes un « signalsome » qui lui permet d'utiliser ces cellules comme véhicule de dissémination (Chan et al., 2009; Nogalski et al., 2011; Nogalski et al., 2013).



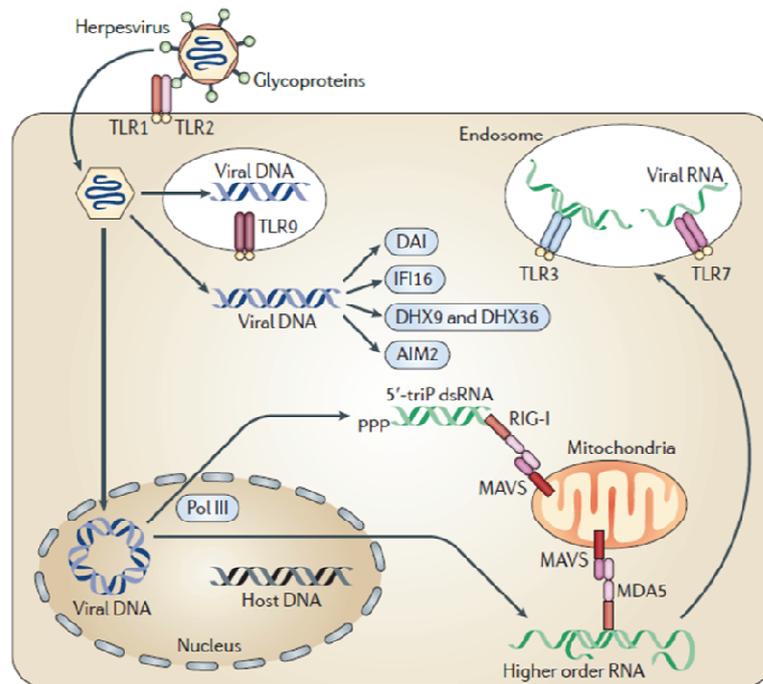
**Figure 4. Partenaires impliqués dans les phases précoces de l'infection à CMV** (Rossini et al., 2013). Les glycoprotéines d'enveloppe (notamment gB) interagissent avec différents récepteurs porteurs d'une activité enzymatique intrinsèque: EGFR-Epithelial Growth Factor Receptor; PDGFR Platelet Derived Growth Factor Receptor, Intégrines (alphavbeta3), DC-SIGN et la paxilline une molécule de la famille des HSPG (héparanes sulfates protéoglycanes) en plus d'interagir avec les senseurs de l'immunité innée à l'origine de l'induction d'Interféron de type I (INF-I).

### 3. Immunologie du CMV

#### a) *Reconnaissance du CMV par l'immunité innée comme un signal de danger*

Un gros travail a également été effectué sur les différents mécanismes de l'immunité innée impliqués dans la reconnaissance des motifs associés aux pathogènes dans le cadre du CMV. Les travaux pionniers sur ce thème (deuxième moitié des années 90) et le lien avec les Toll Like Receptor (TLR) ont valu à Beutler, Steinman et Hoffman le prix Nobel de médecine en 2011. Depuis, les agents cellulaires identifiés se sont multipliés et la mécanistique d'activation des cytokines proinflammatoires étayées (notamment de la voie interféron de type I ; voir Paludan pour revue sur les virus du groupe herpes (Paludan et al., 2011)). Pour le CMV, ont été retrouvés impliqués les TLR (Boehme et al., 2006) (Tabeta et al., 2004), les activateurs cytosoliques des IRF (INF Regulatroy Factor) dépendant de l'ADN ou DAI (DeFilippis et al., 2010) ou l'inflammasome via l'adaptateur AIM2 -Absent in Melanoma, uniquement pour l'infection à CMV murin toutefois (Rathinam et al., 2010). Ces mécanismes ont été principalement décrits pour les cellules du système immunitaire mais leur mise en œuvre dans d'autres types cellulaires est documentée (Marques and Boneca, 2011).

La mise en jeu des mécanismes intracellulaires de l'immunité « intrinsèque » est également susceptible d'intervenir dans les suites de l'infection au CMV (Bieniasz, 2004).



Response	Pattern recognition receptor									
	TLR2	TLR3	TLR7	TLR9	DAI	IFI16	AIM2	DHX9 and DHX36	RIG-I	MDA5
1°	Cytokines	Type I IFN	Caspase 1	Type I IFN	Type I IFN	Type I IFN				
2°	Type I IFN	Cytokines	Cytokines	Cytokines		Cytokines		Cytokines	Cytokines	Cytokines
3°									Caspase 1	

**Figure 5. Mécanismes de reconnaissance et d'activation de l'immunité innée par les herpesvirus** (Paludan et al., 2011).

a | Les virions d'herpes sont "perçus" par le récepteur TLR2 (Toll-like receptor 2), qui détecte probablement les glycoprotéines virales et induit l'expression de cytokines proinflammatoires, en particulier les interférons de type I. L'ADN génomique est détecté par le récepteur TLR9 dans les endosomes, et par les activateurs dépendants de l'ADN des facteurs de régulation de l'INF (DAI), la DEAH box protein 9 (DHX9) et DHX36, la protéine AIM2 (absent dans le melanome 2) et la protéine 16 induite par l'INF- $\gamma$  dans le cytoplasme. Les systèmes Pol III (RNA polymérase III) et RIG-I (retinoïc acid-inducible gene I) peuvent détecter l'ADN soit dans le noyau, soit dans le cytoplasme. La réplication productive d'herpesvirus conduit à l'accumulation d'espèces d'ARNs, avec des niveaux d'organisation variable. Ces ARNs sont détectés soit dans le cytoplasme par la protéine MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5), soit dans les endosomes par TLR3 et TLR7.

b | Les mécanismes de détection de l'ADN intracellulaire conduisent ensemble à l'expression de cytokines, y compris des INF de type de I et à l'activation de l'inflammasome. Les réponses à la détection des ARNs comprennent la production d'INFs et d'autres cytokines. Les niveaux de réponse 1°, 2° and 3° indiquent une proposition de l'importance relative des différents événements en aval de l'activation des récepteurs de reconnaissance aux pathogènes (PRRs). MAVS, mitochondrial antiviral signalling protein.

La réponse cellulaire au stress imposée par l'infection virale passe par les mécanismes stéréotypés d'induction du stress du réticulum endoplasmique (RE), de la stimulation du protéasome, et de l'autophagie. Il a été montré que le CMV était capable de réguler séquentiellement et extrêmement finement ces différents mécanismes ((Alwine, 2008) (Cavignac and Esclatine, 2010) pour revues) à son propre compte. La finalité du virus est toujours double : privilégier les voies métaboliques intervenant dans sa réplication et éteindre les voies impliquées dans la réponse antivirale (cf infra – échappement viral). Ceci peut être illustré par deux exemples : le premier, repris dans la figure suivante qui montre l'activation du stress du RE mais la régulation par le virus de la réponse UPR (Unfolded Protein Response) afin notamment de maintenir la traduction des protéines virales (Isler et

al., 2005; Stahl et al., 2013). Le second renvoie à une publication récente qui démontre comment le CMV, dans un modèle murin, redirige la protéine NEMO (pour NFκB essential modulator), le régulateur du complexe inhibiteur IKK (IκB kinase) vers les autophagosomes pour dégradation dans les lysosomes. Le résultat net est le maintien de l'activité d'IKK et la diminution de la réponse inflammatoire aux TLR et à l'IL1 passant par NFκB (Fliss et al., 2012).

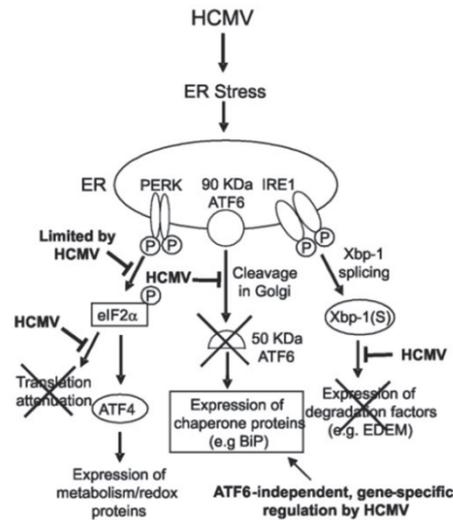


Figure 6. Représentation schématique de l'effet du CMV humain sur UPR (Isler et al., 2005)

### b) Réponse de l'immunité adaptative

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). Leur description détaillée va au-delà des objectifs de ce chapitre mais est résumée dans la figure ci-dessous (figure 7).

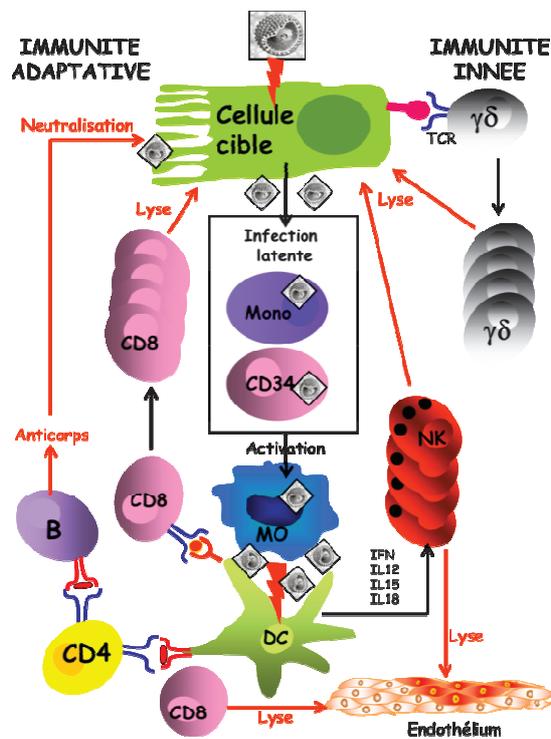


Figure 7. Représentation schématique de la réponse immune anti-CMV

Comme on l'a vu, la primo-infection par le CMV chez les individus sains se traduit classiquement 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. Lors de la mise en place de la phase de latence dans les monocytes, l'expression de gènes viraux est limitée, diminuant ainsi leur reconnaissance par les cellules effectrices. La différenciation de ces monocytes infectés par le CMV en macrophages (par l'action de facteurs pro-inflammatoires type TNF- $\alpha$  par exemple) peut initier une infection productive. Les particules virales sont alors apprêtées par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Les cellules dendritiques font ce lien vers l'immunité adaptative en réalisant la synthèse des différents signaux en un signal immunogène qui pourra être schématiquement présenté au niveau des organes lymphoïdes secondaires après leur migration et maturation. Durant cette phase afférente de la réponse immune, un rôle particulier a été décrit pour les cellules dendritiques plasmacytoïdes qui sont capables de générer de l'IL-12 et de l'INF- $\alpha$  en réponse au CMV. Survient ensuite la stimulation spécifique des cellules T, CD8 et CD4, et des cellules B, permettant la génération d'anticorps neutralisants (décrits pour la première fois en 1976 (Keller et al., 1976) et utilisés pour le diagnostic sérologique).

Le rôle essentiel des lymphocytes T dans le contrôle de l'infection à cytomégalovirus est connu depuis longtemps (Quinnan and Manischewitz, 1979; Quinnan et al., 1978). Il existe une redondance entre les différents acteurs de l'immunité cellulaire qui peuvent se substituer l'un à l'autre pour contrôler le virus. Chez la souris, la déplétion seule en lymphocytes T CD8+ n'est pas suffisante pour entraîner la réactivation d'une infection à CMV (Jonjic et al., 1990). En revanche, en l'absence de cellules NK, la déplétion en lymphocytes T CD8+ entraîne de façon quasi-systématique une réactivation du CMV dans les glandes salivaires et les poumons des souris, alors que la déplétion en lymphocytes T CD4+ entraîne une infection dans seulement 25% des cas (Polic et al., 1998). Au sein de l'immunité adaptative, le lymphocyte T CD8+ occupe donc une place centrale et majeure dans le contrôle de cette infection. Chez l'homme, le transfert adoptif de lymphocytes T CD8+ spécifique du CMV permet de contrôler des infections actives à CMV, en particulier chez les patients ayant reçu une allogreffe de moelle. Ces expériences de thérapies cellulaires démontrent clairement et directement le rôle fondamental du lymphocyte T CD8+ dans l'immunologie adaptative anti-CMV (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995; Cobbold et al., 2005). Ce type de traitement est aussi en train d'émerger en transplantation d'organe solide chez les patients résistants aux anti-viraux (Brestrich et al., 2009). Chez l'homme, après une primo-infection à CMV, les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8+ spécifiques du virus sont détectés dans le sang environ 20 jours après l'apparition de la virémie chez les patients transplantés rénaux (Gamadia et al., 2003) alors que les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD4+ producteurs d'interféron- $\gamma$  sont détectés plus précocement, 7 à 10 jours après la virémie, chez les patient transplantés rénaux asymptomatiques (Rentenaar et al., 2000). Ces cellules T CD4+ spécifiques du CMV précèdent dans ce cas-là l'apparition des immunoglobulines de type G anti-CMV. L'analyse phénotypique chez les individus infectés des lymphocytes T  $\alpha\beta$  spécifiques du CMV révèle cette particularité du CMV d'induire une empreinte immunophénotypique de cellules T effectrices mémoires conservant l'expression du CD45RA et à fort potentiel cytotoxique (phénotype TEMRA) (Kuijpers et al., 2003; van Leeuwen et al., 2002; van de Berg et al., 2008). Ces cellules spécifiques du CMV représentent une part importante du pool total des cellules T mémoires chez un individu séropositif pour le CMV : 10% des sujets jeunes et jusqu'à 40% des sujets âgés (Sylwester et al., 2005). Leur persistance a fait travailler sur le concept d'inflation mémorielle de la réponse immune (Snyder et al., 2008), en réponse à un stimulus antigénique chronique (Appay et al., 2002) (persistance du virus et phases de réactivation intermittente) au dépens de la capacité à initier de nouvelles réponses immunes (Messaoudi et al., 2004). Ces concepts de restriction de répertoire sont à la base de l'immunosénescence associée au virus (Koch et al., 2007).

### *c) Réponse immune cellulaire non conventionnelle*

Parallèlement à cette réponse conventionnelle, une réponse cellulaire basée sur les cellules NK et les cellules T  $\gamma\delta$  a également été largement rapportée.

#### **(1) Cellules NK :**

Chez l'homme les démonstrations d'un rôle protecteur des cellules NK dans la réponse anti-CMV sont minces, même si un papier du groupe de C Biron a rapporté qu'un déficit constitutionnel en NK prédispose aux infections virales du groupe herpes (Biron et al., 1989). En revanche, Les modèles murins ont montré (i) un rôle supplétif non redondant dans des modèles d'infection virale pour ces cellules (Welsh et al., 1991) ; (ii) que le transfert adoptif de NK garantie une immunité protectrice anti CMV (Bukowski et al., 1985) (iii) et que ces cellules sont capables d'ADCC (Quinnan and Manischewitz, 1979). Plus récemment, il a été rapporté des propriétés de cellules mémoires pour ces cellules NK (Sun et al., 2009) ainsi qu'un rôle dans l'organisation de la réponse T spécifique en guidant la contraction de la réponse immune spécifique (Waggoner et al., 2011). Chez l'homme, ils possèdent également des propriétés antivirales, qui nécessite la présence d'IL2 et IL15 (Lang et al., 2004). Après infection chez certains patients TOS explorés, le nombre de cellules circulantes pourrait chuter (Fildes et al., 2008). Il a également été rapporté que le matching KIR, et le nombre de KIR activateurs de l'haplotype B, en particulier dans leur portion télomérique était associée à moins de survenue d'infection à CMV (Stern et al., 2008; Stern et al., 2011). La même équipe a enregistré l'expression des récepteurs activateurs NKG2D et NKG2C au cours de l'infection (Hadaya et al., 2008), confirmant les données avancées par le groupe de Lopez-Botet sur l'impact du CMV sur le répertoire NK (Guma et al., 2004; Guma et al., 2006) et son impact fonctionnel sur la réponse anti virale (Muntasell et al., 2010; Magri et al., 2011).

#### **(2) Cellules T $\gamma\delta$ :**

##### **(a) Implication de lymphocytes T $\gamma\delta$ V $\delta$ 2<sup>neg</sup> hautement différenciés dans l'infection à CMV**

Le groupe de Julie Déchanet Merville a montré l'implication spécifique du sous type de lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> dans la réponse anti CMV. L'observation princeps a été faite chez des patients transplantés rénaux (Dechanet et al., 1999a; Dechanet et al., 1999b). L'infection par le CMV est associée à une expansion oligoclonale (restriction de distribution de la taille des CDR3 des chaînes V $\delta$ 1 et V $\delta$ 3 et présence de motifs répétés dans les régions jonctionnelles des chaînes V $\delta$ 1) significative (jusqu'à 40% du pool des lymphocytes T CD3+) persistante et spécifique du CMV, de cellules T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup>, suggérant une expansion dirigée par le virus. Ces lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> sont de phénotype effecteur mémoire avec réexpression du CD45RA-TEMRA, expriment des récepteurs aux chemokines de homing intestinal, expriment des récepteurs NK de type KIR et NCR et expriment le récepteur activateur du fragment Fc des immunoglobulines (Fc $\gamma$ RIIIA) leur conférant une capacité d'ADCC (Couzi et al., 2012b; Halary et al., 2005). En plus d'un phénotype effecteur, ils partagent avec les lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8+ spécifiques du virus une cinétique d'expansion similaire (Couzi et al., 2009). Cette forte association entre le CMV et les LT  $\gamma\delta$  a aussi été confirmée dans d'autres contextes où l'immunité cellulaire T est déficiente (nouveaux nés (Vermijlen et al., 2010), enfants immunodéficients (Ehl et al., 2005) (de Villartay et al., 2005), autres transplantés d'organes solides (Couzi et al., 2011b) (Puig-Pey et al., 2010), greffés de moelle (Knight et al., 2010) (Scheper et al., 2013), femmes enceintes (Fornara et al., 2011)), et retrouvée chez les sujets sains séropositifs (Pitard et al., 2008) (Roux et al., 2013).

## (b) Fonction antivirale pour les lymphocytes T $\gamma\delta$ $V\delta 2^{neg}$

En plus de leur association avec l'infection virale, leur expansion est étroitement associée à la résolution de l'infection (Lafarge et al., 2001), suggérant une fonction antivirale pour ces cellules : le délai de l'expansion des LT  $\gamma\delta$  est corrélée à la durée de virémie avec une concomitance entre l'expansion et la négativation de la PCR. Inversement, le retard d'expansion et l'absence de clairance virale après expansion est prédictif de la survenue d'une résistance aux traitements anti-viraux (Kaminski et al., 2012). En faveur d'un rôle spécifique antiviral pour ces cellules, il a pu aussi être montré que des clones T  $\gamma\delta$  isolés à partir des transplantés ayant développé une infection à CMV s'activent en présence de fibroblastes infectés par le CMV, les tuent et inhibent la réplication virale *in vitro* de façon TCR dépendante (Halary et al., 2005). En outre, grâce à leur expression de CD16 ils reconnaissent du virus recouvert d'anticorps anti-CMV (complexes immuns) ce qui induit leur production d'IFN $\gamma$ , également capable d'inhiber la réplication virale (Couzi et al., 2012b). Ces données sont appuyées par quelques modèles expérimentaux d'infection à CMV, où il semble exister une réponse T  $\gamma\delta$  (massive au niveau des glandes salivaires (Cavanaugh et al., 2003)), avec des capacités antivirales dépendantes de l'IL-12 (Dyugovskaya et al., 2003a) (Ninomiya et al., 2000). Un modèle murin de souris immunodéficientes pour le CD3, le TCR  $\alpha\beta$  et le TCR  $\gamma\delta$  a permis à l'équipe de confirmer le rôle des lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans l'infection par le MCMV (Capone et al., 2012). Ces résultats pris dans leur ensemble suggèrent bien un rôle antiviral pour ces lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\delta 2^{neg}$ . Une des explications possibles pour la « révélation » de ce rôle à la faveur de ces contextes d'immunosuppression peut être trouvée dans un modèle où la lymphopénie lève la régulation homéostatique des lymphocytes T  $\gamma\delta$  en supprimant la compétition pour l'IL-15 (French et al., 2005) (Do and Min, 2009). Il est intéressant de mentionner que ces cellules présentent un phénotype assez diversifié avec une réponse spécifique dépendante du TCR, ce qui sous-tend que la réponse immunologique qu'ils conduisent contre le virus est finalement assez proche d'une réponse adaptative classique de type T  $\alpha\beta$ .

### 4. Evasion virale

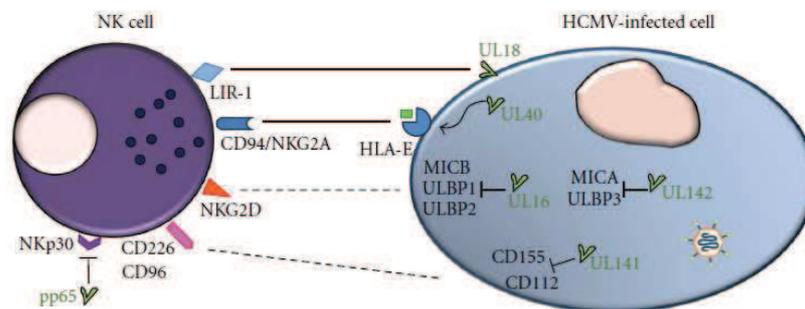
Le CMV est donc sous haute surveillance immunologique. L'étendue de l'arsenal spécifique à disposition est en conflit apparent avec le concept général que le CMV (homme ou animal) est « maître » de l'évasion immune. Ces systèmes d'évasion détenus par le virus (d'évitement ou d'atténuation de la réponse immune innée ou adaptative) se sont sophistiqués au cours de la coévolution avec ses hôtes et du degré de complexification des outils de défenses. Le résultat est un état d'équilibre dynamique tel qu'il peut être observé à la phase de latence de l'infection. Toutefois, toute situation aboutissant à une diminution des mécanismes de contrôle (tel qu'il est rencontré en transplantation) expose à une rupture de cet équilibre et à la reprise d'une infection virale active. La caractérisation de ces stratégies d'évasion a fortement progressé durant ces dernières années. Leur description dépasse le cadre de ce travail (voir revues (Crough and Khanna, 2009) (Freeman, 2009)). On retiendra que le virus parvient à imprimer une succession de modifications à tous les étages du système immunitaire, visant toutes à diminuer son efficacité globale. Un effort tout particulier est adressé sur la diminution de l'expression des protéines de présentation antigénique (via la synthèse de plusieurs protéines virales spécifiques ; les vRAP viral regulators of antigens presentation (Lemmermann et al., 2012)). Les principales protéines du CMV impliquées dans ces mécanismes d'évasion sont reprises dans le tableau ci-dessous (tableau 1). Un exemple de l'immunorégulation des NK par les protéines du virus sert également d'illustration (figure 8). On peut remarquer que la plupart des mécanismes d'évasion immune rapportés n'affectent pas la réponse T  $\gamma\delta$  ; ce qui pourrait expliquer la redondance du système immunitaire pour faire face au CMV et l'intérêt de ces cellules

non classiques pour maintenir l'efficacité de la réponse anti CMV, en surmontant les différents mécanismes d'évasion mis en jeu.

*a) Mécanismes d'évasion protéique*

Protéines impliquées dans l'Evasion Immune par le CMV humain	
Protéine virale	Fonction
gpTRL11	Sert de récepteur viral au fragment constant Fc des immunoglobulines et bloque l'ADCC.
gpUL16	Lie les molécules MHC non classiques (MICB, ULBP1, ULBP2) et bloque l'interaction avec NKG2D.
gpUL18	Lie LIR1 et interfère avec la reconnaissance NK; agit aussi comme ligand d'HLA-G (Rôle in utero ?).
pgUL20	Inhibe la réponse cellulaire T.
gpUL27	Récepteur de chemokines, supposé moduler les effets des interférons I et II.
gpUL33	Récepteur de chemokine "orphelin"; pourrait être important dans la dissémination virale.
gpUL40	Code un peptide se liant à HLA-E et interfère avec la reconnaissance NK.
gpUL78	Récepteur de chemokine "orphelin"; pourrait être important dans la dissémination virale.
gpUL83	Inhibe l'apprêtement d'IE-1 dans le protéasome.
gpUL111a	Analogue de l'IL-10 humaine; inhibe l'expression des molécules MHC I/II et la prolifération des lymphocytes.
gpUL118	Récepteur au fragment Fc des immunoglobulines G; fonction non définie.
gpUL144	Homologue du récepteur au TNF, fonction non définie.
gpUL146	Chémokine IL-8 like puissante (CXC-1 virale); induit le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles.
gpUS2,3,6,10 et 11	Inhibent l'expression de MHC I/II. Interaction à tous les stades de l'apprêtement et de l'expression.
gpUS28	Récepteur de chemokines ; séquestre les chémokines et pourrait participer à la dissémination virale.

**Tableau 1. Protéines impliquées dans l'évasion immune par le CMV humain.** Adapté de Crough T et al, Clinical Microbiology Reviews, Jan 2009 (Crough and Khanna, 2009).



**Figure 8. Des protéines codées par le CMV humain sont capables de moduler la reconnaissance des cellules infectées par les cellules NK** (Rossini et al., 2013). pUL40 se lie à HLA-E et régule positivement son expression à la surface des cellules, potentialisant ainsi son rôle inhibiteur (via l'interaction avec le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A). pUL18, un homologue viral des protéines HLA-I se lie au récepteur LIR-1. L'expression des récepteurs activateurs NKG2D est inhibée par pUL16 (qui cible MICB, ULBP1 et 2) et pUL142 (qui cible MICA et ULBP3). pUL141 prévient l'expression du CD112 et de CD155, ligands des récepteurs activateurs CD226 et CD96, alors que la protéine pp65 interfère avec le signal de transduction du récepteur activateur NKp30. Lignes pleines : interactions possibles résultant en une inhibition des cellules NK. Lignes en pointillé : gêne à l'interaction des récepteurs activateurs avec leurs ligands.

### *b) Mécanismes d'évasion par micro-ARNs*

Plus récemment, une régulation importante par les micro-ARNs (miRNAs) a également été mise en évidence dans le cadre de l'infection à CMV. Les miRNA sont des petites portions non codantes d'ARN qui régulent l'expression de gènes au stade post-transcriptionnel en se liant de façon complémentaire à leur ARN messager cible, le plus souvent localisés dans leur portion 3' non transcrites (UTRs). Il s'agit d'un ancien système de régulation des eukaryotes, conservé tout au long de l'évolution, qui a l'avantage d'être a priori non immunogène. Les herpesvirus et le CMV ont développé leurs propres miRNAs (vraisemblablement >200) qui représentent plus de 20% des ARN messagers du virus (Stark et al., 2012). Ils se lient à la fois sur des cibles de la cellule hôte et des cibles virales participant à la coordination du cycle viral (pour revue (Tuddenham and Pfeffer, 2011)). Leur implication dans la modulation de l'immunogénicité des cellules cibles pourrait être centrale. Il a ainsi été montré que l'HCMV-miR-UL112 régulait l'expression du gène de MICB (Stern-Ginossar et al., 2007). Leur rôle dans la pathogénicité et l'accélération de la réplication virale (Lee et al., 2013) ainsi que des arguments convaincants supplémentaires de modulation des cellules cibles (via la régulation de l'aminopeptidase ERAP par miR US4-1 (Kim et al., 2011) ou la synthèse de RANTES par miR-UL148-D (Kim et al., 2012)) ont aussi récemment été rapportés.

## **5. Diagnostic de l'infection à CMV**

Il est virologique et immunologique.

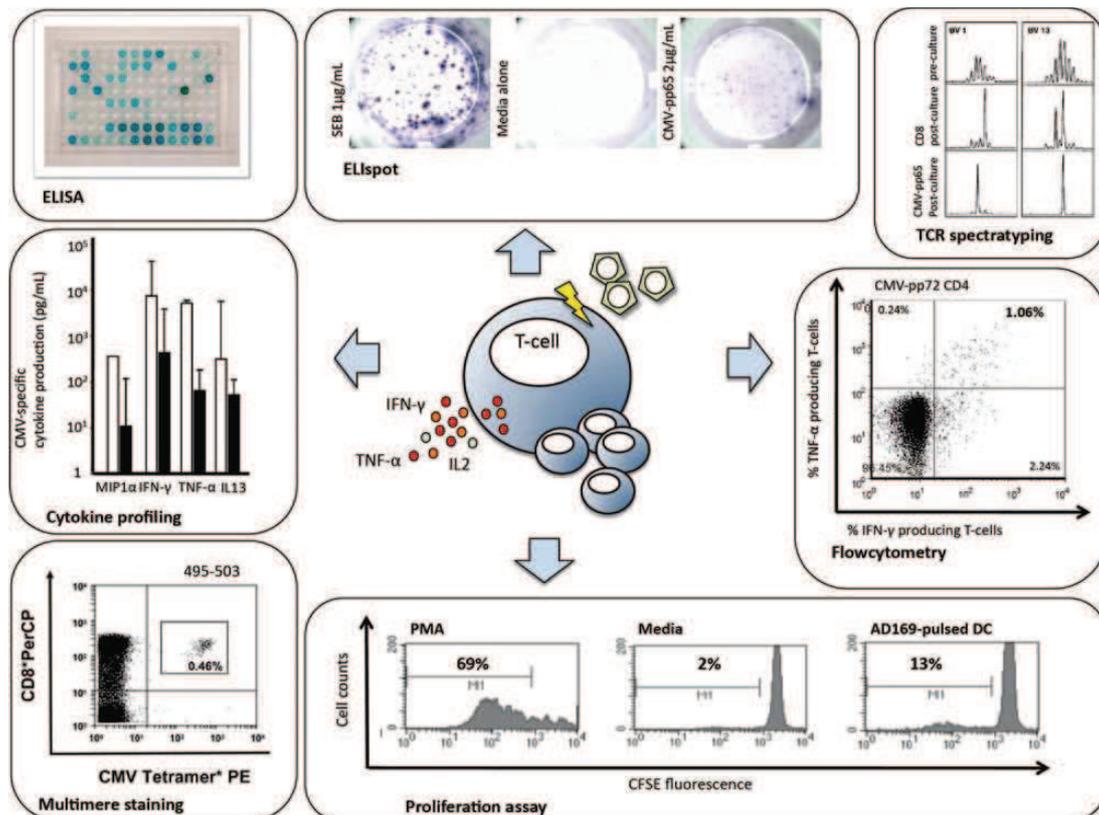
### *a) Diagnostic virologique*

Le diagnostic de certitude est virologique. La culture cellulaire n'est plus utilisée en routine diagnostique mais conserve un intérêt pour isoler les souches et étudier leurs résistances aux anti-viraux. Les techniques de détection des antigènes, de type antigénémie pp65, sont progressivement abandonnées pour les techniques de détection du génome, plus rapides et surtout moins coûteuses en temps de lecture. Elles conservent toutefois leur intérêt pour la détection de l'infection dans les tissus. La PCR en temps réel devient la technique de diagnostic de référence et permet de faire simultanément l'amplification et la quantification du gène d'intérêt. Elle permet de caractériser l'ADNémie virale attestant d'une réplication active et quantifier la charge virale (Kotton et al., 2013). Du fait de multiples variabilités entre laboratoires de virologie -choix de la cible, sonde, méthode d'extraction- (Pang et al., 2009) (Hayden et al., 2012), un standard international WHO a été développé depuis 2010. Il devrait rendre possible une quantification de la charge virale homogène et reproductible et permettre la réalisation d'études internationales multicentriques (Hirsch et al., 2013).

### *b) Diagnostic immunologique*

La sérologie permet d'établir si le patient a été ou non antérieurement en contact avec le CMV (marqueur de rencontre). Elle n'a pas de place dans le diagnostic de l'infection en clinique. En pratique, la sérologie doit être réalisée avant la transplantation chez le donneur (D) et chez le receveur (R) pour établir le statut D/R et guider les mesures de prévention, mais la sérologie après la transplantation a peu d'utilité clinique (Humar et al., 2005) et ne doit pas être recommandée en routine (Kotton et al., 2013). Il pourrait y avoir un intérêt au développement de tests évaluant l'immunité cellulaire (Cell Mediated Immunity assay CMI) pour caractériser le véritable statut immunologique par rapport à une rencontre antérieure avec le virus et ainsi requalifier le statut sérologique (Sester et al., 2003), en particulier quand son interprétation est délicate (transfusion récente, dans les 12 premiers mois de vie (immunisation passive transmission maternelle) (Schmidt et al., 2012) et en cas de forte immunosuppression).

Un effort a été réalisé pour développer des CMI transférables en clinique. Les méthodes sont diverses. Les principales sont reprises dans la figure 9 ci-dessous et leurs caractéristiques détaillées dans le tableau 2 (pour revue récente, voir (Egli et al., 2012)). Un test idéal donnerait la quantification des cellules T CD4 et CD8 (nombre de cellules CMV spécifiques) et la fonction (nombre de cellules CMV spécifiques fonctionnelles), et devrait mesurer IFN- $\gamma$  mais aussi d'autres marqueurs additionnels IL-2, CD107, TNF- $\alpha$ . En pratique, un test idéal doit être simple à réaliser, rapide, reproductible, être performant dans sa capacité à prévoir l'événement clinico-biologique et avoir un bon rapport coût/efficacité.



**Figure 9. Méthodes de mesure de la réponse cellulaire T spécifique du CMV** (Egli et al., 2012). Les méthodes actuelles pour déterminer la réponse cellulaire T spécifique du CMV comprennent la cytométrie en flux, le test ELISpot, enzyme-linked immunosorbent spot assay), des tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), l'analyse de profils de réponse cytokinique, le marquage par des tetramers, l'analyse du repertoire des TCR (spectratyping) et des protocoles d'expansion. Abréviations: CFSE, carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester; CMV, cytomegalovirus; DC, dendritic cell; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ELISpot, enzyme-linked immunosorbent spot assay; IFN, interferon; IL, interleukin; PE, phycoerythrin; PMA, phorbol 12-myristate 12-acetate; SEB, staphylococcal enterotoxin B; TCR, T cell receptor; TNF, tumor necrosis factor.

	<b>Quantiferon-CMV</b> (Cellestis Ltd)	<b>Luminex cytokines</b>	<b>Test ELISpot</b>	<b>Marquage des cytokines intracellulaires (Cytométrie en flux)</b>	<b>Marquage Tétramère (Cytométrie en flux)</b>
<b>Matériel</b>	Sang total	Sang total Ou PBMCs	PBMCs	Sang total ou PBMCs	Sang total
<b>Quantité</b>	<b>3 ml</b>	4-7 ml	7 ml	4-7 ml	4 ml
<b>Durée</b>	48 h	48 h	48 h	24 h	<b>4 h</b>
<b>Antigène</b>	Peptides, mitogène	Peptides, lysats, mitogène	Peptides, lysats, mitogène	Peptides, lysats, mitogène	Aucun
<b>Réponse</b>	CMV spécifique	CMV spécifique	CMV spécifique	CMV spécifique Cellules T	Epitope spécifique des cellules T
<b>Fonction</b>	IFN- $\gamma$ UI/mL	<b>Panel de cytokines variées</b>	Différentes cytokines possibles (ex: IFN- $\gamma$ )	<b>Marqueurs phénotypiques variés + cytokines</b>	Fréquence et phénotypes. Fonction: nécessité d'associer à l'ICS
<b>Avantages</b>	<b>certification CE</b>  <b>Seuil validé</b>  <b>Simple, Large couverture HLA</b>	<b>Polyvalent</b>  même à partir d'une faible quantité d'échantillon	<b>Sensibilité élevée</b> , bonne fréquence de détection des cellules spécifiques	<b>Polyvalent</b>  <b>Faible coût</b>	<b>Rapide, Simple, distinction des spécificités épitopiques</b>
<b>Inconvénients</b>	Cellules T CD8 uniquement, absence de numération,  <b>influence du traitement IS</b>	<b>Laborieux</b>  <b>lecteur Multiplex</b>	Pas de différence entre CD4 et CD8  <b>Laborieux</b>  <b>Lecteur ELISpot</b>	<b>Laborieux</b>	<b>Coût</b> ,  Limité à certains allèles-HLA et à quelques épitopes

Tableau 2. Avantages et inconvénients des différents tests de CMI. Adapté d'Egli et al, CID 55(2012) (Egli et al., 2012)

## 6. Epidémiologie et manifestations du CMV

### a) Epidémiologie

Le cytomégalovirus (CMV) humain n'infecte que l'homme qui est son unique réservoir. Le virus peut être transmis par la plupart des fluides biologiques (salive, sang, sperme, lait, urines), transfert transplacentaire, par une transplantation d'organe solide ou par une greffe de cellules souches hématopoïétiques. La transmission survient sur un mode endémique sans recrudescence saisonnière. Elle nécessite un contact étroit et intime du fait de la fragilité du virus dans le milieu extérieur. La séroprévalence varie de 30 à 90% dans le monde. En Europe de l'Ouest, elle avoisine les 50% à 50 ans (Crough and Khanna, 2009). Elle suit une distribution bimodale avec un premier pic pendant la petite enfance et un second chez le jeune adulte. Le premier résulte de la transmission mère-enfant du virus et de la transmission horizontale, particulièrement fréquente entre enfants (Numazaki and Chiba, 1997). En Europe, environ 25% des enfants de 2 ans sont déjà infectés. Le second pic est probablement largement dû à une transmission sexuelle. Entre 14 et 18 ans, environ 60% des jeunes adultes sont ainsi contaminés.

### b) Manifestations cliniques

Chez les sujets immunocompétents, l'infection est le plus souvent bénigne et spontanément résolutive après la mise en place d'une réponse immune spécifique (>90%). Quand le système immunitaire cellulaire est déficient, le phénotype clinique de l'infection symptomatique diffère. Les différents aspects cliniques sont repris dans le tableau ci-dessous (tableau 3).

Aspect cliniques de l'infection à CMV chez l'homme	
Type de Patient	Aspects cliniques
Individus sains	Généralement asymptomatique. Rarement : fièvre, pharyngite, myalgies, adénopathie, splénomégalie voire très rares formes sévères de polyradiculonévrite, myocardite et hépatites.
Fœtus/nouveau né avec infection congénitale	Ictère, Hépatosplénomégalie, pupura, microcéphalie, hypotonie, convulsions, chorioretinite, surdité {Fowler, 1992 #1312}a.
Receveurs TOS	Syndrome CMV : Fièvre. Malaise. Atteinte viscérale : pneumopathie, enterocolite, oesophagite ou gastrite, hépatite, plus rarement : rétinite, néphropathie, cystite, myocardite, pancréatite.
Receveurs de greffe hématopoïétique	Pneumopathie+++ , entérocolite, oesophagite ou gastrite, plus rarement : rétinite, encéphalite, hépatite
Patients avec infection à VIH/SIDA	Rétinite+++ , entérocolite, oesophagite ou gastrite syndrome de restauration immunitaire avec inflammation du segment postérieur plus rarement : atteinte neurologique, hépatite, pneumopathie.
Patients hospitalisés en réanimation	Surreprésentés dans les syndromes de détresse respiratoire aiguë des patients ventilés {Papazian, 1998 #1470}b {Chiche, 2009 #1263}c. Réactivation chez 1/3 des malades et association avec un surrisque de mortalité et d'hospitalisation prolongée {Limaye, 2008 #1424}d.

**Tableau 3. Aspects cliniques de l'infection à CMV chez l'homme.** a(Fowler et al., 1992) ; b(Papazian et al., 1998) ; c(Chiche et al., 2009) ; d(Limaye et al., 2008)

### c) Manifestations biologiques

L'infection à CMV peut s'accompagner d'un syndrome mononucléosique, d'une hyperlymphocytose, d'une atteinte médullaire avec neutropénie, thrombopénie et/ou anémie, d'une cytolysé hépatique et parfois d'une cholestase, d'anomalies immunologiques (cryoglobulinémie mixte, facteur rhumatoïde, hypergammaglobulinémie polyclonale, anémie hémolytique avec test de Coombs positif, anticorps anti nucléaires). Quand elle est au stade maladie avec syndrome invasif tissulaire, elle peut aussi s'accompagner d'une augmentation des paramètres biologiques traduisant la dysfonction d'organe (troponine, créatinine...).

## 7. Le CMV en transplantation d'organes solides

### a) Définition

L'infection à cytomégalovirus (CMV) est l'infection virale la plus fréquente en transplantation d'organes solides. Le risque d'infection à CMV varie selon les statuts sérologiques du donneur (D) et du receveur (R) au moment de la transplantation. En l'absence de prophylaxie, l'infection à CMV survient chez 60-80% des D+R- (3), 50-60% des D+R+ et 25-50% des D-R+ (Sagedal et al., 2000). En fonction du statut sérologique du donneur (D) et du receveur (R) et du mode de transmission, on distingue :

- *la primo-infection* chez les patients séronégatifs pour le CMV recevant un rein provenant d'un donneur séropositifs (D+R-),
- *la réactivation* chez les patients séropositifs pour le CMV (D-R+)
- *la surinfection* chez les patients séropositifs pour le CMV recevant un rein provenant d'un donneur séropositif (D+R+).

Après rencontre avec le CMV, plusieurs formes d'infection peuvent être distinguées :

- Infection latente : présence du génome du CMV non répliatif, virémie négative, sérologie positive, contrôle efficace du système immunitaire.

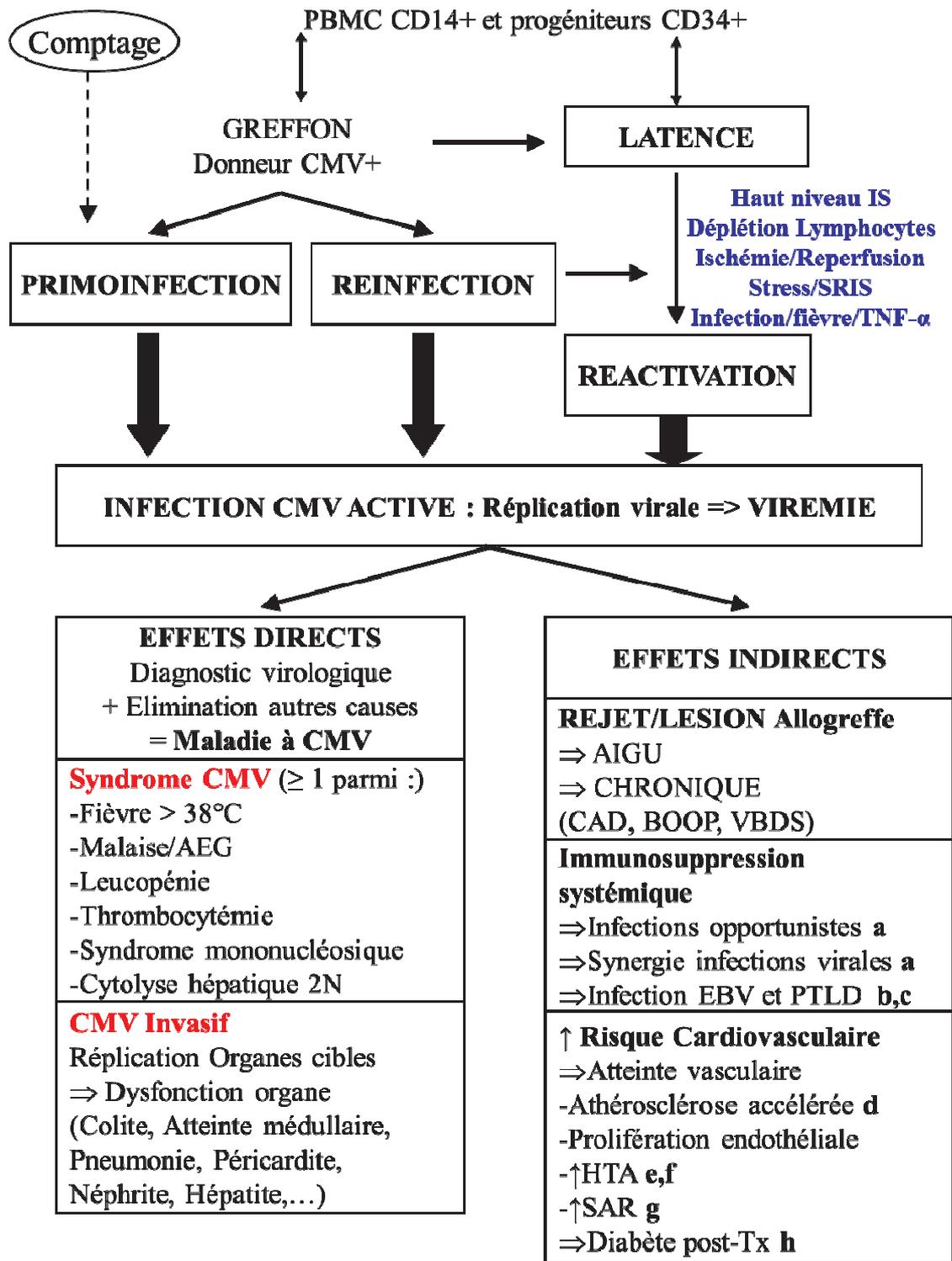
- Infection active : CMV répliatif avec une virémie plasmatique.
- Maladie à CMV : infection à CMV symptomatique sur le plan clinique avec de la fièvre et/ou une atteinte d'organe.

### *b) Facteurs de risque*

Chez les receveurs séropositifs pour le CMV, les facteurs de risques associés à une réactivation sont les suivants (Fishman, 2007): utilisation de sérum anti-lymphocytaire (Gaber et al., 2010), immunosuppression à base de mycophénolate mofétil, traitement d'un rejet aigu, retard à la reprise de fonction, nombre d'incompatibilités HLA à la greffe interférant avec l'efficacité de la réponse anti-CMV, prédispositions génétiques (polymorphismes de PD1 (Hoffmann et al., 2010), d'IL12R (Hoffmann et al., 2008)), l'inflammation, l'âge avancé, et un état général altéré. Le passage d'une infection active à une maladie à CMV est corrélé avec le niveau initial et le pic de la charge virale, la dynamique de la réplication du CMV, la durée de la virémie, et l'expression par le virus de gènes d'évasion immune (Boeckh and Geballe, 2011).

### *c) Effets du CMV*

Le CMV est aussi associé à une morbidité et une mortalité significative (Sagedal et al., 2004) après transplantation d'organes solides de par ses effets directs en rapport avec la maladie à CMV (syndrome CMV et CMV invasif) mais aussi de par ses effets indirects en rapport avec l'infection à CMV asymptomatique que l'on peut classer en trois catégories : CMV et lésions sur le greffon (cf infra), CMV et immunosuppression systémique et CMV et risque cardiovasculaire (figure 10).



**Figure 10. Effets direct et indirects de l'infection à cytomégalo virus après greffe rénale.** PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells (Cellules mononuclées du sang), IS : immunosuppression, SRIS : Syndrome de Réponse Inflammatoire systémique, TVS : Transplant Vascular Sclerosis (Vasculopathie du transplant), CAV : Cardiac Allograft Vasculopathy (Coronaropathie d'allogreffe), BOOP : Bronchiolite oblitérante, VBDS : Vanishing Bile Duct Syndrom (Syndrome de raréfaction des canalicules biliaires), EBV : Epstein Barr Virus, PTLD : Post Transplant Lymphoproliferative Disease (Lymphomes post transplantation), HTA : Hypertension artérielle, SAR : Sténose de l'artère rénale, post-Tx : post transplantation, AEG : Altération de l'Etat Général. a(Hodson et al., 2008), b(Opelz et al., 2007), c(Funch et al., 2005), d(Vliegen et al., 2004), e(Cheng et al., 2009), f(Simanek et al., 2011), g(Audard et al., 2006), h(Hjelmsaeth et al., 2004).

*d) Prise en charge*

La morbi-mortalité avérée du CMV justifie la mise en place de stratégies de prévention pour lesquelles on distingue une stratégie prophylactique (administration d'une thérapie antivirale pour une durée prédéfinie pour tous les patients à risque) et une stratégie préemptive (surveillance régulière de la virémie et instauration d'une thérapeutique antivirale, uniquement quand le virus est détecté dans le sang, c'est-à-dire traitement des infections à CMV uniquement). La prise en charge du CMV en prévention ou à la phase curative (Asberg et al., 2007) fait appel à des molécules antivirales basées sur l'inhibition de l'ADN polymérase virale pUL54 au premier lieu desquelles on trouve les analogues nucléosidiques : notamment le ganciclovir et sa prodrogue le valganciclovir. La difficulté de prise en charge du CMV après transplantation réside dans le fait que l'utilisation d'antiviraux ne suffit pas puisque l'éradication du virus et son contrôle à long terme implique aussi un contrôle immunologique par les lymphocytes T et les IgG spécifiques du CMV.

Aucune stratégie n'a montré un réel bénéfice l'une sur l'autre (Kotton et al., 2013). Les incidences d'infections et de maladies à CMV des dernières études publiées sont reprises dans le tableau 4.

	D+R-		D+R+		D-R+		N	
	PROPH 6M	PROPH 3M	PREEMP	PROPH	PREEMP	PROPH		PREEMP
<b>INFECTION CMV</b>								
Khoury, 2006 (Khoury et al., 2006)		44	54	18	54	27	75	98
Kliem, 2008 (Kliem et al., 2008)		52	74	10	56	0	25	148
Reischig, 2007 (Reischig et al., 2008)		75	83	56	96	60	86	70
Helentera, 2010 (Helantera et al., 2010)	37							127
Humar, 2010 (Humar et al., 2010)	37,4	50,9						326
Van der Beek, 2010 (van der Beek et al., 2010)		52	69					78
Couzi, 2012 (Couzi et al., 2012a)		34	60					112
Witzke, 2011 (Witzke, 2011)				15,6	53,8	3,6	22,2	296
Atabani, 2012 (Atabani et al., 2012)			70		53		44	368
Mean	<b>37,2</b>	<b>51,3</b>	<b>68,3</b>	<b>24,9</b>	<b>62,6</b>	<b>22,7</b>	<b>50,4</b>	<b>1623</b>

MALADIE CMV								
Khoury, 2006 (Khoury et al., 2006)		19	8	5	0	0	0	98
Kliem, 2008 (Kliem et al., 2008)								148
Reischig, 2007 (Reischig et al., 2008)		0	33	13	0	0	0	70
Helentera, 2010 (Helantera et al., 2010)	34							127
Humar, 2010 (Humar et al., 2010)	16,1	36,8						326
Van der Beek, 2010 (van der Beek et al., 2010)		0	0					78
Couzi, 2012 (Couzi et al., 2012a)		16	26					112
Witzke, 2011 (Witzke, 2011)				4,4	19,2	3,6	5,6	296
Atabani, 2012 (Atabani et al., 2012)			32,5		2,5		0,9	368
<b>Mean</b>	<b>NA</b>	<b>14,4</b>	<b>19,9</b>	<b>7,5</b>	<b>5,4</b>	<b>1,2</b>	<b>1,6</b>	<b>1623</b>

**Tableau 4. Incidence (%) des infections et maladies à CMV à l'ère moderne, en fonction de la stratégie de prévention appliquée.** Le diagnostic d'infection CMV est fait par mesure de la charge virale. PROPH Traitement prophylactique. PREEMP Traitement préemptif. NA Non Applicable.

Si la stratégie prophylactique semblait l'avoir emporté, chez les D+/R- (Kotton et al., 2010), chez les R+ (Walker et al., 2007; Weclawiak et al., 2010; Witzke et al., 2011), et de par son efficacité économique (Luan et al., 2011; Luan et al., 2009), la dernière conférence de consensus a rééquilibré la donne, en intégrant des papiers récents de suivi au long cours (Reischig et al., 2012; Spinner et al., 2010), l'analyse des effets secondaires de molécules (leucopénie) (Hurst et al., 2011; Kalil et al., 2009) et la certitude que seule une stratégie préemptive rigoureuse pouvait donner lieu à la comparaison ((Greiner et al., 2012) périodicité du screening, rapidité de mise en place du traitement d'attaque, validation de seuils virologiques (Martin-Gandul et al., 2013)). Si bien qu'aujourd'hui, les traitements préemptif et prophylactique sont considérés comme des préventions équivalentes. Le choix de la stratégie peut donc se faire librement à l'échelle du centre, en fonction de si on veut faire porter le coût de la prévention sur le patient ou sur le soin (McGillicuddy et al., 2010) (coût de la molécule *versus* coût biologique et temps médical). La conséquence de cette évolution est le regain d'intérêt pour les CMI qui semblent les mieux à même de caractériser le risque virologique. Le tableau 5 reprend les différents moments-clé du suivi où ils pourraient avoir un rôle.

Clinical Scenario	Suggested Frequency of Immune Monitoring	Suggested Clinical Management
CMV D <sup>+</sup> /R <sup>-</sup> on primary prophylaxis	At the completion of prophylaxis and monthly for 1 y post-transplant	For negative assay, ongoing prophylaxis or frequent monitoring For positive assay, no further prophylaxis or monitoring
CMV R <sup>+</sup> with other risk factors (eg, lung transplant, ATG induction)	Preemptive strategy: monthly till 1 y posttransplant Prophylaxis: starting at completion of prophylaxis till 1 y posttransplant	For negative assay, ongoing prophylaxis or frequent monitoring For positive assay, no further prophylaxis or monitoring
Posttherapy for acute rejection	Monthly for 3 mo posttherapy	For negative assay, ongoing prophylaxis or frequent monitoring For positive assay, no further prophylaxis or monitoring
Recent completion of therapy for CMV disease (prediction of relapse)	At the completion of therapy and monthly for 3 mo	For negative assay, ongoing prophylaxis or frequent monitoring For positive assay, no further prophylaxis or monitoring
Recent completion of therapy for CMV viremia (prediction of relapse)	At the completion of therapy and monthly for 3 mo	For negative assay, ongoing prophylaxis or frequent monitoring For positive assay, no further prophylaxis or monitoring
Low-level viremia	At the onset of viremia and weekly for 3 wk	For negative assay, start therapy For positive assay continue to monitor

**Tableau 5. Scénarios cliniques potentiels et périodicité des différents tests d’immunomonitoring du CMV**(Egli et al., 2012).

Les résultats des études publiées jusqu’à présent sont difficilement transposables en pratique clinique: pas de comparaison des différents tests, aucune valeur de performance diagnostique –Se, Sp, VPP, VPN- convaincantes, des petits effectifs de groupes hétérogènes (voir les revues (Egli et al., 2012; Kotton et al., 2010) et plus récemment (Cantisan et al., 2013; Manuel et al., 2013a)) et aucune étude de prise en charge antivirale tenant compte des tests de CMI. La place pour un CMI alternatif basé sur l’analyse des lymphocytes T  $\gamma\delta$  existe.

#### *e) Lésions de l’allogreffe induites par le CMV*

Le CMV est un facteur de détérioration du greffon : la persistance d’une réplication virale est à l’origine d’effets indirects qui englobent la génération de lésions du greffon.

##### *(1) Lien entre rejet aigu et CMV :*

Cette association a été validée en transplantation rénale sur des études de cohortes matchées anciennes (Dickenmann et al., 2001; Nett et al., 2004; Pouteil-Noble et al., 1993; Reinke et al., 1994; Sagedal et al., 2002; Toupance et al., 2000), ou sur des études de prévention retrouvant une moindre survenue de rejets dans le bras des patients ayant bénéficié d’une stratégie prophylactique donc ayant eu moins d’infections à CMV (Lowance et al., 1999; Reischig et al., 2008; Potena et al., 2006). Elle n’est plus retrouvée dans aucune étude depuis 10 ans et l’application d’une prévention systématique. Le lien entre réponse allogénique « aiguë » et réponse immune anti CMV n’a pas non plus été démontré (Nickel et al., 2009).

##### *(2) Lien entre rejet chronique et CMV :*

Le problème de définition du rejet chronique rend l’évaluation de cette association difficile (à savoir la part lésionnelle chronique imputable à la réponse allogénique). Dans la plupart des types de TOS, le CMV a toutefois été retrouvé associé avec les lésions histologiques caractéristiques de rejet chronique (Foie et syndrome de raréfaction des canalicules biliaires (O’Grady et al., 1988) (Evans et al., 2000), Cœur et coronaropathie d’allogreffe (Grattan et al., 1989) (Loebe et al., 1990) (Koskinen et al., 1999) (Petropoulou et al., 2004), Poumons et bronchiolite oblitérante (Keenan et al., 1991) (Paraskeva et al., 2011)).

En transplantation rénale, ce lien entre CMV et lésion histologique stéréotypée de rejet chronique n'a pas été démontré. En revanche, ont été rapportés:

- Impact de l'infection à CMV sur la survie du greffon (Humar et al., 1999; Sagedal et al., 2004) et la pente de dégradation de la fonction rénale (Kliem et al., 2008) (N KTR =148, 72 préemptifs, 72 prophylactiques : dégradation de la fonction rénale ( $\Delta$ Clairance de la créatinine Max –Min) plus importante chez les patients avec infection (25 +/- 14,2 mL/min, N=39 versus 18,1 +/-12,5mL/min, N=87), et pertes du greffon significativement plus importante à 4 ans, quand survenue d'une infection (25% vs 9%, p=0,0117)).
- Moins bonne survie du greffon quand persistance du CMV en intragreffon (N KTR=63 dont 17 avec persistance du CMV) (Helantera et al., 2006). Observation d'une surreprésentation des lésions d'épaississement fibreux de l'intima, uniquement chez les patients ayant eu un rejet aigu, associée à une augmentation d'ICAM 1, de PDGF-AA, et de TGF $\beta$ 1 (Helantera et al., 2003) (Helantera et al., 2005).
- Effet de la virémie sur la dysfonction du greffon (N=55 transplantés rénaux (KTR) pédiatriques, 22% de virémie infraclinique) (Smith et al., 2010).
- Virémie à CMV associée à la survenue précoce de lésions de fibrose et d'atrophie tubulaire (FIAT) (biopsies protocolaires à M3, N KTR=118, OR=3.8, p=0.02) (Reischig et al., 2009).
- Présence du CMV dans les lésions de dysfonction chronique d'allogreffe rénale (23/24 transplantectomies R+) et niveau d'expression intrarénal associé à la survie du greffon (Dzabic et al., 2011).
- Traitement préemptif (vs prophylactique) associé à une meilleure survie, des taux plus bas de FIAT avec inflammation, et des niveaux d'expression intrarénaux d'ARNm de gènes impliqués dans la fibrogénèse (Reischig et al., 2012).
- Traitement préemptif associé à une moins bonne survie du greffon (N KTR=1239, HR 1.63 [1.01-2.64], p=0.04) (Manuel et al., 2013b).

### (3) *Détérioration endothéliale et épithéliale médiée par le CMV*

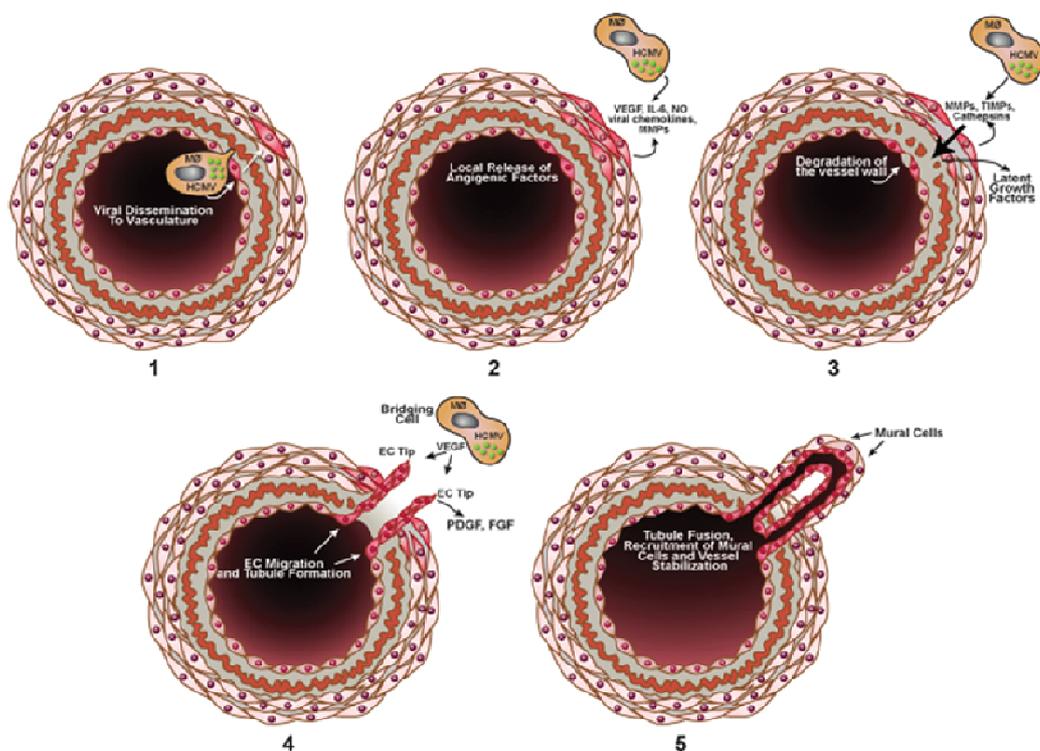
Les cibles cellulaires endothéliales et épithéliales jouent vraisemblablement un rôle majeur dans ce processus. L'agression cellulaire induite par le virus est susceptible de générer plusieurs types de réponses, schématisés dans le tableau suivant (tableau 6).

	<b>Cellule endothéliale</b>	<b>Cellule épithéliale</b>
Lyse cellulaire complète		Modification histologique en rapport avec atrophie tubulaire. Perte des fonctions d'interface (Ex rein : sécrétion/réabsorption hydroélectrolytique).
Lyse cellulaire incomplète/ Modification de la biologie cellulaire	1-Activation de la cellule endothéliale(Bentz and Yurochko, 2008). Rôle immunologique allogénique(Waldman et al., 1993), modifications fonctionnelles (ex : dysrégulation NO synthase (Koh et al., 2004)). 2-Signaux de survie, engagement dans un processus de prolifération (Caposio et al., 2011), modifications histologiques en rapport (sclérose vasculaire du transplant) (Grattan et al., 1989; Potena et al., 2009; Streblow et al., 2008).	1-Activation de la cellule épithéliale. Rôle immunologique. Génération d'un « épimmunome » (Swamy et al., 2010). 2-Engagement dans un processus de dédifférenciation cellulaire et de transition épithélio-mésenchymateuse(Shimamura et al., 2010), sécrétion de molécules profibrosantes(Helantera et al., 2005), modifications histologiques en rapport (fibrose interstitielle) (Reischig et al., 2012; Reischig et al., 2009).

**Tableau 6. Mécanismes supposés de détérioration endothéliale et épithéliale médiée par le CMV.**

Les lésions de coronaropathie d'allogreffe en transplantation cardiaque illustre parfaitement ce lien entre CMV, cellule endothéliale activée/dérégulée et réponse angiogénique. Les bases expérimentales à cette association sont solides et anciennes (Speir et al., 1994) (Zhou et al., 1996) (Streblov et al., 1999) (Bentz and Yurochko, 2008), (pour revue (Caposio et al., 2011)). Elles sont reprises dans la figure ci-dessous. Le groupe de Portland a notamment travaillé sur la capacité du CMV à induire la libération d'un « sécrétome » de cytokines et de facteurs de croissance par la cellule endothéliale activée (Botto et al., 2011), essentiel dans l'activation de l'angiogénèse (figure 11) mais également susceptible d'intervenir dans la régulation de la réponse immunitaire dans un contexte allogénique.

Au regard de ces données de la littérature, il est étonnant qu'aucune signature histologique chronique n'ait pu être associée à l'infection à CMV en transplantation rénale. A travers ce travail, nous partirons de l'analyse d'une cohorte de patients transplantés, ayant été biopsiés sur indication et pour lesquels nous disposons d'un suivi virologique pour questionner ce lien entre CMV et lésion histologiques chronique.



- 1- Dissémination virale aux cellules endothéliales (EC) and SMC
- 2- Libération (sécrétome) de facteurs angiogéniques et de MMP
- 3- Dégradation de la paroi vasculaire
- 4- Migration/xx de EC et formation de neotubules
- 5- Recrutement de cellules murales et stabilisation du néovaisseau

Figure 11. Effet pro-angiogénique du CMV (Caposio et al., 2011).

## C. Les Anticorps spécifiques du donneur (DSA)

Depuis les travaux séminaux d'Ehrlich sur la sérothérapie puis la démonstration de ses capacités lytiques, l'anticorps tient une place importante dans l'approche immunologique moderne. Sa production a été rattachée aux lymphocytes B et à leur différenciation et maturation en plasmocytes (Roitt et al., 1969). La reconnaissance du rôle pathogène des anticorps anti donneur a permis très tôt de comprendre les causes des rejets hyperaigus vasculaires conduisant aux pertes immunologiques précoces des premières transplantations rénales (Kissmeyer-Nielsen et al., 1966). Dans un contexte allogénique, la cible élective de ces anticorps est le complexe de molécules hautement polymorphique du système HLA (Dausset et al., 1965; Jeannet et al., 1970). C'est de cette compréhension qu'ont été mis au point les tests de crossmatches qui servent encore aujourd'hui de test ultime de compatibilité, en confrontant le sérum du receveur aux cellules du potentiel donneur dans un test fonctionnel effectué juste avant la greffe (Patel and Terasaki, 1969).

### BOX Système HLA

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (ou Human Leukocyte Antigen – HLA chez l'homme) constituent un système de reconnaissance du soi, présent à la surface de l'ensemble des cellules nucléées de l'organisme, et jouant un rôle fondamental dans la réponse immunitaire physiologique via leur capacité à présenter des peptides antigéniques aux cellules lymphocytaires T. Génétiquement, le système HLA correspond à un ensemble de gènes localisés sur le bras court du chromosome 6 chez l'homme, à la partie distale de la bande 6p 21-3, recouvrant une région de 3800 kB. Ces gènes sont subdivisés en 3 catégories : les gènes codant pour les molécules HLA de classe I, de classe II et de classe III (mal caractérisée, pas de rôle équivalent dans la présentation antigénique). Ces gènes HLA présentent 3 caractéristiques notables (i) le polymorphisme, (ii) la codominance (expression de l'allèle de chaque gène porté par chacun des deux chromosomes chez les patients hétérozygotes), (iii) une liaison étroite (transmission en bloc d'un haplotype de gènes à la descendance, avec peu de recombinaison). La variabilité génotypique (1010 combinaisons théoriques possibles) donc phénotypique est immense, expliquant que deux individus non apparentés n'ont qu'une très faible probabilité d'exprimer les mêmes molécules HLA. Cette variabilité génotypique est pondérée par un déséquilibre de liaison entre certains allèles.

**Structure** : Les molécules HLA sont des glycoprotéines membranaires.

- I. Molécules HLA de la classe I : Les trois principales molécules HLA de classe I sont les molécules HLA-A, -B et -C. Elles sont constituées de l'association non covalente d'une chaîne lourde  $\alpha$  (45 kD), codée par les gènes situés sur les loci A, B et C, et d'une chaîne légère commune, la  $\beta$ 2-microglobuline (12 kD).

La chaîne lourde  $\alpha$  est une glycoprotéine composée de trois parties

- ✓ une partie N terminale extra-membranaire, d'environ 280 acides aminés. Celle-ci est elle-même composée de trois domaines  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3. Les domaines  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2, les plus distaux par rapport à la membrane cellulaire, sont polymorphes ; c'est à ce niveau que se situe le site de fixation peptidique permettant de présenter les peptides antigéniques aux TCR des lymphocytes T-CD8. Le domaine  $\alpha$ 3, plus conservé, est la région d'association avec la  $\beta$ 2-microglobuline.
- ✓ une partie transmembranaire, d'environ 20 acides aminés
- ✓ une partie C-terminale intra-cytoplasmique, constituée de 4 acides aminés.

La  $\beta$ 2-microglobuline est constituée par un seul domaine extra-membranaire. Le gène codant est situé sur le chromosome 15, ne faisant donc pas partie de l'ensemble des gènes codant pour le système HLA, et n'est pas polymorphe. La molécule possède une fonction de stabilisation et de transport de la chaîne lourde  $\alpha$  à la membrane cellulaire. Leur distribution est ubiquitaire.

- II. Molécules HLA de classe II : Les molécules HLA de classe II ont une structure très proche de celle des molécules HLA de classe I. Elles sont formées de l'association non covalente d'une chaîne  $\alpha$  (34 kD) et d'une chaîne légère  $\beta$  (29 kD).

Contrairement aux molécules HLA de classe I, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont ici parfaitement homologues, composées, toutes les deux, d'une partie N terminale extra-membranaire, d'une partie transmembranaire et d'une partie C-terminale intra-cytoplasmique. Les principales familles de molécules HLA de classe II sont codées par des gènes situés sur les loci DR, DP et DQ. Chacun de ces loci contient un gène codant pour une chaîne  $\alpha$  (DRA, DPA et DQA) et une chaîne  $\beta$  (DRB, DPB et DQB), chaque gène présentant de très nombreuses formes alléliques, à l'exception de DRA, codant pour la chaîne  $\alpha$  du DR, qui est très peu polymorphe (3 allèles identifiés seulement). Le locus DR présente la particularité de comporter plusieurs gènes DRB. Le gène DRB1 code la chaîne  $\beta$  principale, qui associée à la chaîne DR  $\alpha$  forme la molécule HLA-DR. En fonction de l'allèle exprimé au locus DRB1, un autre gène DRB3, DRB4 ou DRB5, présent et exprimé au sein de l'haplotype, peut s'associer également à une chaîne DR  $\alpha$  pour former une molécule dite de surspécificité DR52, DR53 ou DR51 respectivement. Les parties extra-membranaires des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont constituées, chacune, de deux domaines  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2. Les domaines  $\alpha$ 1 et  $\beta$ 1 constituent la encore des régions hypervariables, abritant le site de fixation peptidique qui permet de présenter les peptides antigéniques aux TCR des lymphocytes T-CD4.

Les molécules de classe II ont une distribution beaucoup plus restreinte que celle des molécules de classe I : elles sont retrouvées sur les cellules présentatrices des antigènes (cellules dendritiques, monocytes/macrophages, lymphocytes B), sur les lymphocytes T activés, ainsi que sur des cellules endothéliales des vaisseaux.

## 1. Immunogénicité du système HLA

Les molécules HLA de par leur polymorphisme signent la singularité individuelle à l'échelle cellulaire. Elles constituent le principal stimulus antigénique en situation allogénique. Cet aspect justifie la recherche d'un donneur présentant la meilleure compatibilité possible en terme de typage HLA avec le receveur ; le nombre d'incompatibilités ou mismatch HLA étant inversement corrélé à la survie du greffon (Opelz and Wujciak, 1994).

La réponse immunologique qu'elle engendre revêt les deux aspects classiques de l'immunité adaptative avec une réponse cellulaire T et une réponse anticorps. L'immunologie de la greffe s'est focalisée pendant près de trente ans sur la réponse cellulaire T du fait notamment de la forme prise par les rejets aigus classiques à médiation cellulaire avec une infiltration du greffon par les lymphocytes (Racusen et al., 1999). Le développement des drogues immunosuppressives jouant sur l'activation cellulaire T (notamment via les anticalcineurines qui bloquent le signal 1 en aval du TCR (Halloran, 2004)) ont permis progressivement de contrôler cette réponse cellulaire T : le taux de rejets aigus est ainsi passé de plus de 40% dans les années 80 à moins de 10% aujourd'hui chez des patients à faible risque immunologique (Meier-Kriesche et al., 2004). L'enregistrement de cette diminution du taux de rejets aigus dans la 1<sup>ère</sup> année s'est fait de façon concomitante à deux autres constats (i) les rejets aigus résiduels ont un phénotype plus sévère et répondent moins bien aux traitements conventionnels, (ii) la survie à long terme des greffons n'a pas connu la même amélioration (Lamb et al., 2011). L'amélioration des techniques de dépistage et d'identification des DSA associée à une redéfinition du phénotype histologique des lésions médiées par les DSA a permis d'éclairer cette évolution en établissant le rôle déterminant des DSA dans la détérioration aiguë et chronique du greffon.

## 2. Dépistage et Identification des DSA

### a) Facteurs de risque

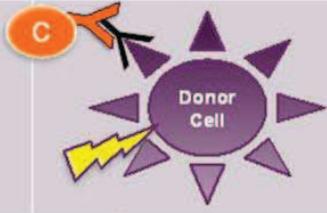
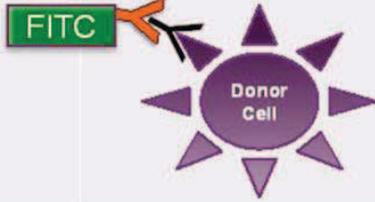
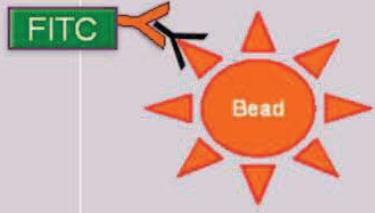
On rappelle que les trois paramètres classiquement reconnus comme favorisant l'apparition de DSA sont une grossesse, une transfusion de produits sanguins et une transplantation antérieure. Récemment, les modalités d'immunisation anti HLA ont été affinées par trois études originales

- Tout événement « proinflammatoire » (en pratique du syndrome coronarien aigu au sepsis sévère) est capable de générer une immunisation anti HLA (Locke et al., 2009). Les vaccinations sont classiquement retrouvées comme favorisant l'immunisation (10% des patients (Katerinis et al., 2011)) même s'il n'a pas été montré que ce type d'immunisation pouvait avoir un impact sur le devenir du transplant.
- Les femmes n'ayant pas développé d'anticorps anti HLA après leurs différentes grossesses ont moins de risque de développer une alloimmunisation après transplantation (Gatault et al., 2012), suggérant l'existence de phénotypes plus tolérogènes.
- Le rebond d'immunisation anti HLA traditionnellement décrite après transplantectomie (« sponge trap ») serait fortement corrélé à l'arrêt de toute immunosuppression : 50% de DSA après transplantectomie (Del Bello et al., 2012).

### b) Techniques

Les outils immunologiques à disposition pour caractériser les DSA ont connu une sophistication et une complexification croissante, permettant un réel gain de sensibilité. Brièvement, on est passé d'une technique basée sur un test fonctionnel de lyse des cellules du donneur via une cytotoxicité des anticorps obtenue par adjonction de complément de lapin (CDC) (Patel and Terasaki, 1969), à une identification en cytométrie en flux d'une fixation d'anticorps dirigée contre les cellules T ou B du donneur (Cook et al., 1987), puis à l'utilisation de tests dits en phase solide. Pour ces derniers, les tests

ELISA (Lefaucheur et al., 2008) avec molécules d'HLA coatées sur plaque ont été progressivement suppléés par des tests utilisés en cytométrie basés sur des billes recouvertes de molécules HLA synthétiques (plusieurs spécificités HLA pour un test dit de Flow PRA utilisé en dépistage, à une seule spécificité HLA, de résolution souvent allélique, pour un test dit de Single Antigène Flow Bead SAFB utilisé en identification). Ces outils sont accessibles en pratique de routine. Ils offrent en plus l'avantage d'une évaluation semi quantitative de la force du DSA par l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de fixation des anticorps du sérum sur les billes, à la réserve près que celle-ci n'est pas validée par les autorités de tutelle (FDA (Archdeacon et al., 2011)). Ces nouveaux outils ouvrent des perspectives intéressantes en identifiant des DSA qui passaient inaperçus jusqu'alors.

Testing	Antibodies Detected	Sensitivity	Specificity	Assay
<b>(A) Complement Dependent Cytotoxicity (CDC)</b> Donor cells + recipient serum (Y) + AHG (Y) + complement (C) = lysis (⚡) and color change	HLA and non-HLA T-Cell: HLA I B-Cell: HLA I>II	+	+++	
<b>(B) Flow X-matching</b> Donor cells + recipient serum + FITC tagged antibody = laser detects FITC recording "channel shift"	HLA and non-HLA T-Cell: class I B-Cell: class I>II	++	++	
<b>(C) Solid Phase HLA-Testing</b> Beads coated in HLA + recipient serum + FITC tagged antibody = laser detects FITC recording "mean fluorescence intensity"	HLA-Specific Mixed class I or II beads as 'screens'. Single antigen beads determine specificity of HLA antigen	+++	+	

**Figure 12. Différents tests classiquement utilisés pour la détection des DSA (Nishio-Lucar et al., 2013).** (A) In the CDC method, donor cells are incubated with recipient serum, mixed with antihuman globulin antibody and complement. Cell lysis causes a color change and represents positive antibody recognition. (B) In flow crossmatching, donor cells are mixed with recipient serum and fluorescently labeled antihuman globulin Ig (FITC). A flow-cytometer then counts labeled cells and reports the mean fluorescence intensity (MFI). (C) In solidphase HLA-testing, synthetic beads coated with HLA are mixed with recipient serum and FITC. Flow cytometer then measures the fluorescence of labeled cells and reports the MFI. Sensitivity in this chart relates to the ability to detect a DDA. Specificity relates to the outcome of a clinically significant antibody-mediated rejection. Y (black) donor-specific antibody, Y (orange) antihuman globulin (AHG), (C) Complement lysis, FITC fluorescently labeled antibody, HLA human leucocyte antibody.

### c) Limites

Les modalités de l'utilisation optimale de ces tests à haute sensibilité ne sont pas pleinement consensuelles (Tait et al., 2013). Les seuils qui permettent de reconnaître un anticorps anti HLA comme un DSA sont au cœur des controverses. Les spécificités HLA à considérer comme pathogènes également (HLA Cw, HLA DP).

Au-delà, c'est :

- l'accès à la transplantation qui est en jeu. Un seuil trop bas risque de limiter l'accès à la transplantation (en déclarant l'antigène HLA antigène interdit), un seuil trop haut d'exposer les patients à un risque immunologique,
- en post greffe, la stratégie diagnostique (biopsie du greffon à la recherche d'argument pour des lésions histologiques à médiation humorale) et thérapeutique qui est discuté.

Pour utiliser au mieux ces tests, il faut en connaître les limites. Leurs principales sont reprises dans le tableau ci-dessous (tableau 7).

Technological advantages and limitations of Luminex HLA SAB	
Technological advantages	Technological limitations
Qualitative: enables precise identification of all antibody specificities in complex sera (DSA)	Some positive results can be caused by antibodies to denatured HLA.
Comprehensive: distinguishes antibodies to all common alleles for HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DRB3/4/5, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1, HLA-DPBI	Occasional high background binding requiring repeat testing and absorption protocols.
Semiquantitative: enables determination of antibody levels (high, intermediate, and low)	Variable HLA protein density on beads. Blocking factors may cause false-negative or misleading low assessment of antibody levels (prozone?). IgM and C1 can block IgG binding.
Sensitive: enables detection of weak antibody levels	
Rapid: enables real-time antibody monitoring for DSA. HLAi transplantation. Pretransplantation and posttransplantation antibody monitoring (assist diagnosis of AMR). Virtual XM	Lot-to-lot variation requiring validation. Vendor-specific variation.
Enables detection of non-HLA-specific antibodies (e.g., MICA)	
Detection and differentiation between immunoglobulin class and isotype (e.g., complement fixing and noncomplement fixing C4d and C1q)	Reagents not standardized

AMR, antibody-mediated rejection; DSA, donor-specific HLA antibodies; HLAi, HLA incompatible; MICA, major histocompatibility complex class I-related chain A; SAB, single-antigen beads; XM, crossmatch.

**Table 7. Avantages et limites des tests Luminex SAFB** (Tait et al., 2013).

Ces limites peuvent être surmontées par différentes approches complémentaires (entre autre) :

- Amélioration des processus de fabrication pour homogénéiser la répartition des molécules HLA synthétiques sur les billes.
- Programmes d'évaluation de qualité au sein des différents laboratoires. Limiter les variabilités inter tests. Définir les protocoles. Identifier localement les billes les moins fiables.
- Dilution des sera, application d'EDTA pour limiter l'effet prozone (Guidicelli et al., 2013) ;
- Traitement des billes à l'acide pour identifier des molécules HLA dénaturées,
- Analyse des immunoglobulines (Ig) impliquées dans le test et de leur capacité à activer le système immunitaire :
  - capacités à activer localement le complément (i) par analyse de la liaison au C1q (Otten et al., 2012) (Loupy et al., 2013), (ii) analyse de la formation locale de C4d.
  - sous-classes Ig (Honger et al., 2011), glycosylation différentielle du fragment Fc (Raju, 2008).
  - capacités hydrolytiques des IgG envers les facteurs de coagulation VIII et XIX (Wootla et al., 2008).

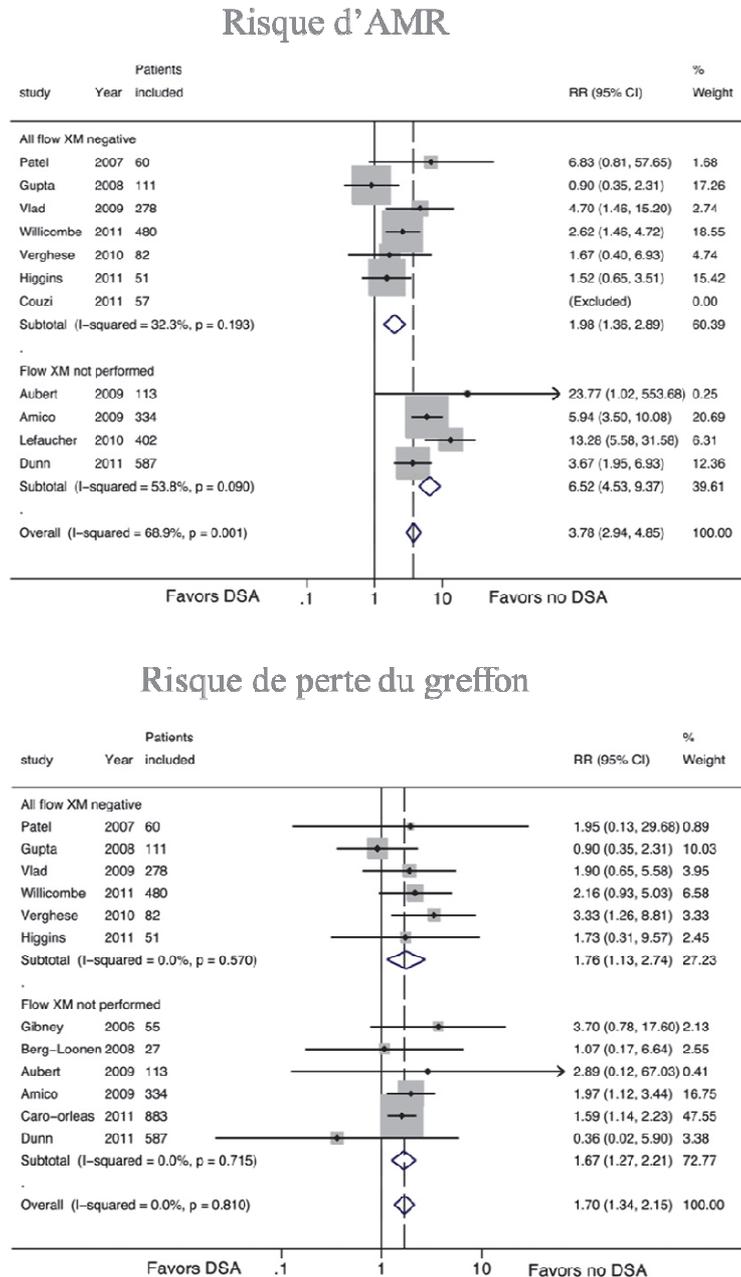
#### *d) Impact*

##### *(1) A la greffe*

Caractériser les DSA à J0 de la greffe fait partie des recommandations de bonne pratique.

(a) Dans la littérature

Nous disposons maintenant d'un recul suffisant pour établir que la présence de ces DSA préformés à la greffe impacte significativement le devenir de la transplantation rénale (Rejets Aigus à Médiation Humorale-AMR et survie du greffon), a fortiori quand ils sont associés à un crossmatch positif mais également quand ils sont isolés : OR d'AMR à 3.78 [1.34-2.15] et OR de perte du greffon à 1.7 [1.34-2.15]. Les études ayant évalué cette question sont reprises ci-dessous (figure 13 et tableau 8).



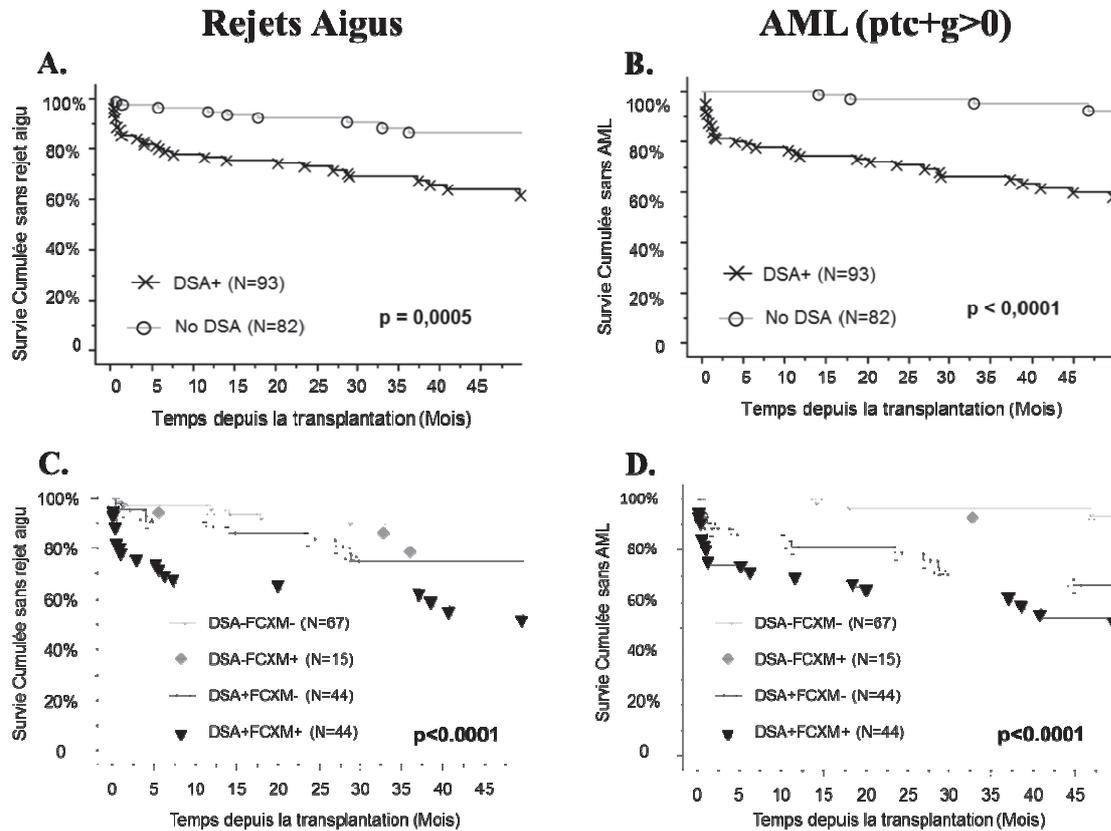
**Figure 13. Métaanalyse de l'effet des DSA à J0 sur le risque de rejet à médiation humorale (AMR) et de perte du greffon** (Mohan et al., 2012). Forest plots for risk stratified by flow crossmatch results. (High panel) Risk of AMR with and without DSA. (Bottom) Risk of graft failure with and without DSA. For all forest plots, the solid line represents the null effect. The dotted line represents the summary effect for the studies included in the analysis. The shaded boxes are proportional to the relative weight of the studies used in each analysis. The center dot within the box represent the point estimate for that study and the horizontal line passing through each square represents the confidence interval of each study point estimate. The center of the diamond represents the summary effect and the lateral tips of the diamond represent the confidence intervals of the summary estimate.

First author (reference)	Year	n	DSA+ (n)	DSA loci	Method	XM	Donor	Preselection (No.)	AMR	CR	GS
Bryan (117)	2006	10	10	AB	F-PRA/SAB	AHG-CDC, FCT	DD	CDC XM+/AHG XM-	30% but no control	ND	--
Gibney (118)	2006	136	20	ND	LSC	AHG-CDC	LD/DD	No	↑	ND	↓
Patel (119)	2007	330	21	AB DRDQ	LSC/F-PRA	CDC and FC T&B HI	LD	FC-	↑	--	ND
Burns (120)	2008	70	70	Class I and II, no details	LSC/SAB	FC T&B	LD (2 DD)	Desensitized	↑	ND	ND
Eng (121)	2008	83	27	AB DRDQB	LSC/SAB	CDC	DD	B-cell CDG+	↑	--	↓
Van Den Berg-Loonen (122)	2008	37	13	AB DRDQ	SAB	CDC	DD	AM program	ND	ND	--
Aubert (123)	2009	113	11	AB DRDQDP	LSC/SAB	CDC	LD/DD	Thymo for high risk	--	ND	--
Vlad (124)	2009	355	27	ABC DRDQ	LSC/SAB	CDC	DD	No	↑	ND	--
Phelan (125)	2009	64	12	ABC DRDQ	LSC/SAB	CDC	LD	Some had prospective FCXM; ELISA-	--	--	--
Gupta (126)	2009	121	16	ND	LSC/SAB	CDC	ND	No	--	--	--
Annico (127)	2009	334	67	AB DRDQDP	SAB	CDC T&B	LD/DD	No	↑	ND	↓ If AMR
Rietmuller (128)	2010	155	20	AB DRDQ	LSC/ELISA/SAB	Luminex	LD	Some had rituximab or ATG for high risk	↑ If class I DSA	ND	ND
Singh (129)	2010	237	159	AB DRDQ	SAB	CDC	DD	No	↑ If class II DSA	ND	↓ If DR DSA
Gloor (130)	2010	189	117 (12 XM-)	AB DRDQ	LSC/SAB	FC T&B	LD/DD	XM+ vs. XM-	↑	↑ If AMR	↓ In XM+
Leflaucheur (131)	2010	402	83/76 at time of transplantation	Class I and II no details	ELISA/SAB	CDC	DD	No	↑	ND	↓
Ishida (132)	2011	34	22	AB DR	F-PRA/SAB	CDC	LD	F-PRA+	↑	↑	NA
Higgins (134)	2011	112	84 (17 CDC XM+, 44 FC XM+, 23 only SAB)	ABC DRDQDP	LSC/SAB (most sera)	CDC/FC	LD/DD	Desensitized	↑	NS	↓
Susal (133)	2011	236	53	ABC DRDQAB DPAB	SAB	CDC	DD	CDC- and ELISA-; 3-yr GS	ND	ND	NS
Dunn (31)	2011	587	46	ABC DRDQAB DPAB	LSC/SAB	AHG-CDC T&B	LD/DD	Thymo	↑	↑	↓
Couzi (24)	2011	45	30 historic (28 D0)	ABC DRDQDP	LSC/ELISA/SAB after 2005	FC T&B	DD	FCXM+	↑	ND	--
Couzi (24)	2011	45	11	ABC DRDQDP	LSC/ELISA/SAB after 2005	FC T&B	DD	FCXM-	--	ND	--
Caro-Oleas (134)	2012	892	103	ABC DRDQDP	LSC/SAB	CDC	DD	Thymo for high risk	ND	ND	↓
Otten (73)	2012	837	290 (30 C1q <sup>+</sup> )	ABC DRDQ	SAB/C1qSAB	AHG-CDC, FCB	LD/DD	No	ND	ND	↓ If DSA I+ and II+

**Tableau 8. Différentes études ayant évalué l'impact des DSA préformés** (Tait et al., 2013). AHG, anti-human immunoglobulin; AMR, antibody-mediated rejection; BMT, bone marrow transplantation; CDC, complement-dependent lymphocytotoxicity; CR, cellular rejection; DD, deceased donor; DSA, donor-specific HLA antibodies; F, flow; FC, flow cytometry; GS, graft survival; HI, highly immunized; KL, combined kidney-liver transplantation; KP, combined kidney-pancreas; L, liver; LD, living donor; LMix, Luminex mix; LSC, Luminex screen; M, multivisceral; NA, not applicable; ND, not determined; Ped, pediatric; PRA, panel reactive antibody; SAB, single-antigen beads (Luminex or flow); XM, crossmatch.

(b) A Bordeaux

L'évaluation du risque immunologique intègre les résultats du crossmatch en cytométrie en flux en plus de l'analyse des DSA et du crossmatch en microlyphocytotoxicité. Notre expérience confirme les résultats de la littérature en terme de survenue de rejets aigus et de lésions à médiation humorale mais pas en terme de survie du greffon qui n'apparaît pas statistiquement significative (durée moyenne de suivi 41 mois).



**Figure 14. Expérience bordelaise de l'impact des DSA préformés en fonction des résultats du FCXM.** Définition DSA+ (MFI SAFB >500 pour Anticorps anti HLA dirigé contre molécule HLA exprimée par le donneur, en inculant HLA Cw et HLA DP). Définition FCXM+: Mean Channel Shift >20 sur les lymphocytes T (Couzi et al., 2011a) et MCS > 70 sur les lymphocytes B avec un auto XM n'augmentant pas dans les mêmes proportions (<1.5). Définition AML ptc+g>0 avec ou sans augmentation de créatinine (Rejets Aigus Humoraux cliniques et infracliniques). A. Kaplan Meier survie sans rejet pour les patients avec ou sans DSA, B. Kaplan Meier survie sans lésions de la microcirculation enregistrées à l'occasion de biopsies de greffon sur indication, C. Kaplan Meier survie sans rejet pour les patients avec ou sans DSA, Kaplan Meier survie sans lésions de la microcirculation enregistrées à l'occasion de biopsies de greffon sur indication,, D. Kaplan Meier survie sans lésions de la microcirculation enregistrées à l'occasion de biopsies de greffon sur indication, Kaplan Meier survie sans lésions de la microcirculation enregistrées à l'occasion de biopsies de greffon sur indication.

A la lumière des résultats publiés dans la littérature (Gloor and Stegall, 2010; Montgomery et al., 2011) et l'absence d'impact sur la survie du greffon, la hiérarchisation du risque immunologique a été modifiée : les seuils de positivité de ces FCXM (concept d'ARC Acceptable Reactive Crossmatch (Leone et al., 2012) pour des greffes HLA incompatibles) ont été revus à la hausse pour être considérés comme positifs : le seuil de canaux de fluorescence (MCS) a été monté de 20 à 45 pour les lymphocytes T et de 50 à 70 pour les lymphocytes B, sans que ce seuil sont complètement consensuel. De la hiérarchisation du risque immunologique découle la stratégie immunosuppressive (avec un niveau de preuve qui reste toutefois faible). La synthèse de ce protocole est présentée dans le tableau ci-dessous (tableau 9).

Stratification du risque immunologique	IMMUNISATION anti HLA+	○	●	●	●
	DSA+ J0 (MFI >500)	○	○	●	●
	FCXM+ J0 (MCS LT>50 et/ou MCS LB>70)	○	○	○	●
	Risque immunologique	RISQUE VERT	RISQUE ORANGE	RISQUE ROUGE	
Ttt	Induction	Anti IL2R	ATG	ATG+RTX +IVIg (x3)	CI
	IS	Libre (Protocoles)	FK/MMF	FK/MMF	
	CS	Arrêt précoce	Maintien	Maintien	

**Tableau 9. Protocole de prise en charge à J0 de la transplantation rénale à Bordeaux.** Anti IL2 Basiliximab, ATG Thymoglobuline, CI contreindication à la greffe, CS Corticostéroïdes, DSA Donor Specific Antibodies, FK Tacrolimus, FCXM Flow Cytometry Crossmatch, IS Immunosuppression, IVIg Immunoglobulines polyvalentes MCS Mean Channel Shift, MMF Mycophénolate Mofétil, RTX Rituximab, Ttt traitement à la greffe.

## (2) Après la greffe

La dynamique d'évolution des DSA après la greffe se dessine comme un paramètre tout à fait intéressant de monitoring dans la mesure où il semble associé au pronostic (Lefaucheur et al., 2007) (Everly et al., 2009; Everly et al., 2010). Les critères observés pourront être (i) persistance/ou non du DSA, (ii) diminution de sa MFI, (iii) évolution du nombre de DSA impliqué, (iv) association à un DSA de novo.

L'apparition de DSA ou DSA de novo (dnDSA) chez des patients immunisés anti HLA ou non immunisés à la greffe a fait l'objet de nombreuses études utilisant ces nouveaux outils diagnostiques dans une perspective clinique d'immunomonitoring. Les premières études les ont recherchés chez les patients présentant une perte de greffon. On peut retenir de façon schématique qu'ils sont retrouvés chez plus de 50% des patients qui perdent leur greffon suggérant bien leur implication majeure dans le processus de détérioration du greffon (Lee et al., 2002) (Worthington et al., 2003). Plus récemment, plusieurs équipes ont rapporté leur expérience de l'application de ces tests dans des protocoles locaux de monitoring prospectif ou dans des études transversales. Les principales études sont reprises dans le tableau 10. A partir de plus de 1500 patients, dépistés et identifiés pour leur dnDSA avec des techniques à haute résolution, on dégage que l'incidence des dnDSA est voisine de 15% (qu'on fasse une moyenne simple ou pondérée sur le nombre de patients par étude) à raison d'une immunisation de 12% la première année (risque maximal dans les six premiers mois) puis de 5% par an (Rebellato et al., 2011). De plus, elles confirment la forte association des dnDSA avec la survenue de rejets aigus, de lésions à médiation humorale, de dégradation du greffon et de perte du greffon.

Les axes de recherche de ce thème des dnDSA se concentrent aujourd'hui sur (i) la mise en évidence du rôle prépondérant des DSA anti DQ, avec de vraisemblables stratégies d'allocation basée à terme sur l'absence de mismatches DQ pour limiter au maximum le risque de cette immunisation néfaste sur le devenir du greffon, (ii) l'analyse de la capacité à fixer le C1q pour les DSA identifiés dans un test SAFB (Lefaucheur et al., 2013b) (Freitas et al., 2013).

Papier	Ref	N	Durée	Technique	% dnDSA	Impact
Hourmant, JASN 2005	(Hourmant et al., 2005)	543	5ans	ELISA	5,50%	DG, PG, TG
Mao, AJT 2007	(Mao et al., 2007)	54	5ans	Cytometrie	22%	PG
Li, Transplant Int 2008	(Li et al., 2008)	87	6mois	Cytometrie	5%	AML, PG
Lachmann, Transplantation 2009	(Lachmann et al., 2009)	1015	5ans	Cytometrie	12%	PG
Hidalgo, AJT 2009	(Hidalgo et al., 2009)	145	Crossectional	Cytometrie	22%	AML, PG
Gill, Transplantation 2010	(Gill et al., 2010)	84	1an	Cytometrie	11%	RA
De Vos, Clin Transplant 2011	(DeVos et al., 2011)	389	3ans	Cytometrie	25%	RA, DG, PG
Kanter Berga, Transplant Poc 2011	(Kanter Berga et al., 2011)	321	Crossectional	Cytometrie	7%	RA
Ntokou, Transplant Int 2011	(Ntokou et al., 2011)	597	>5ans	Cytometrie	15%	PG
Rebellato, Clin Transplant 2011	(Rebellato et al., 2011)	224	>3ans	Cytometrie	12%	-
De Vos , Kidney Int 2012	(DeVos et al., 2012)	347	26mois	Cytometrie	18%	PG
Ginevri, AJT 2012	(Ginevri et al., 2012)	82	4,3ans	Cytometrie	23%	AML, DG, PG
Liefeldt, AJT 2012	(Liefeldt et al., 2012)	126	3ans	Cytometrie	17%	AML, PG
Wiebe, AJT 2012	(Wiebe et al., 2012)	315	6,2ans	Cytometrie	15%	AML, PG
Willcombe, Transplantation 2012	(Willcombe et al., 2012)	505	Crossectional	Cytometrie	18%	AML, TG, PG
Chaudhuri, JASN 2013	(Chaudhuri et al., 2013)	130	2ans	Cytometrie	6%	RA, DG, PG
De Kort, AJT 2013	(de Kort et al., 2013)	638	Crossectional	Cytometrie	12%	AML, PG
Everly, Transplantation 2013	(Everly et al., 2013)	189	10ans	Cytometrie	25%	PG
Kamar, Clin Transplant 2013	(Kamar et al., 2013)	122	36mois	Cytometrie	7,50%	AML
<b>MOYENNE</b>		<b>5913</b>			<b>15%</b>	

**Tableau 10. Principales études ayant évalué l'incidence et l'impact des DSA de novo (dnDSA).** AML lésions médiées par les anticorps dont rejets à médiation humorale AMR, DG Dégradation Greffon, dnDSA de novo DSA PG Perte Greffon, RA Rejet Aigu, TG Glomérulopathie du Transplant.

### 3. Phénotype du rejet à médiation humorale

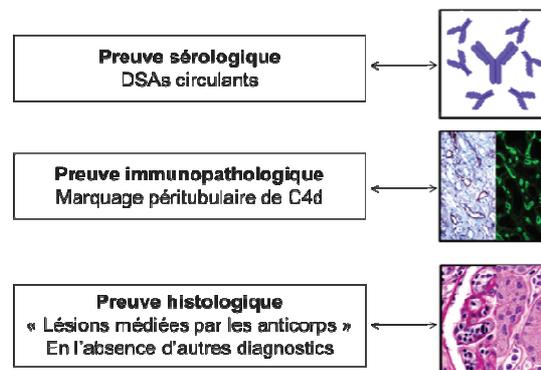
Le rejet à médiation humorale (AMR) est dit improprement « clinique » quand il s'associe à une détérioration biologique de la fonction du greffon et « infraclinique » quand la fonction du greffon est altérée (telle qu'on peut analyser la fonction rénale : créatinine, débit de filtration glomérulaire estimé, protéinurie). Le diagnostic d'AMR passe par la réalisation d'une biopsie du greffon. Les dernières classifications internationales de Banff (Solez et al., 2007) (Solez et al., 2008) (Sis et al., 2010b) (Mengel et al., 2012b) distinguent les rejets certains des suspicions de rejets en fonction de l'exhaustivité des différents critères regroupés pour en faire le diagnostic (tableau 11). En effet, comme formulée par Mengel (Mengel et al., 2012a), le phénotype des AMR passe par trois niveaux de preuves : preuve sérologique, preuve immunopathologique et preuve histologique (figure 15).

Banff 97 diagnostic categories for renal allograft biopsies—Banff '09 update

1. Normal
2. Antibody-mediated changes (may coincide with categories 3, 4 and 5 and 6)  
Due to documentation of circulating antidonor antibody, C4d,<sup>1</sup> and allograft pathology
- C4d deposition without morphologic evidence of active rejection
  - C4d+, presence of circulating antidonor antibodies, no signs of acute or chronic TCMR or ABMR (i.e. g0, cg0, ptc0, no ptc lamination (<5 layers by electron microscopy), no ATN-like minimal inflammation). Cases with simultaneous borderline changes are considered as indeterminate
- Acute antibody-mediated rejection<sup>2</sup>
  - C4d+, presence of circulating antidonor antibodies, morphologic evidence of acute tissue injury, such as (Type/Grade)
    - I. ATN-like minimal inflammation
    - II. Capillary and/or glomerular inflammation (ptc/g >0) and/or thromboses
    - III. Arterial – v3
- Chronic active antibody-mediated rejection<sup>2</sup>
  - C4d+, presence of circulating antidonor antibodies, morphologic evidence of chronic tissue injury, such as glomerular double contours and/or peritubular capillary basement membrane multilayering and/or interstitial fibrosis/tubular atrophy and/or fibrous intimal thickening in arteries
3. Borderline changes: "Suspicious" for acute T-cell mediated rejection (may coincide with categories 2 and 5, and 6)  
This category is used when no intimal arteritis is present, but there are foci of tubulitis (t1, t2 or t3) with minor interstitial infiltration (i0 or i1) or interstitial infiltration (i2, i3) with mild (t1) tubulitis
4. T-cell mediated rejection (TCMR, may coincide with categories 2 and 5 and 6)
- Acute T-cell mediated rejection (Type/Grade)
  - IA. Cases with significant interstitial infiltration (>25% of parenchyma affected, i2 or i3) and foci of moderate tubulitis (t2)
  - IB. Cases with significant interstitial infiltration (>25% of parenchyma affected, i2 or i3) and foci of severe tubulitis (t3)
  - IIA. Cases with mild to moderate intimal arteritis (v1)
  - IIB. Cases with severe intimal arteritis comprising >25% of the luminal area (v2)
  - III. Cases with "transmural" arteritis and/or arterial fibrinoid change and necrosis of medial smooth muscle cells with accompanying lymphocytic inflammation (v3)
- Chronic active T-cell mediated rejection  
"chronic allograft arteriopathy" (arterial intimal fibrosis with mononuclear cell infiltration in fibrosis, formation of neo-intima)
5. Interstitial fibrosis and tubular atrophy, no evidence of any specific etiology  
(may include nonspecific vascular and glomerular sclerosis, but severity graded by tubulointerstitial features)  
Grade
  - I. Mild interstitial fibrosis and tubular atrophy (<25% of cortical area)
  - II. Moderate interstitial fibrosis and tubular atrophy (26–50% of cortical area)
  - III. Severe interstitial fibrosis and tubular atrophy/loss (>50% of cortical area)
6. Other: Changes not considered to be due to rejection- acute and/or chronic (For diagnoses see table 14 in (49); may include isolated g, cg, or cv lesions and coincide with categories 2, 3, 4, and 5)

ATN, acute tubular necrosis.  
The 2009 updates are underlined. All existing scoring categories (g, t, v, i, ptc, cg, ct, ci, cv, eh, mm) remain unchanged (45, 49).  
<sup>1</sup>Please refer to Banff 2007 classification paper (45).  
<sup>2</sup>Suspicious for antibody-mediated rejection if C4d (in the presence of antibody) or alloantibody (C4d+) not demonstrated in the presence of morphologic evidence of tissue injury.

**Tableau 11. Classification histologique de Banff d'analyse de biopsies de greffon rénales (Solez et al., 2008)**



**Figure 15. Phénotype des rejets à médiation humorale.** Adapté de Mengel, M. Transpl Int. 2012 (Mengel et al., 2012a).

**a) Preuve Sérologique :**

Elle a été largement étayée dans le paragraphe précédent.

**b) Preuve Immunopathologique :**

La distinguer du reste du tableau est pertinent. Il s'agit d'envisager un marqueur diagnostique qui apporte des arguments pour attester qu'il y a eu in situ au sein du greffon, un anticorps dirigé contre le donneur.

**(1) C4d**

Actuellement, elle est basée sur la mise en évidence de dépôts de C4d dans les capillaires péritubulaires (Feucht et al., 1993). Le C4d est un marqueur indirect a posteriori de l'activation de la C3 convertase de la voie classique (C4bC2a). Il indique donc la présence d'un anticorps qui a activé suffisamment de complément par son fragment Fc pour générer des dépôts de C4d liés de façon covalente à la microcirculation. Il possède donc une double dimension fonctionnelle et spécifique. Sa présence suggère que 1. l'anticorps anti donneur impliqué était capable d'activer le complément (IgG1/G3, IgM, détectables par le C1q appliqué au test SAFB), 2. la voie d'activation du complément s'est poursuivie conduisant à (i) la production du complexe d'attaque capable de lyser la cible allogénique sur laquelle s'est planté le DSA, (ii) la production de résidus C5a fortement chemoattractants pour le reste du système immunitaire. On perçoit toutefois d'emblée sa limite principale : il occulte complètement la possibilité d'autres types d'action pathogène du DSA qui passerait par un mécanisme indépendant du complément.

**(2) Effets indépendants du complément des DSA sur leurs cibles**

D'autres types d'effets médiés par les DSA ont été rapportés :

**(a) Effets médiés par le fragment Fc des DSA.**

- Lyse dépendante de l'anticorps ou ADCC : Elle a été rapportée et explorée il y a près de 40 ans (D'Apice and Morris, 1974; Pierce et al., 1979). Elle a été redémontrée dans des modèles expérimentaux de souris immunodéficientes et déficitaires en complément chez qui on pouvait induire les lésions d'artériopathie du transplant après transfert passif de DSA avec un fragment Fc fonctionnel (Hirohashi et al., 2010; Lee et al., 2007). Elle est fortement suggérée par l'analyse des transcrits de biopsies avec rejets à médiation humorale qui retrouvent un enrichissement en transcrits d'INF- $\gamma$  : ce qui pourrait correspondre à l'activation produite par l'engagement des récepteurs activateurs au fragment Fc ; CD16-Fc $\gamma$ RIIIA présent sur les cellules NK (Hidalgo et al., 2010) (Hidalgo et al., 2012). Elle est à la base de nouveaux tests fonctionnels d'évaluation de la réponse humorale ; allo-CFC, cytométrie en flux sur cellules NK en conditions d'ADCC avec les sérums des patients (Toyoda et al., 2010) (Toyoda et al., 2012). Elle fait le lien avec les lésions histologiques inflammatoires de la microcirculation dans lesquelles sont retrouvées des cellules au contact des cellules endothéliales des capillaires péritubulaires et glomérulaires.
- Initiation du recrutement (Valenzuela et al., 2013) puis phagocytose des cellules cibles par les monocytes.

**(b) Activation de la cellule endothéliale.**

Les travaux du groupe d'E Reed ont montré dans un modèle contrôlé, que les DSA étaient capables d'activer directement la cellule endothéliale sur laquelle ils étaient fixés. Malgré l'absence de

molécules de signalisation intracellulaire, les molécules anti HLA agrégées par la fixation de l'anticorps pourraient recruter d'autres protéines membranaires via des interactions hétérotypiques en cis au sein de radeaux lipidiques fonctionnels : fonction d' « open conformers » et recrutement de la  $\beta 4$  intégrine, du FGFR ... (Arosa et al., 2007). En aval, différentes voies de signalisation peuvent être activées avec des réponses qui vont de la survie à la prolifération (figure 16).

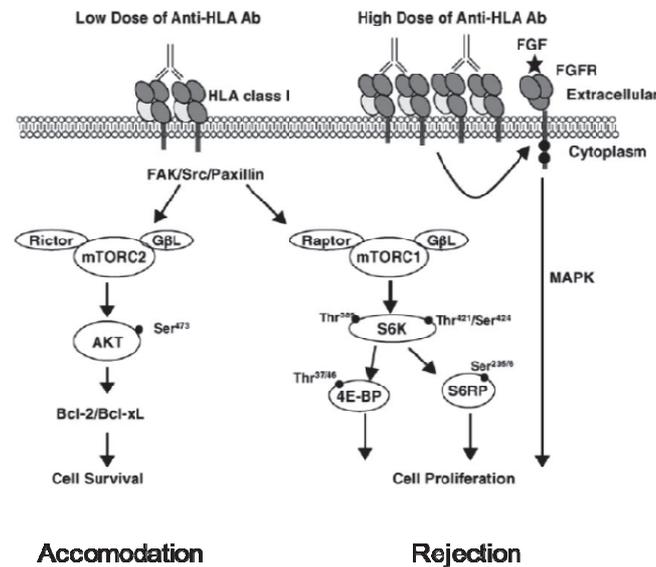


Figure 16. Dualité d'action des anti-HLA sur la cellule endothéliale (Jindra et al., 2008)

Au-delà, cette activation endothéliale est importante car elle fait le lien avec l'activation du système de la coagulation dont on pense qu'il est aussi impliqué dans la pathogénie des AMR (Kirk et al., 2009). Une de ces manifestations histologiques est la microangiopathie thrombotique qu'on peut observer dans certaines atteintes d'AMR sévères.

La mise en évidence de surexpression des transcrits d'activation endothéliale dans les biopsies de greffons avec AMR est une confirmation clinique des hypothèses soulevées par ces modèles (Sis et al., 2009). L'effet des DSA ne se résume pas à une lyse dépendante du complément mais passe aussi par une activation endothéliale au terme d'interactions sublytiques et de lyse dépendante de cellules de type ADCC.

En conclusion, le marquage C4d n'est pas un marqueur satisfaisant de la preuve immunopathologique de la présence d'un DSA pathogène et sa place est aujourd'hui réévaluée. Il est fluctuant d'une biopsie à l'autre et sa capacité prédictive à discriminer une évolution vers le rejet chronique est écrasée en analyse multivariée par l'existence de lésions histologiques de la microcirculation et la présence de DSA classe II (Loupy et al., 2011b). Il existe donc une place pour d'autres marqueurs de cette preuve immunopathologique.

### c) Preuve histologique

En reprenant l'analyse histologique de biopsies rénales sur indication, le groupe d'Edmonton a proposé de regrouper les différents items de la classification de Banff en différents clusters fonctionnels. Ont ainsi été définis les lésions médiées par les anticorps (AML) qui regroupent à la fois une inflammation de la microcirculation (ptc+g) et une détérioration de la microcirculation (Sis et al., 2010a). La même équipe a proposé l'utilisation du score ptc+g. Dès qu'il est supérieur à 0, il signe l'inflammation de la circulation. Sa présence est fortement associée à l'existence de DSA circulant en

plus d'avoir une valeur pronostique sur le risque d'évoluer vers la perte du greffon (Sis et al., 2012). C'est le paramètre histologique le plus spécifique des lésions médiées par les anticorps. Des lésions équivalentes ont été rapportées en transplantation cardiaque (Loupy et al., 2011a).

A un stade avancé, la glomérulopathie du transplant pourrait aussi être une signature tardive des lésions médiées par les anticorps : elle est associée à des éléments inflammatoires de la microcirculation dans plus de 70% des cas, avec des dépôts de C4d dans près d'1/3 des cas et des DSA circulants dans la 1/2 des cas (Sis et al., 2007) (Gloor et al., 2007) (Issa et al., 2008).

D'autres types de lésions histologiques ont aussi été associés au diagnostic d'AMR :

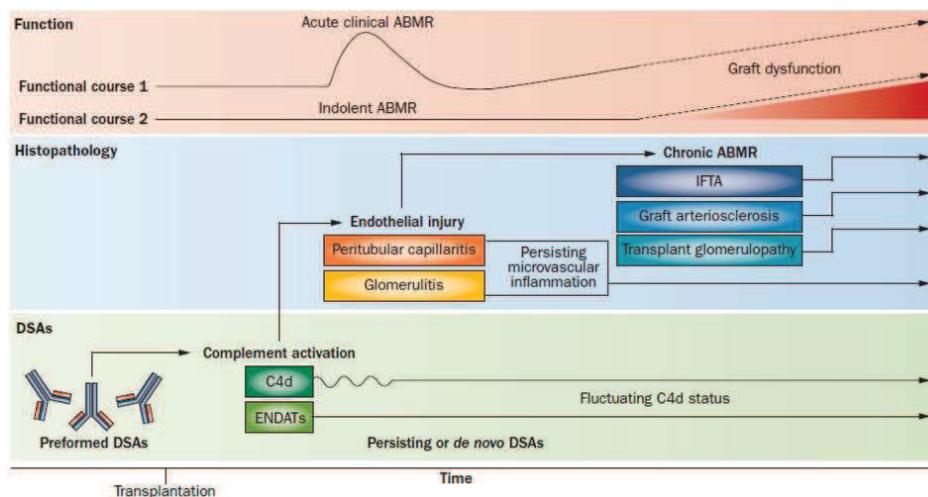
- Les lésions vasculaires sévères (AMR grade III) qui pourraient en réalité recouvrir une entité distincte (Lefaucheur et al., 2013a).
- Les lésions d'artériosclérose accélérée (épaississement fibreux de l'intima) qui répondent aux modèles expérimentaux murins sur les effets des DSA (Hill et al., 2011).
- Les lésions de microangiopathie thrombotique (Satoskar et al., 2010) (Meehan et al., 2011).
- Enfin la constitution d'organes lymphoïdes tertiaires pourraient jouer un rôle dans la pathogénie histologique des DSA. On sait depuis 10 ans que la présence de lymphocytes B et de plasmocytes dans l'interstitium du greffon est associée à un pronostic plus sévère (Sarwal et al., 2003) (Zarkhin et al., 2008). Ceux-ci pourraient s'organiser au niveau d'organes lymphoïdes tertiaires (OLT) de novo apparaissant au sein du greffon (Thaunat et al., 2005) avec différentes explications possibles : la récapitulation du programme embryonnaire d'organogénèse lymphoïde (Thaunat et al., 2010b), l'hypothèse d'un défaut propre de drainage lymphatique participant à sa néogénération (Thaunat et al., 2006), la production locale d'anticorps allogéniques et auto immuns dans un contexte dérégulé (Thaunat et al., 2012) et inflammatoire médié par Th17 (Deteix et al., 2010) Ces organes lymphoïdes ne seraient pas accessibles à un traitement (Thaunat et al., 2008) et ont surtout été retrouvés dans les greffons dysfonctionnels.

Toutefois, malgré l'existence de scores histologiques internationaux, il existe une grande variabilité interobservateurs (Gibson et al., 2008) ; si bien que cette preuve histologique doit être remplacée par rapport aux deux autres éléments de définition du phénotype d'AMR.

#### **4. Histoire naturelle**

On parvient in fine à une histoire naturelle du DSA qui a été reformulée par Loupy et Jordan à partir du modèle initial de Colvin (Colvin and Smith, 2005), en y intégrant les éléments les plus récents (Loupy et al., 2012) (figure 17).

Ce type d'approche a permis d'attribuer près des 2/3 des pertes de greffons tardives à des phénomènes impliquant les DSA et la réponse humorale (Einecke et al., 2009) (Gaston et al., 2010). Celle-ci est moins bien contrôlée par les thérapeutiques immunosuppressives en place et particulièrement délétère chez les patients non observants (Wiebe et al., 2012) (Sellares et al., 2012). Au-delà de la reconnaissance de nouveaux DSA et son association avec un phénotype d'AMR qui permet de hiérarchiser le risque immunologique en fonction du pronostic à différents temps forts de la transplantation (tableau 12), c'est la question thérapeutique qui est posée. Quelle option choisir pour interférer avec cette histoire naturelle et à quel moment l'administrer ?



**Figure 17. Histoire naturelle de la détérioration de l'allogreffe médée par les anticorps anti-donneur** (Loupy et al., 2012). DSAs can come from two sources: either from preformed DSAs or *de novo* DSAs. If DSAs are complement activating (i.e. IgG1 and IgG3), the classic complement pathway is rapidly activated through IgG binding and activation of C1q. C4d deposition in peritubular capillaries may be present and may oscillate with time. High expression of intra-graft endothelial-specific transcripts (ENDATs) is observed indicating ongoing damage. Endothelial injury will manifest by microvascular inflammation lesions: glomerulitis and peritubular capillaritis. In presensitized patients, these lesions are universally observed, monomorphic in nature, and tend to persist over time triggering accelerated interstitial fibrosis and tubular atrophy, graft arteriosclerosis (Banff classification cv) and transplant glomerulopathy (Banff classification eg). Chronic ABMR lesions are not reversible and will worsen with time. Regardless of whether the initial clinical presentation is acute deterioration of function or indolent, the disease will progress. Graft function decreases at different rates depending on the severity of initial presentation, type of treatment and response to treatment. Abbreviations: ABMR, antibody-mediated rejection; DSAs, donor-specific anti-HLA antibodies; ENDATs, endothelial-associated transcripts; g, glomerulitis; IFTA, interstitial fibrosis and tubular atrophy.

Clinical phenotype*	DSA status	C4d status	Comments
Acute clinical ABMR	+++	Positive	Classical form of ABMR defined by Banff criteria
Indolent ABMR	++	Positive	Truncated form of ABMR
Microcirculation inflammation	+	Negative	Muted form of ABMR
No humoral lesions	+	Positive	Accommodation? <sup>‡</sup> May develop full-blown ABMR or indolent ABMR.
No humoral lesions	+/-	Negative	May change category and develop into full-blown ABMR or indolent ABMR in the future

**Tableau 12. Différentes présentations des lésions à médiation humorale en pratique Clinique** (Loupy et al., 2012). \*Risk of progression to chronic ABMR and kidney failure decreases down the table. <sup>‡</sup>Patients without graft pathology but with circulating DSAs and C4d deposition may have the process known by the underlying term of 'accommodation'; this entity is seldom observed among DSA-positive kidney recipients and most of these patients will develop subsequent ABMR lesions.

## 5. Thérapeutique

Les traitements actuellement disponibles qui ciblent la réponse B bénéficient d'un très faible niveau de preuve d'efficacité (rituximab (Lefaucheur et al., 2009) (Loupy et al., 2010) (Sautenet et al., 2013) ; IVIg (Glantz et al., 2002) (Montgomery et al., 2011), Plasmaphèreses et immunoadsorption (Morath et al., 2011), bortezomib (Sberro-Soussan et al., 2010) (Walsh et al., 2012), eculizumab (Stegall et al., 2011)) et pourraient être associés à un sur-risque infectieux (Kamar et al., 2010). En outre, la mise en œuvre de thérapeutiques ciblant la cellule B expose à une déstabilisation des équilibres de régulation en déplaçant le pool de lymphocytes B transitionnels aux propriétés régulatrices, dont la conséquence en transplantation rénale pourrait être préjudiciable (sur-risque de rejet aigu) en fonction du moment de l'injection (Clatworthy et al., 2009) (Thaumat et al., 2010a). Ces restrictions sont également à mettre en perspective avec les résultats obtenus chez les patients greffés rénaux tolérants opérationnels qui présentent dans leur sang circulant une signature fortement enrichie en transcrits B (Newell et al., 2010) (Sagoo et al., 2010) ainsi que la possibilité de transférer cette tolérance dans un modèle animal par la réinjection cellules B (Le Texier et al., 2011).

## 6. Lésions de l'allogreffe

En conclusion, on a vu la capacité des DSA à induire un phénotype clinique, biologique et histologique en transplantation rénale. Ils semblent effectivement contribuer de façon déterminante à la détérioration du greffon. Il est frappant de retrouver dans les modèles expérimentaux et chez l'homme plusieurs similitudes au niveau des cellules cibles endothéliales et épithéliales entre CMV et DSA. Le tableau 13 en fait une synthèse. On retiendra en particulier la lésion vasculaire chronique qui est partagée entre CMV et DSA (sclérose vasculaire du transplant et artériosclérose du transplant) et de façon plus anecdotique la néogénèse lymphatique d'OLT partagée entre DSA et CMV (elle pourrait être induite par certains types d'infections à CMV dans un modèle murin).

	Cellule endothéliale	Cellule épithéliale
Lyse cellulaire complète	<p>1-Cytotoxicité dépendante du Complément. Dépôts de C4d (Feucht et al., 1993). Rôle sous classe Ig (Bindon et al., 1988; Lefaucheur et al., 2013b).</p> <p>2- Cytotoxicité cellulaire médiée par l'anticorps (ADCC) via les récepteurs aux Fc des immunoglobulines (Fc<math>\gamma</math>RIIIA-CD16) (Hirohashi et al., 2010). Rôle de cellules CD16+ effectrices INF-<math>\gamma</math>+ (Hidalgo et al., 2012; Hidalgo et al., 2010; Sellares et al., 2013). Rôle sous classe Ig (Bruhns et al., 2009; Raju, 2008).</p>	<p>Modification histologique en rapport avec atrophie tubulaire. Perte des fonctions d'interface (Ex rein : sécrétion/réabsorption hydroélectrolytique).</p>
Lyse cellulaire incomplète/ Modification de la biologie cellulaire	<p>1-Activation de la cellule endothéliale (Modèles expérimentaux (Read et al., 1994; Saadi and Platt, 1995; Tedesco et al., 1997; Yamakuchi et al., 2007) et corrélaton histologique (Sis and Halloran, 2010). Rôle immunologique allogénique. Recrutement leucocytaire/ expression de molécules d'adhésion. Activation des voies de la coagulation (Drachenberg and Papadimitriou, 2013; Xu et al., 2006), Modifications du cytosquelette (Ziegler et al., 2012) et fonctionnelles (ex : dysrégulation NO synthase (Koh et al., 2004)).</p> <p>2-Signaux de survie (Bach et al., 1997), engagement dans un processus de prolifération (Zhang et al., 2010b), modifications histologiques en rapport : artériosclérose accélérée (Modèles expérimentaux (Galvani et al., 2011; Russell et al., 1994; Shi et al., 1996; Uehara et al., 2005)/et corrélation histologique (Hill et al., 2011))</p> <p>3- Inflammation chronique type Th1 (Dean et al., 2012; Homs et al., 2009)</p>	<p>1-Activation de la cellule épithéliale ?</p> <p>2-Engagement dans un processus de dédifférenciation cellulaire et de transition épithélio-mésenchymateuse (indirect via (Einecke et al., 2010; Vongwiwatana et al., 2005)), modifications histologiques en rapport (fibrose interstitielle) (Solez et al., 2008)</p>

Tableau 13. Mécanismes supposés de détérioration endothéliale et épithéliale médiée par les DSA.

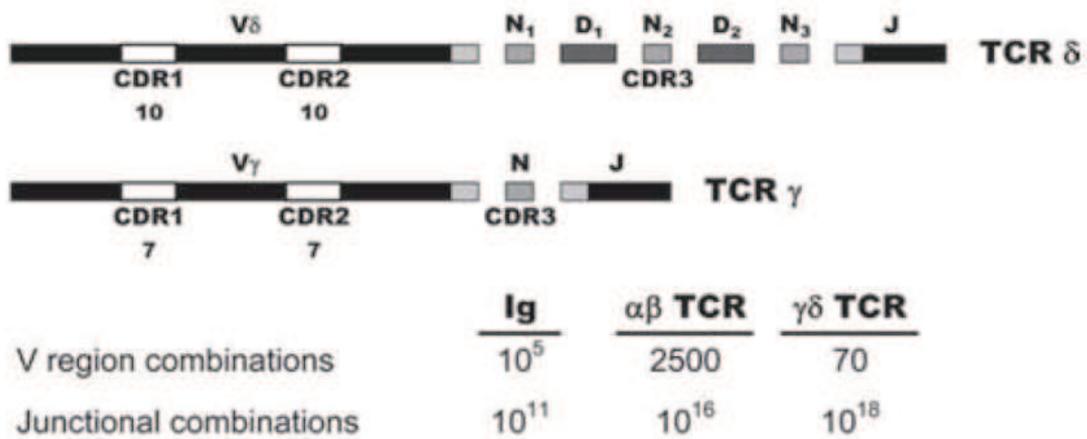
## D. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

La transplantation rénale fournit un contexte immunologique remarquable : une nouvelle homéostasie immunologique apparaît comme la résultante de l'équilibre entre réponse allogénique et pression immunosuppressive. La relation hôte-greffon modifie le rapport au danger immunologique. Les relations hôtes-pathogènes et hôtes-tumeurs sont redéfinies dans un univers distinct de l'univers physiologique. Ainsi, le rôle de certaines populations lymphocytaires non classiques, habituellement minoritaires ou mal définies (cellules NKT, ...), a été réévalué, notamment parce qu'elles pourraient avoir une sensibilité différente de celle des populations classiques aux immunosuppresseurs. Dans ce contexte, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  pourraient avoir une place car les éléments qui régulent négativement leur expansion sont diminués (compétition des cellules T  $\alpha\beta$  pour l'IL-15 et l'IL-7 (Do and Min, 2009; French et al., 2005)). Leur rôle a longtemps été négligé car elles ne semblaient pas alloréactives (Jutte et al., 1990; Vaessen et al., 1991). Il s'agit pourtant de cellules polyréactives d'interface, peut-être moins sensibles à l'immunosuppression (Mentzel et al., 1993) (Pawelec et al., 1995) qui justifient pleinement qu'on s'y intéresse.

### 1. Génétique et Structure

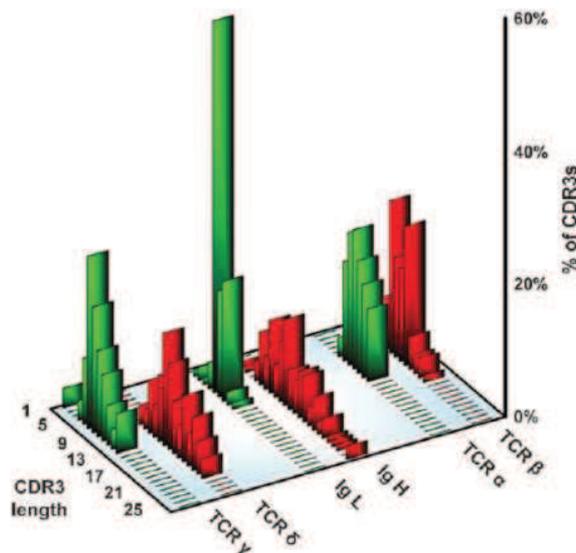
L'histoire des cellules T  $\gamma\delta$  débute en 1984 avec l'identification de la chaîne  $\gamma$  sous la forme d'un gène réarrangé dans un clone T  $\alpha\beta$  (Saito et al., 1984). Le locus  $\delta$  a ensuite été identifié à l'intérieur du locus codant pour la chaîne  $\alpha$  du TCR  $\alpha\beta$  (Chien et al., 1987). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont caractérisés par leur récepteur cellulaire T (TCR) : il s'agit d'un récepteur hétérodimérique comprenant deux chaînes polypeptidiques contenant chacune deux domaines de la superfamille des immunoglobulines (Barclay, 2003) avec un domaine amino-terminal (NH<sub>2</sub>) V et un domaine carboxyterminal (COOH) C, stabilisées par un pont disulfure. Sa structure complète a été obtenue à la fin des années 2000 (Li et al., 1998) (Allison et al., 2001). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  possèdent bien des caractéristiques de l'immunité adaptative dans la mesure où ils sont capables de créer de la diversité dans la génération de leur TCR par des mécanismes de réarrangements géniques combinatoires (combinaisons aléatoire des différents segments géniques) et jonctionnels (ajout et élimination aléatoire de nucléotides aux jonctions V-(D)-J). Les protéines constituant les chaînes du TCR sont codées par des gènes réarrangés au niveau somatique à partir d'un pool de segments variables (V), de diversité (D), de jonction (J) et constants (C). Le chromosome 7 porte la famille de gènes codant pour la chaîne  $\gamma$  (160kb, comprenant 14 gènes variables (V) dont 6 sont fonctionnels, 5 gènes jonctionnels (J) et 2 gènes codant pour la région constante (C) mais pas de gènes de diversité (D)). Le chromosome 14 porte le locus  $\delta$ , à l'intérieur du locus  $\alpha$  (1000kb, comprenant 8 segments V mais seulement 3 vrais gènes (V $\delta$ 1, 2 et 3) les 5 autres pouvant réarranger avec les régions constantes  $\alpha$  ou  $\delta$  (Kazen and Adams, 2011), 4 segments J, 3 segments D et une région unique C) (Lefranc, 1990).

A la différence des récepteurs des autres acteurs de l'immunité adaptative capables de créer de la diversité somatique, le TCR  $\gamma\delta$  est généré avec moins de diversité combinatoire du fait d'un nombre restreint de segments V. Cette apparente restriction est pourtant contrebalancée. La spécificité antigénique du TCR est portée par trois régions hypervariables appelés CDR (pour Complementary-Determining Region). Les régions CDR1 et CDR2 sont codés par des segments V alors que la région CDR3 est codée par une recombinaison V-(D)-J. Si la diversité potentielle de la chaîne  $\gamma$  est limitée du fait de l'absence de segments D (approximativement 100), la diversité potentielle générée par les recombinaisons aux jonctions V-D-J de la chaîne  $\delta$  est la plus large de l'ensemble des récepteurs à l'antigène (approximativement  $10^{16}$ ) : les segments D peuvent être dupliqués, lus dans un sens ou dans l'autre, inversés (Elliott et al., 1988), tout en maintenant les potentialités des enzymes codés par RAG (Recombining Activating Gene) d'excision et d'addition aléatoires de nucléotides au niveau de chacune des jonctions. La figure ci-dessous fait la synthèse de cette diversité (figure 18).



**Figure 18. Diversité potentielle des séquences d'acides aminés des récepteurs immuns.** (Chien and Bonneville, 2006). The calculated potential amino acid sequence diversities in immunoglobulin (Ig) (without allowance for somatic hypermutation) and  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  TCR genes are shown. The first two hypervariable regions of Ig and TCRs (CDR1 and CDR2) are encoded within the V gene segments. The pairing of the random V gene segments (VH and VL, V $\alpha$  and V $\beta$ , V $\gamma$  and V $\delta$ ) generates the combinatorial diversity listed as V region combinations. The third hypervariable regions (CDR3s) are encoded within the D and the J gene segments and are listed as junctional combinations. The mechanisms for diversity generation used for this calculation include different D and J gene segment usage, N nucleotide addition of up to six nucleotides at each junction, variability in the 3' joining position in V and J gene segments and translation of D gene segments in different reading frames. Numbers are corrected for out-of-frame joining, codon redundancy and N region mimicry of germline sequences as detailed in Elliott et al. (Elliott et al., 1988). The last few amino acids from the TCR V gene segments also contribute to CDR3 diversity, but their effects are negligible and are not included in the calculation.

La conséquence de ces réarrangements géniques est la génération d'une protéine à la surface tertiaire unique avec des variations dans la taille et la variabilité des régions CDR3 entre les différents TCRs  $\gamma\delta$  (associant souvent un CDR3 court pour la chaîne  $\gamma$  et long pour la chaîne  $\delta$  ; 8-21 acides aminés).



**Figure 19. Distribution de la longueur des CDR3 de différentes chaînes de récepteurs immuns spécifiques d'antigène** (Chien and Königshofer, 2007). The CDR3 length is defined as four amino acids less than the number of amino acid residues between the J region-encoded GXG triplet, where G is glycine and X is any amino acid, and the nearest preceding V region-encoded cysteine. Histograms show percentages of CDR3 sequences at given lengths in human chain families.

Cette structure de la partie variable du TCR  $\gamma\delta$  a fait dire à Chien que la reconnaissance de son ligand par le TCR  $\gamma\delta$  s'apparentait plus à une reconnaissance de type lymphocyte B que lymphocyte T  $\alpha\beta$  (Chien and Konigshofer, 2007). Malgré l'existence d'un progéniteur commun pour les lymphocytes T  $\gamma\delta$  et  $\alpha\beta$  (Dudley et al., 1995) et de leur maturation thymique intriquée (Bonneville et al., 1989) (Silva-Santos et al., 2005) (Kisielow et al., 2011) et de leur expression partagée du CD3, le TCR du lymphocyte  $\gamma\delta$  tel qu'il a pu être analysé en cristallographie (Li et al., 1998; Allison et al., 2001; Shin et al., 2005; Willcox et al., 2012; Xu et al., 2011) ressemble peut-être finalement plus à un BCR qu'à un TCR  $\alpha\beta$  (Poljak et al., 1973). Son architecture lui permet également de ne pas être restreint par une reconnaissance de l'antigène au sein d'une structure de chargement type molécule présentatrice de type CMH tel qu'on peut le voir avec le TCR  $\alpha\beta$ . Ceci est à pondérer par les résultats montrant l'implication de tous les CDR, y compris CDR1 et 2 dans l'activation des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 par les phosphoantigènes (Wang et al., 2010a) ce qui suggèrent, au moins pour ce sous type qu'une molécule de présentation intermédiaire est nécessaire.

A noter qu'il a été récemment montré que l'engagement des lymphocytes T  $\alpha\beta$  avec le ligand complexé aux MHC durant la sélection thymique et l'activation périphérique T n'imposait qu'une contrainte modérée sur la structure du TCR même. Ce qui fait dire aux auteurs que la restriction au ligand par le CMH n'est pas portée par le TCR et que l'interface d'interaction est plus « opportuniste que prédéterminée » (Holland et al., 2013). Ces résultats répondent à ceux du groupe de Singer : un répertoire de lymphocytes T  $\alpha\beta$  non restreint au CMV peut être généré en l'absence de CD4 et CD8 (Van Laethem et al., 2007). La disponibilité de lck serait essentielle (Van Laethem et al., 2013) : elle serait exclue du signalosome TCR par les corécepteurs sauf si le ligand des corécepteurs et du TCR est commun - ce qui est le cas quand le TCR est restreint par le CMH et associé à CD4 ou CD8. A l'inverse, en l'absence de corécepteurs, la lck est libre et alors les TCR  $\alpha\beta$  sont sélectionnés par n'importe quel antigène exprimé dans le thymus, tel qu'ils ont pu le montrer avec CD155. C'est vraisemblablement dans cette perspective qu'il faut replacer l'activation et la sélection des lymphocytes T  $\gamma\delta$  double négatif pour CD4 et CD8.

En outre, l'analyse des régions variables CDR impliquées dans l'interaction du TCR  $\gamma\delta$  avec son ligand suggère étonnamment que les déterminants de la reconnaissance antigénique des TCR  $\gamma\delta$  seraient codés par des portions de segments germinaux VDJ, alors que celle des TCR  $\alpha\beta$  principalement codée par les nucléotides ajoutés/délétés aléatoirement au niveau des jonctions entre les segments germinaux. De plus, la génération du répertoire  $\gamma\delta$  associe une phase de maturation thymique et extrathymique (Parker et al., 1990). Cette double constatation a fait formuler l'hypothèse intéressante (mais non vérifiée) que les composants du TCR  $\gamma\delta$  codés par les segments germinaux permettraient de reconnaître un nombre limité d'épitopes antigéniques associés à différentes molécules dépendantes du contexte, et que la capacité adaptative du TCR  $\gamma\delta$  permettrait de moduler l'affinité du TCR pour l'antigène et ses molécules associées (Born and O'Brien, 2009). Ce mécanisme ne serait alors pas si éloigné des étapes d'hypermutations somatiques de la cellule B au niveau du centre germinatif.

L'organisation du système immunitaire adaptatif en un système tripartite existait déjà chez la lamproie (trois récepteurs distincts, deux liés à la membrane et un sécrété), organisme charnière dans l'évolution du système immunitaire puisqu'un des premiers à disposer de capacités de réarrangement génique (combinatoire exclusivement) (Boehm et al., 2012). Il a été maintenu sur plusieurs millions d'années. Les principales différences sont reprises dans le tableau 14.

Characteristic	$\alpha\beta$ T cells	$\gamma\delta$ T cells	B cells
Antigen-receptor configuration	CD3 complex + $\alpha\beta$ TCR	CD3 complex + $\gamma\delta$ TCR	Ig
Theoretical receptor number	$\sim 10^{15}$	$\sim 10^{20}$	$\sim 10^{11}$
Antigen recognition	Peptide + MHC	Protein and non-protein	Protein and non-protein
MHC restriction	Yes	Rare	No
Phenotype	CD4 <sup>+</sup> or CD8 <sup>+</sup>	Most are CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> ; iIELs are CD8( $\alpha\alpha$ ) <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup> CD20 <sup>+</sup>
Frequency in blood	65–75%	1–5% (25–60% in gut)	5–10%
Distribution	Blood and lymphoid tissues	Blood, epithelial and lymphoid tissues	Blood and lymphoid tissues
Effector capability	CTLs (CD8 <sup>+</sup> ) Cytokine release ( $T_H1/T_H2$ )	CTLs Cytokine release ( $T_H1 > T_H2$ )	Ig production
Function	Immune protection and pathogen eradication	Immunoregulation and immunosurveillance	Humoural immunity

CTLs, cytotoxic T lymphocytes; iIELs, intestinal intraepithelial T lymphocytes; Ig, immunoglobulin;  $T_H$  cell, T helper cell; TCR, T-cell receptor. Data adapted from REFS 64,65.

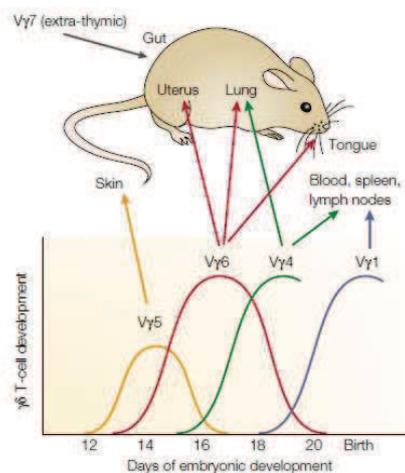
**Tableau 14. Différences entre les trois compartiments du système immunitaire adaptatif : lymphocytes T  $\alpha\beta$ , lymphocytes T  $\gamma\delta$  et lymphocytes B** (Carding and Egan, 2002).

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  empruntent des caractéristiques aux deux autres systèmes mais leur maintien au cours de l'évolution ne peut s'expliquer que par un gain fonctionnel permettant un avantage évolutif. Nous allons voir comment, au travers de l'étude de leur ontogénie et des trois paramètres qui semblent à même de définir au mieux chaque lymphocyte T  $\gamma\delta$

- Un TCR  $\gamma\delta$  spécifique d'un ligand,
- Un tropisme tissulaire,
- Une fonction.

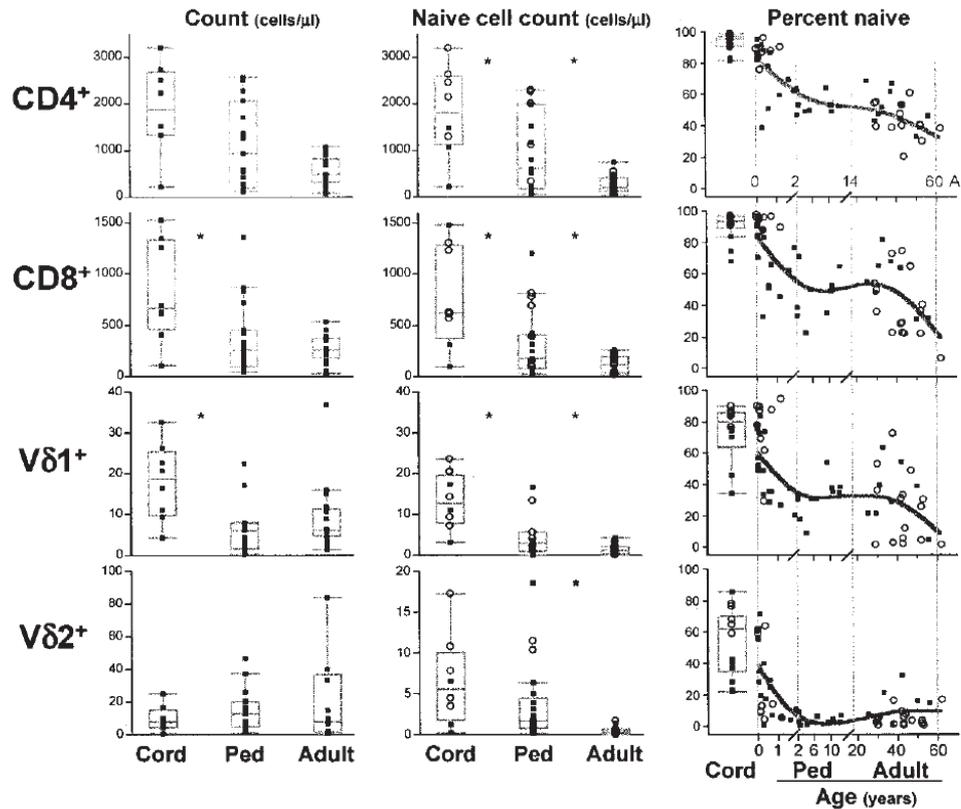
## 2. Ontogénie

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont les premiers lymphocytes T à se développer chez les vertébrés. Ils sont prédominants pendant tous les stades précoces du développement fœtal. Ils suivent un développement programmé avec la génération de plusieurs vagues successives de TCRs associant différentes chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  en fonction du tissu vers lequel ils migreront. La figure 20 récapitule ainsi ce qui est connu chez la souris (Carding and Egan, 2002) mais le principe semble être le même chez l'homme dès la huitième semaine de développement foetal (Havran and Allison, 1988) (Krangel et al., 1990).



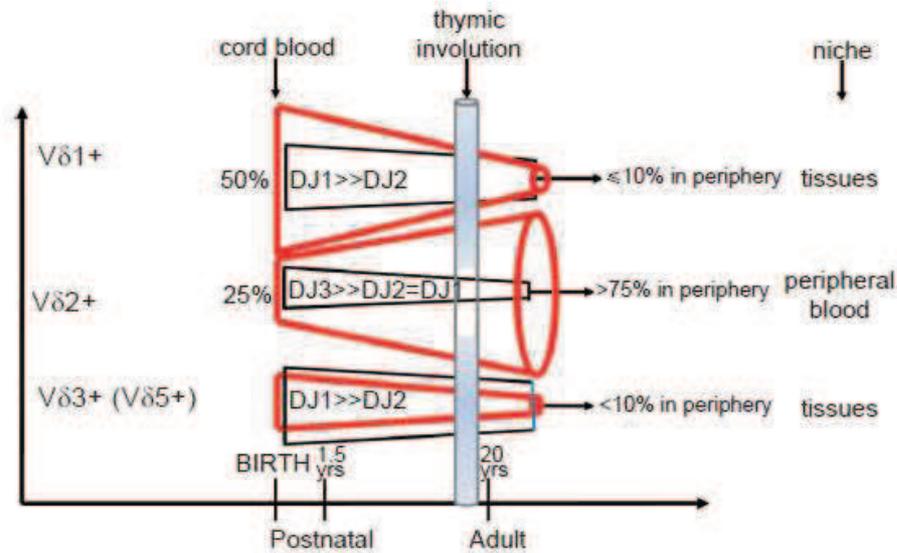
**Figure 20. La génération de cellules  $\gamma\delta$  T murines suit un développement programmé** (Carding and Egan, 2002).  $\gamma\delta$  T cells bearing T-cell receptors that are encoded by specific  $V\gamma$ -gene segments (see graph) are exported from the thymus at defined periods of fetal and neonatal development, and then migrate to and populate different epithelial-rich tissues in adult animals. The development of some  $V\gamma7^+$  intestinal intraepithelial lymphocytes might be thymic independent.

L'évolution quantitative et phénotypique des lymphocytes T  $\gamma\delta$  du sang chez l'homme a été analysée chez des nouveau-nés, des enfants et des adultes (De Rosa et al., 2004), permettant de démontrer que le répertoire était rapidement orienté vers l'utilisation de caractéristiques jonctionnelles récurrentes, une restriction des chaînes utilisées, privilégiant l'association V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 et un profil de cellules mémoires (figure 21).



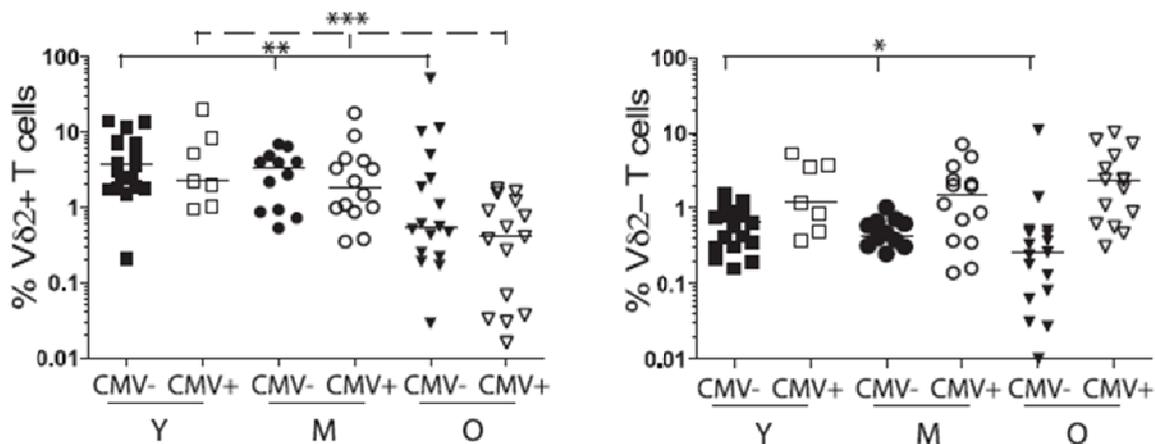
**Figure 21. Evolution des phénotypes naïfs dans différentes sous-populations lymphocytaires chez l'homme** (De Rosa et al., 2004). The percentages and absolute counts of  $\gamma\delta$  T cells that are naive drop early in life. Data for CD4 (*upper row*), CD8 (*second row*), V1 (*third row*), and V2 (*lower row*) T cells are shown. Subsets have been gated as CD3, EMA (live), scatter-gated lymphocytes. Naive cells have been additionally gated by two markers in some subjects (CD45RO CD11adull, squares), or by three markers in other subjects (CD45RO CD11adull CD27bright, E). The absolute counts for the overall subset (*left panels*) and the naive subsets (*middle*) are plotted for the cord, pediatric, and adult blood samples. Absolute counts have been calculated by multiplying the subset frequency relative to lymphocytes by the absolute lymphocyte count determined from the complete blood count. An asterisk indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) between adjacent groups. The graphs on the *right* indicate the percentage of cells within the indicated subset that is naive plotted vs age. The age axis is displayed with three scales (0–2, 2–14, above 14 years) so that the infant and pediatric scales are expanded. The percentage of cord blood cells that are naive is grouped on the *left side* in these graphs.

Cette évolution est compatible avec une stimulation répétée par des antigènes environnementaux ou une stimulation chronique par des ligands endogènes surexprimés durant les stades précoces du développement, comme autant de « rites de passage » (Kalyan and Kabelitz, 2013). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  subissent vraisemblablement un mécanisme de sélection positive basée sur l'interaction avec ces ligands (Wells et al., 1991). La maturation du compartiment T  $\gamma\delta$  a en tout cas lieu précocement dans le thymus et en extrathymique. Il faut retenir que dans le sang circulant, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont majoritairement des lymphocytes portant un TCR associant les chaînes V $\gamma$ 9 et V $\delta$ 2, présentant un phénotype de cellules mémoire.



**Figure 22. Diagramme schématisque des changements dans la diversité du répertoire au cours du développement chez l'homme.** (Kalyan and Kabelitz, 2013). At birth,  $\gamma\delta$  T cells show high junctional diversity, which is generated through the addition of 'P' (palindromic) and 'N' (nontemplated) nucleotides while combining the V-D-J segments of their TCR. Despite the limited variable genes available for  $\gamma\delta$  T cells, their potential for junctional diversity rivals that of  $\alpha\beta$  T cells. However, with age, the diversity that is observed at birth gets noticeably restricted, especially for the main pool of circulating cd T cells, the  $V\gamma9V\delta2$  T cell subset, which are a minor population in cord blood but become the predominant subset in circulation by 1 year of life. TCR, T cell receptor.

Ces lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\gamma9V\delta2$  circulants sont à différencier des lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\delta2^{neg}$  (non  $V\gamma9V\delta2$ ). Ceux-ci sont majoritaires aux stades précoces du développement puis progressivement minoritaires. Leur localisation est plus tissulaire que sanguine (cf infra). Leur phénotype est initialement naïf, mais il est vraisemblable que dans leur niche, ils présentent aussi un phénotype mémoire différencié. Il a été montré que le CMV et l'âge impactait le pool de lymphocytes T  $\gamma\delta$   $V\delta2^{neg}$  circulants indépendamment du thymus en assurant une expansion, une restriction de répertoire et un switch phénotypique vers un profil de cellules mémoire (Vermijlen et al., 2010) (Pitard et al., 2008; Roux et al., 2013) (figure 23).



**Figure 23. Changement dans la fréquence des sous-types de cellules  $\gamma\delta$   $V\delta2^{neg}$  et  $V\delta2^{pos}$  avec l'âge et l'infection à CMV** (Roux et al., 2013). Percentage of  $V\delta2^{pos}$  (left panel) or  $V\delta2^{neg}$  (right panel)  $\gamma\delta$  T cells in young (Y, n=26), middle-aged (M, n=26), and old (O, n=28) adults, according to CMV serostatus. Bars indicate the median. The Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests were used for comparing two groups or three or more groups, respectively. \*p , 0.05, \*\*p , 0.01, \*\*\*p , 0.001

## PREPROGRAMMATION THYMIQUE

Un gros travail est actuellement réalisé chez la souris sur les modalités d'une préprogrammation développementale du répertoire T  $\gamma\delta$ . Il a permis d'identifier le rôle de SKINT-1, dont l'expression au niveau des cellules épithéliales thymiques mTEC serait un composant essentiel de la différenciation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  épithéliaux cutanés DETC (dendritic epidermal T cells) V $\gamma$ 5V $\delta$ 1 (Boyden et al., 2008) et qui sont eux-mêmes capables d'activer l'expression du régulateur de l'autoimmunité AIRE dans les mTEC et donc de participer à la la sélection du répertoire T  $\alpha\beta$  (Roberts et al., 2012). Ce travail a conduit à différencier deux populations de lymphocytes T  $\gamma\delta$  (Jensen et al., 2008) (Ribot et al., 2009), (i) l'une majoritairement productrice d'IL-17 (qui proviendrait de progéniteurs cellulaires T différents, se différenciant en amont de l'engagement thymique (Kisielow et al., 2011), capables de mûrir malgré l'absence d'interaction avec l'antigène (pas de sélection positive) du fait de la mise en jeu de signaux indépendants de survie, aboutissant à un phénotype préactivité CD44<sup>high</sup>, CD62<sup>low</sup>, CD127<sup>high</sup>, CD27<sup>low</sup>, TCR<sup>high</sup>); (ii) l'autre majoritairement productrice d'INF- $\gamma$  (avec une différenciation thymique, et une rencontre avec l'antigène assurant une sélection positive) . Leur polarisation pourrait aussi être sous la dépendance de SKINT-1 pour les DETC (Turchinovich and Hayday, 2011) et favorisée par l'IL-7 (Michel et al., 2012). La programmation de ces lymphocytes T  $\gamma\delta$  producteurs d'IL-17 ne serait pas dépendant du TCR mais d'un réseau de facteurs de transcription composés de 4 groupes d'HMGB (High Mobility Group Box): SOX4, SOX13, TCF1 et LEF1 (Malhotra et al., 2013), avec une signature transcriptomique propre (Narayan et al., 2012) pas forcément spécifique des lymphocytes T  $\gamma\delta$  mais plus largement d'une lignée lymphocytaire apparentée au système inné de réponse (innate-like). Les cellules T  $\gamma\delta$  productrices d'IL-17 pourraient n'être générées que durant la vie fœtale et persister ensuite par un mécanisme d'autorenouvellement leur assurant une durée de vie prolongée (Haas et al., 2012). Ce travail a permis en outre de souligner de nouveau le rôle de l'activation forte de Notch dans le développement T  $\gamma\delta$  (Van de Walle et al., 2013). Toutefois, l'équivalent de ces cellules T  $\gamma\delta$  CD27- IL17+ n'a pas été mis en évidence chez l'homme. Il faut donc voir ces modèles comme des systèmes apportant un support à la réflexion sur la génération du répertoire T  $\gamma\delta$  mais en aucun cas transposable en l'état.

Le répertoire T  $\gamma\delta$  varie en effet significativement entre les espèces, à la fois dans le nombre des lymphocytes T  $\gamma\delta$  composant le pool lymphocytaire et la diversité des régions portant la variabilité (Su et al., 1999) (Kazen and Adams, 2011) : 5% chez l'homme et la souris, 20% chez le poulet et le lapin et 30% chez le mouton et la vache. Ceci suggère que les pressions évolutives ont modulé le répertoire T  $\gamma\delta$ , illustrant la plasticité de ce système aux différents antigènes du milieu extérieur et intérieur.

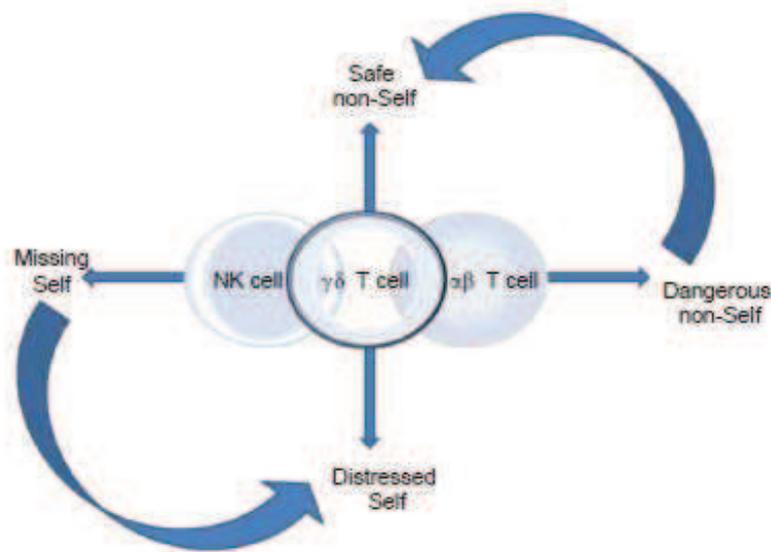
### 3. Les antigènes activateurs des TCR $\gamma\delta$

#### a) *Nature des antigènes connus*

Un des grands enjeux dans la compréhension de la biologie des lymphocytes T  $\gamma\delta$  est d'identifier leurs antigènes activateurs. On a vu que la génération des lymphocytes T  $\gamma\delta$  est complexe et encore imparfaitement comprise avec des mécanismes de sélection positive thymique et extrathymique et une possible programmation développementale indépendante de l'antigène. On a vu que ce sous-groupe lymphocytaire est hétérogène dans la composition des chaînes de son TCR, dans sa distribution entre le sang et les tissus périphériques. Ce qui suggère que les antigènes exposés et reconnus vont l'être dans des contextes différents et par des cellules à l'arsenal de reconnaissance et de coactivation différent. On a vu que le TCR  $\gamma\delta$  associe en théorie une diversité combinatoire restreinte à une diversité jonctionnelle quasi infinie. Ce qui suggère que le nombre d'antigènes reconnus est soit extrêmement restreint, soit lui aussi quasi-infini. Dans les faits, l'analyse du répertoire  $\gamma\delta$  en périphérie

montre qu'il est souvent très restreint par rapport au répertoire  $\alpha\beta$ . Donc les cellule T  $\gamma\delta$  sont capables de reconnaître un très large éventail d'antigènes mais se maintiennent en périphérie dans un système de contraintes très fortes expliquant cette relative restriction de répertoire.

Les paradigmes actuels font des lymphocytes T  $\gamma\delta$  des cellules immunologiques « empathiques » (Kalyan and Kabelitz, 2013) à l'interface entre l'immunité innée et adaptative, à l'interface entre milieux extérieurs et intérieurs, capables de « sentir la souffrance » mais dont la fonction première est le maintien de l'intégrité. Elles doivent par conséquent être capables d'interpréter les différents signaux activateurs avec « à-propos ». La nature générale des antigènes activateurs des lymphocytes T  $\gamma\delta$  recouvre deux grands champs 1. Un antigène codé par le pathogène, qui sera a priori rencontré dans un tissu spécifique ; 2. Une molécule codée par le soi qui reflètera un état dérégulé tissulaire (figure 24).



**Figure 24. Représentation simplifiée du continuum de la protection immunitaire et l'homéostasie des cellules T  $\gamma\delta$  entre les cellules NK innées et les cellules T  $\alpha\beta$  adaptatives** (Kalyan and Kabelitz, 2013). At the two extreme ends, NK and  $\alpha\beta$  T cells are particularly well equipped to respond to the 'missing self' and the 'dangerous non-self', respectively. Between these two extremes, we are chronically faced with the challenge of making peace with the 'safe non-self' and dealing with the inevitable 'distressed self', and it is within this more complex realm  $\gamma\delta$  T cells excel. It should be recognized that these different 'selves' and the immune response(s) that they trigger exist in a continuum and are modulated by the context in which they are presented. Both NK and  $\alpha\beta$  T cells work with  $\gamma\delta$  T cells to fill in the gaps of this spectrum—with NK cells contributing to responding to the 'distressed self' and  $\alpha\beta$  T cells having some regulatory training to temper the response to the 'safe nonself'. NK, natural killer.

Récemment, deux types de populations T  $\gamma\delta$  qui diffèrent dans leur rapport à l'antigène ont été distinguées 1. Des lymphocytes T  $\gamma\delta$  à tropisme lymphoïde (« lymphoid-homing ») qui s'activent dans la circulation et subissent une expansion clonale sur un schéma propre à la réponse adaptative conventionnelle, 2. Des lymphocytes T  $\gamma\delta$  apparentés au système inné (« innate-like ») qui croisent immunité innée et adaptative avec (i) l'utilisation d'un TCR invariant ou semi-invariant (TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 2), (ii) une capacité d'activation et de mobilisation fonctionnelle rapide, (iii) sans la nécessité de passer par une expansion clonale préalable (Vantourout and Hayday, 2013).

Durant les vingt-cinq dernières années, de nombreux et divers antigènes activateurs de lymphocytes T  $\gamma\delta$  ont été proposés (tableau 15).

	TCR	Antigène	Références
HUMAIN	V $\gamma$ 9V $\delta$ 2	Phospho-Antigènes	Constant, Science 1994 (Constant et al., 1994), Morita, Science 1994 (Morita et al., 1995), Tanaka, Nature 1995 (Tanaka et al., 1995)
		+F1-ATPase	Scotet, Immunity 2005 (Scotet et al., 2005)
		+Butyrophilin	Vavassori, Nat Immunol 2013 (Vavassori et al., 2013) Harly, Blood 2012 (Harly, 2012 #41) Wang, JI 2013 (Wang et al., 2013)
	V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 Clone	Enterotoxine A du staphylocoque	Rust, Nature 1990 (Rust et al., 1990)
	V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 Clone	Homologue GroEL	Fisch, Science 1990 (Fisch et al., 1990)
	V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 Clone	HSP 65	Born, Science 1990 (Born et al., 1990)
	V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 Clone	HSP 60	O'Brien, PNAS 1992 (O'Brien et al., 1992)
	V $\gamma$ 9V $\delta$ 2	Toxine tétanique HLA restreinte	Kozbor, JEM 1989 (Kozbor et al., 1989)
	V $\delta$ 2	ULBP4	Kong, Blood 2009 (Kong et al., 2009)
	Variés	Phycoérythrin	Zeng, Immunity 2012 (Zeng et al., 2012)
	V $\delta$ 1 (IELs)	MICA	Groh, Science 1998 (Groh et al., 1998), Xu, PNAS 2011 (Xu et al., 2011)
	V $\delta$ 1 (Clone)	CD1c+lipides	Spada, JEM 2000 (Spada et al., 2000), Russano, JI 2007 (Russano et al., 2007)
	V $\delta$ 1 (Clone)	CD1a/d+lipides de pollen	Agea, JEM 2005 (Agea et al., 2005)
	V $\delta$ 1 (sang)	CD1d teramères chargés en sulphatides	Bai, Eur J Immunol 2012 (Bai et al., 2012)
	V $\delta$ 1 (Clone)	Lipohexapeptides	Vincent, JI 1998 (Vincent et al., 1998)
	V $\delta$ 3	CD1d	Mangan, JI 2013 (Mangan et al., 2013)
	V $\gamma$ 1.3V $\delta$ 2	Histidyl-ARNt synthétase	Bruder, JCB 2012 (Bruder et al., 2012)
	V $\gamma$ 4V $\delta$ 5 (Clone)	EPCR	Willcox, Nat Immunol 2012 (Willcox et al., 2012)
	V $\gamma$ 9V $\delta$ 1 (Clone)	EphA2	non publié (Harly et al., 2012)
	V $\gamma$ 4V $\delta$ 5 (Clone)	FHC (Free Heavy Chain)	non publié (Marlin et al., 2012)
V $\delta$ 1 (Clone)	HLA-A2 et HLA-A24	Ciccone, Eur J Immunol 1989 (Ciccone et al., 1989)	
MURIN	Variés	H2-T10, H2-T22	Wingren, Science 2000 (Wingren et al., 2000), Shin, Science 2005 (Shin et al., 2005)
	Variés	Phycoérythrin	Zeng, Immunity 2012 (Zeng et al., 2012)

V $\gamma$ 2V $\delta$ 5 (Clone)	I-E <sup>k</sup>	Matis, Science 1989 (Matis et al., 1989), Schild, Cell 1994 (Schild et al., 1994)
V $\gamma$ 2V $\delta$ 8 (Clone)	HSV-glycoprotéine I	Johnson, JI 1992 (Johnson et al., 1992), Sciammas, JI 1994 (Sciammas et al., 1994)
V $\delta$ 1 (Clone)	Cardiolipin apolipoprotéine H	Born, Scand J Immunol 2003(Born et al., 2003)
V $\delta$ 1 (Clone)	Insuline peptide (B:9-23)	Zhang, J Autoimmun 2010(Zhang et al., 2010a)
V $\gamma$ 1-V $\delta$ 6/4	HSP 60	Fu, PNAS 1993 (Fu et al., 1993), O'Brien, PNAS 1992 (O'Brien et al., 1992)

**Tableau 15. Exemples d'antigènes activateurs de TCR  $\gamma\delta$**

Trois critères doivent en théorie être réunis pour qualifier un antigène activateur de TCR  $\gamma\delta$  :

- Des données expérimentales solides en faveur de la spécificité du TCR  $\gamma\delta$  pour l'antigène candidat (blocage du TCR  $\gamma\delta$ , blocage du ligand, transfert du TCR dans une lignée reportrice,...)
- La mise en évidence de l'interaction directe entre le TCR  $\gamma\delta$  et l'antigène candidat par des techniques biochimiques (résonance plasmonique de surface, alphascreen, etc..).
- La démonstration de l'existence d'une population  $\gamma\delta$  spécifique de l'antigène in vivo et d'un contexte physiopathologique qui fait intervenir une réponse des LT  $\gamma\delta$  contre cet antigène

Seuls quelques rares antigènes présentent ces caractéristiques.

On mentionnera

- Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, exclusivement humains, reconnaissent les phosphoantigènes et sont un bel exemple de réactivité croisée entre antigènes du soi dérégulé et antigènes provenant de pathogènes (pour revue (Champagne, 2011)). La transformation tumorale (Gober et al., 2003) comme l'infection (ex dans (Feurle et al., 2002) (Spencer et al., 2008)) peuvent conduire à leur génération via une altération du métabolisme des mévalonates. Différentes molécules utilisées en pratique clinique interfèrent également avec cette voie métabolique (statines (Jameson et al., 2010) et biphosphonates (Kunzmann et al., 1999)). Plusieurs types de phosphoantigènes activateurs ont été identifiés. Leur reconnaissance implique une stabilisation avec les monocytes (Davey et al., 2011) (Eberl et al., 2009) et la mise en jeu de protéines accessoires pour lesquels l'interaction physique a pu être démontrée avec le TCR (Scotet et al., 2005) (Vavassori et al., 2013).
- Différents TCR  $\gamma\delta$  humains, murins et bovins interagissent avec une molécule d'algue, la phycoérythrine, déjà connue pour être un antigène reconnu certaines cellules B (Zeng et al., 2012). La liaison de la phycoérythrine induit chez les lymphocytes T  $\gamma\delta$  (i) l'expression membranaire de CD44, (ii) la diminution de CD62L et (iii) une réponse aux cytokines proinflammatoires IL-1 et IL-23 par la sécrétion d'IL-17. Cette activation dirigée par l'antigène se fait sur un mode de réponse adaptative de type T  $\alpha\beta$  mais avec une mise en œuvre plus rapide sans expansion clonale extensive. La qualification de la phycoérythrine comme ligand réunit les 3 critères sus-cités, même si le contexte physiopathologique qui pourrait requérir une réponse des lymphocytes T  $\gamma\delta$  contre la phycoérythrine reste très énigmatique.
- MICA (Human MHC Class I homolog) a été identifié comme un antigène activateur de clone  $\gamma\delta$   $\delta$ 1A/B-3. MICA est exprimé en réponse à un stress cellulaire au niveau épithélial et

endothélial et il est modulé dans les mêmes situations que celles qui activent les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , ce qui en fait un antigène candidat intéressant. La difficulté est qu'il se lie aussi à NKG2D, largement exprimé par les cellules T  $\gamma\delta$  (Bauer et al., 1999) (Das et al., 2001). Il pourrait donc intervenir de façon séquentielle à la fois au niveau du signal 1 et du signal 2. Si l'interaction directe avec le TCR a pu finalement être caractérisée (au niveau des portions CDR 1 et 2 de la chaîne  $\delta$ ) (Xu et al., 2011), la généralisation de MICA comme ligand d'autres TCR  $\gamma\delta$  n'a pas été obtenue.

- Le modèle développé au sein de l'équipe de Julie Déchanet-Merville a permis l'identification de plusieurs antigènes activateurs de TCR  $\gamma\delta$  (Willcox et al., 2012). Il est basé sur la double réactivité antivirale et anti tumorale de lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{neg}$  induits par le CMV (Halary et al., 2005). En plus des données sur les propriétés antivirales de ces cellules déjà mentionnées dans la partie sur le CMV, la réactivité anti-tumorale ex vivo a été confirmée in vivo avec la mise en évidence (i) d'une association entre un haut pourcentage de LT  $\gamma\delta$  circulant induits par le CMV et un moindre risque de cancer dans une cohorte rétrospective de patients transplantés rénaux (Couzi et al., 2010) ; (ii) et du potentiel antitumoral de LT  $\gamma\delta$  réactifs contre le CMV dans un modèle murin de souris immunodéficientes (Devaud et al., 2009) (Devaud et al., 2012). Ensembles, ces résultats suggèrent que les LT  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{neg}$  induits par le CMV sont capables de reconnaître des antigènes endogènes induits par le stress (auto-antigènes de stress), plutôt que des antigènes dérivés de particules virales spécifiques, rejoignant ainsi le concept de reconnaissance du soi dérégulé. La stratégie adoptée pour leur identification associe (i) le transfert de TCR  $\gamma\delta$  issus de clones générés à partir de PBMC d'individus infectés par le CMV et présentant une double réactivité anti-virale et anti-tumorale dans des lignées « reporter » de type JRT3 (lymphome T n'exprimant de TCR), (ii) l'élaboration d'un panel de cellules cibles induisant la réactivité spécifique du TCR de cette lignée reporter, (iii) puis une immunisation de souris par une de ces lignées cellulaires cibles, (iv) la génération d'hybridomes et le screening des anticorps monoclonaux bloquant spécifiquement la réactivité dépendante du TCR de la JRT3 (v) et enfin l'identification de l'antigène cible par spectrométrie de masse. Elle a permis d'identifier trois ligands : EPCR (Willcox et al., 2012), une molécule HLA sans  $\beta 2$ -microglobuline de type FHC (Free-Heavy-Chain) (Marlin et al., 2012) et EphA2, pour lesquels la démonstration de l'interaction directe a pu être faite. Nous reviendrons sur l'un d'eux EphA2 plus loin.

### *b) Surveillance lymphocytaire du stress*

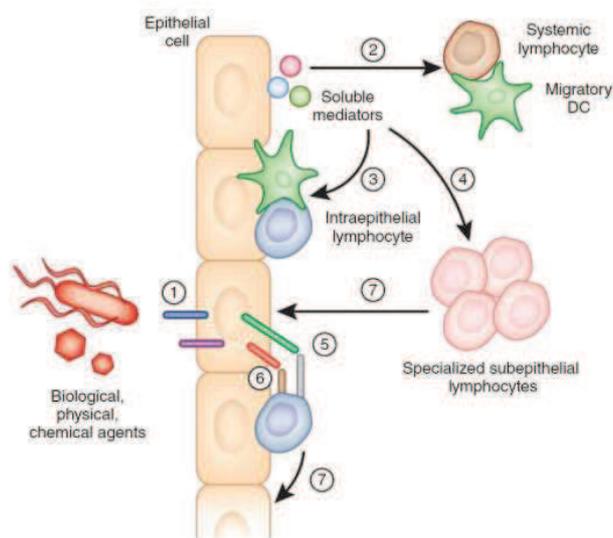
Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont donc capables de reconnaître des antigènes de nature diverse, générés dans des situations de dérégulation cellulaire et tissulaire. C'est dans cette capacité à "censurer la dérégulation cellulaire" que réside vraisemblablement leur avantage évolutif. Cette hypothèse a fait l'objet d'une formulation conceptuelle: les lymphocytes T  $\gamma\delta$  contribuent à la surveillance lymphocytaire du stress (« lymphoid stress surveillance ») (Hayday, 2009) voir figure 26).

Par rapport à l'activation lymphocytaire conventionnelle via la cellule dendritique lors de la phase afférente d'une réponse adaptative classique, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  pourraient avoir deux avantages

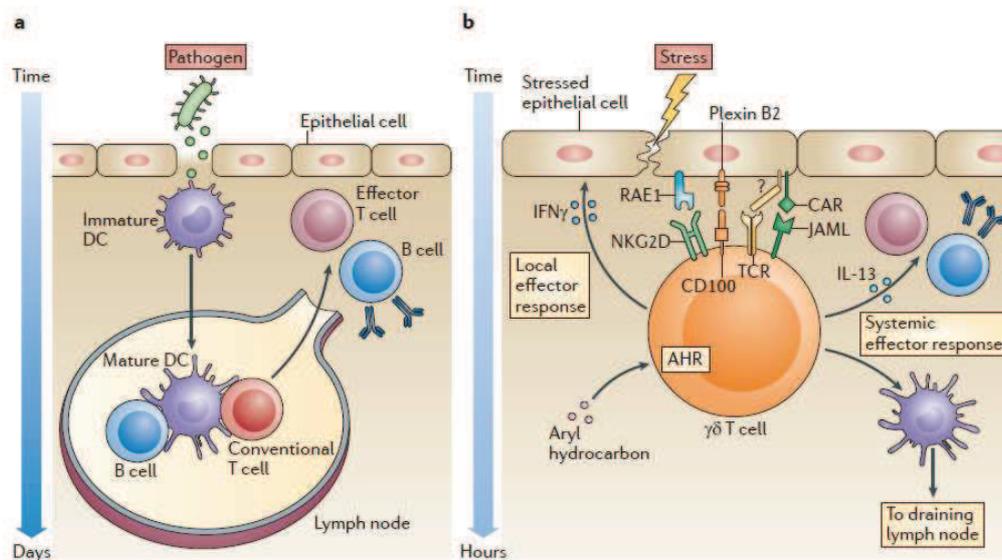
- La rapidité de la mise en œuvre de la réponse effectrice (sans passer par les étapes de migration/maturation des cellules dendritiques puis d'expansion clonale et de différenciation des lymphocytes T  $\alpha\beta$ ). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont des cellules résidentes dans les tissus et armées, directement mobilisables pour exercer leurs fonctions effectrices.
- La capacité à percevoir les modifications des cellules des barrières épithéliales (voire endothéliales) en réponse au stress cellulaire induit par la transformation ou l'infection.

Le stress est à l'origine d'un certain nombre de modifications phénotypiques. Celles-ci ne sont pas toujours perçues comme des signaux de danger par les cellules dendritiques. L'intervention d'autres cellules peut s'avérer importantes pour limiter la dissémination tumorale ou infectieuse locale le temps que la réponse adaptative soit fonctionnelle; ou au contraire empêcher la mise en place d'une inflammation locale immunogène (cf infra). Cette propriété essentielle fait des lymphocytes T  $\gamma\delta$  une cellule d'interface entre immunité innée et adaptative.

Les cellules épithéliales sont capables de communiquer sur leur état avec le système immunitaire. Le réseau d'informations ainsi transmis ("marqueurs de décision épithéliale") a été dénommé "épimmunome" (pour revue (Swamy et al., 2010)). Le principe est repris dans la figure ci-dessous (figure 25). L'exemple le plus représentatif est la capacité de la cellule épithéliale à réguler la voie de signalisation NF $\kappa$ B pour maintenir une homéostasie immunologique locale en limitant la production de cytokines proinflammatoires et contrôler l'inflammation chronique intestinale (Nenci et al., 2007; Zaph et al., 2007). Un autre exemple qui s'applique directement aux lymphocytes T  $\gamma\delta$  est la capacité des keratinocytes à activer les lymphocytes T  $\gamma\delta$  DETC de la peau adjacente à une blessure cutanée de souris (Komori et al., 2012). Le crible de l'état de la barrière épithéliale par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  pourrait même être permanent. C'est ce que Chodaczek et collègues (Chodaczek et al., 2012) ont montré très élégamment chez la souris: les TCR  $\gamma\delta$  des DETC sont constitutivement agrégés et fonctionnellement actifs à l'état basal en formant de véritables synapses immunologiques qui polarisent et attachent les projections de ces cellules dendritiques T  $\gamma\delta$  au niveau des projections épidermiques des keratinocytes. Cette synaptogénèse immunologique dépend des régions variables CDR des TCR, de la kinase Lck et des intégrines  $\alpha E\beta 7$  mais pas du type de lignée  $\gamma\delta$  ni du récepteur NKG2D. En réponse à un stress appliqué aux tissus, la signalisation du TCR n'est pas augmentée substantiellement mais le TCR se redistribue vers l'épiderme basal et les cellules de Langerhans. Ces dernières s'activent et initient une réponse adaptative. L'ensemble de ces données suggèrent que les DETC orchestrent une surveillance de barrière proactive en reconnaissant des ligands exprimés à l'état basal qui se modifient après un stress.



**Figure 25. Axes moléculaires de l'interaction de l'épithélium avec les cellules immunes** (Swamy et al., 2010). Upon exposure to commensals, pathogens, allergens, or physico-chemical dysregulation (1), epithelial cells release antimicrobial defensins, but also send instructions by means of soluble mediators to migratory DCs and systemic lymphocytes (2), to intraepithelial lymphocytes (3) or to specialized subsets of tissue-associated subepithelial T cells (4). They also communicate with IELs by stimulatory (5) and costimulatory (6) ligand-receptor interactions. T cells reciprocate by expressing cytokines and other effectors that profoundly regulate epithelial cell biology—for example, induction of apoptosis or growth promotion (7).



**Figure 26. Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  pourraient emprunter un chemin alternatif pour obtenir une large réponse immune systémique et contribuer à la surveillance lymphocytaire du stress** (Vantourout and Hayday, 2013). a | The textbook view of the activation of an adaptive immune response is shown. Immature dendritic cells (DCs) capture pathogens and then mature while migrating to the lymph nodes. Once there, they prime B cells and conventional ( $\alpha\beta$ ) T cells, which can migrate back to the infected tissue and produce antibodies and mount effector responses, respectively. b | This very specific, albeit slow, response is complemented by  $\gamma\delta$  T cells, which, in response to various sources of stress (as depicted by the upregulation of RAE1 expression and the altered expression of other molecules on the stressed epithelium) mount local effector responses in addition to triggering the adaptive immune system. In contrast to antigen-specific  $\alpha\beta$  T cell responses, many  $\gamma\delta$  T cell responses are achieved within hours, following their sensing of local change and perturbation. This is termed ‘lymphoid stress-surveillance’. AHR, aryl hydrocarbon receptor; CAR, coxsackievirus and adenovirus receptor; IFN $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; IL, interleukin; JAML, junctional adhesion molecule-like; TCR, T cell receptor.

D’autres types de récepteurs peuvent transmettre des informations sur le statut du microenvironnement, en régulant positivement ou négativement les cellules T  $\gamma\delta$ . L’intégration de ces stimuli exogènes de l’environnement est illustrée par le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (tels qu’on les trouve dans l’alimentation ou d’autres composés du milieu extérieur comme la dioxine). L’AHR (pour Aryl Hydrocarbon Receptor) est exprimé au niveau des cellules épithéliales et des cellules immunologiques résidentes (Lymphocytes Intra Epithéliaux IEL  $\gamma\delta$ , DETC, Th17). Son engagement conduit à des modifications susceptibles de modifier l’état d’activation des cellules sur lesquelles il agit (Veldhoen et al., 2008). Surtout, les souris déficientes en AHR ne sont pas capables de maintenir sur le long terme les DETC et les IEL  $\gamma\delta$  (Li et al., 2011).

### c) Costimulation

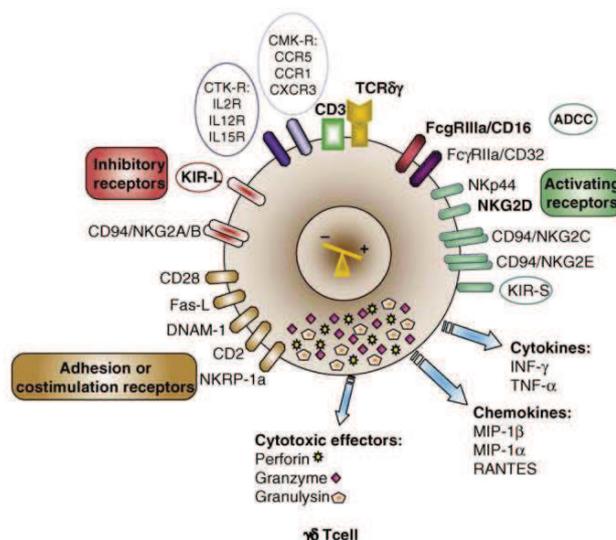
Au-delà de l’antigène interagissant avec le TCR  $\gamma\delta$ , les cellules épithéliales ou endothéliales stressées fournissent le “contexte” qui prédispose ou non à l’activation, en fournissant la costimulation. Cette costimulation se fait sur un mode séquentiel et pas dans le même temps.

On peut citer:

- **NKG2D**. Il en est l’exemple paradigmatique. Largement exprimé sur les cellules T  $\gamma\delta$ , il interagit avec son ligand MICA chez l’homme ou RAE-1 chez la souris, ligand qui est justement exprimé en situation de stress ou d’agression par les cellules épithéliales ou endothéliales. Dans un modèle murin, l’induction d’une forte expression de RAE-1 conduit à une réorganisation dynamique des DETC et des cellules de Langerhans puis à une infiltration par des cellules T  $\alpha\beta$  (Strid et al., 2008).

- **LFA1**. Son ligand ICAM1 (CD54) est induit par l'infection à CMV sur les cellules endothéliales et permet au clone T LES  $\gamma\delta 5$  exprimant LFA1, de lyser les cellules qui expriment EPCR (antigène activateur de TCR LES). L'implication du couple de costimulation LFA1/ICAM1 a été rapportée dans d'autres modèles d'activation lymphocytaire T  $\gamma\delta$  (Corvaisier et al., 2005). Les intégrines lymphocytaires jouent également un rôle de modulation de l'activation médiée par le TCR  $\gamma\delta$  (Orsini et al., 1993) tout comme le couple CD2/LFA3.
- **IL1 et IL18**. Ces cytokines sont secrétées après activation de l'inflammasome et de la pro-caspase 1. On peut postuler qu'elles contribuent à l'activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  après transformation ou infection. L'IL18 a effectivement été montrée participer à l'expansion et la différenciation de cellules T  $\gamma\delta$  (Tsuda et al., 2011) (Lalor et al., 2011).
- **JAML** (Junctional Adhesion Molecule-Like) est une molécule de costimulation non conventionnelle qui se lie au récepteur au Coxsackie virus (aussi récepteur de l'adénovirus) et active la même voie des PI3K (phosphoinositide 3 kinase) que les molécules CD28 et NKG2D (Witherden et al., 2010). Elle est exprimée sur les DETC et les  $\gamma\delta$  de l'épithélium intestinal chez la souris.
- **CD100 (Semaphorine 4D)** est aussi une molécule de costimulation non conventionnelle interagissant avec plexin B2 présente sur les keratinocytes. Son engagement induit l'activation d'ERK (extracellular-signal regulated kinase) et favorise une réponse stéréotype d'activation des DETC (Witherden et al., 2012).
- **CMH classe I**. Les molécules HLA de classe I exprimées par le lymphocytes T  $\gamma\delta$  ont été rapportées comme capables de moduler le seuil d'activation de clones T  $\gamma\delta$  exprimant la chaîne V $\delta 3$  et réactifs contre des cellules lymphomateuses via une interaction avec CD85j (ILT2) sur la cellule cible (Harly et al., 2011).

D'autres molécules de costimulation ont été rapportées pour les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , notamment toute une série de récepteurs activateurs ou inhibiteurs de type NK (Natural Killer), tel que repris sur la figure ci-dessous (figure 27).



**Figure 27. Récepteurs membranaires des cellules T  $\gamma\delta$**  (Rey et al., 2009). Receptors have been classified as activating receptors (green), which mediate cytotoxicity, adhesion or co-stimulatory receptors (brown), which contribute to positive signals, and inhibitory receptors (red), which inhibit cytotoxicity. NK and gd T cells express certain common receptors, such as NKG2D and KIR. Integration of these signals contributes to regulation of NK or gd T-cell activities, which include activation, proliferation, cytokine or chemokine secretion and cytotoxicity in part by the release of cytotoxic granules containing perforin or granzymes. Bold type indicates the principle receptors.

Enfin et de façon plus intuitive, quand la barrière épithéliale est rompue, d'autres signaux immunologiques peuvent être transmis au système immunitaire (type translocation de composés microbiens lipidiques (Brenchley et al., 2006), eux-aussi susceptibles d'activer les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , via CD1 ou pas).

#### 4. Tropisme tissulaire des lymphocytes T $\gamma\delta$

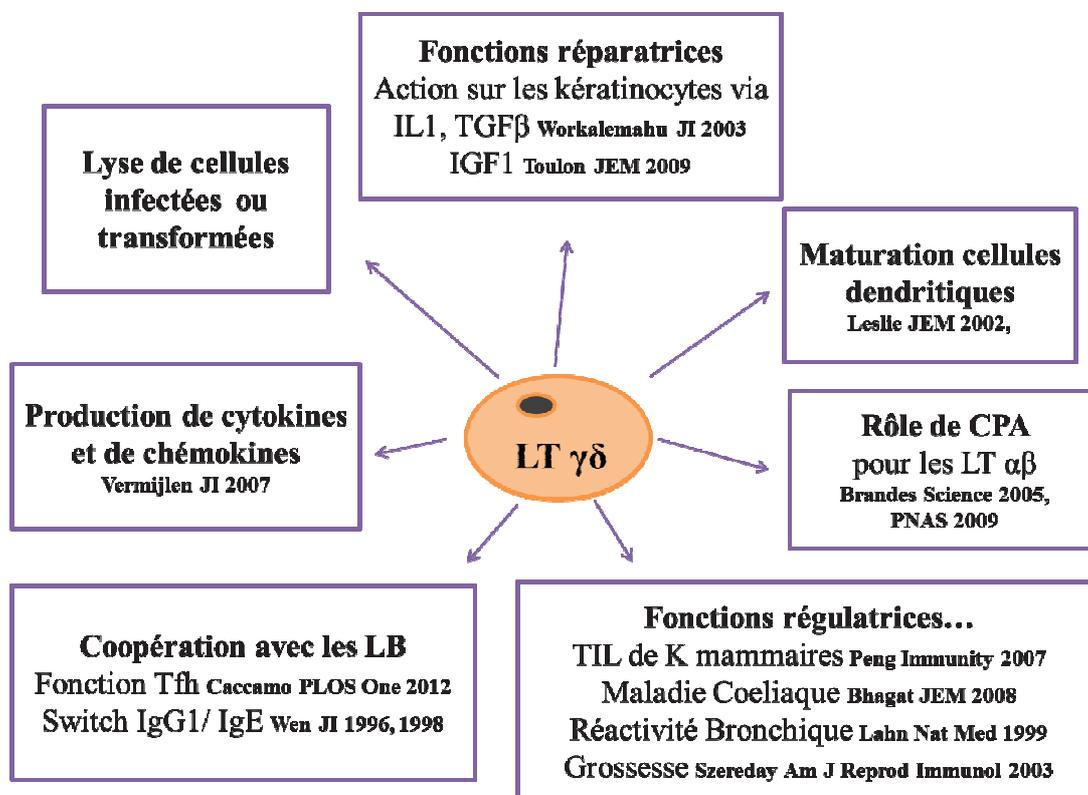
Très tôt, il a été établi que la distribution des lymphocytes T  $\gamma\delta$  était profondément différente de celles des lymphocytes T  $\alpha\beta$ . Si elles peuvent être présentes dans le sang (cf supra), elles semblent surtout avoir un profil de cellules résidentes tissulaires. A ce titre, elles font partie des lymphocytes intraépithéliaux (IELs) (Bonneville et al., 1988). A la fin des années 80, un gros travail sur la distribution anatomique des T  $\gamma\delta$  été réalisé (Falini et al., 1989), en essayant de caractériser l'utilisation de ces chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  et d'évaluer leur représentativité au sein des différents tissus (Borst et al., 1991). Cette distribution se modifie en fonction des situations pathologiques rencontrées (Modlin et al., 1989).

On peut retenir que:

- Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  tissulaires sont principalement de type V $\delta$ 2<sup>neg</sup>.
- Leur migration au sein des tissus survient par vagues au cours du développement foetal (Itohara et al., 1990) (Kragel et al., 1990).
- Chez la souris, il a été montré que la maturation thymique au contact des mTEC exprimant SKINT-1 induisait la sélection positive des progéniteurs de DETC mais aussi l'expression de CCR10 (adressage à l'épiderme).
- Chez l'homme, le schéma général rejoint la distinction "innate-like" versus "lymphoid-homing" lymphocytes. Les différents types de lymphocytes expriment des marqueurs d'adressage (récepteurs au chemokines) en fonction de leur nature. Par exemple, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> induits par le CMV chez les transplantés rénaux présentent le récepteur CXCR4 et  $\alpha$ E $\beta$ 7, qui sont des marqueurs d'adressage intestinal (correspondant potentiellement au site de rencontre avec le CMV) (Halary et al., 2005). Le phénotype de différenciation des lymphocytes pourrait être associé à leur localisation : naives dans le sang circulant, effecteurs/mémoires dans les ganglions et effecteurs mémoires à différenciation terminale au niveau des tissus inflammatoires (Dieli et al., 2003).
- Il est possible qu'ils terminent leur maturation au contact des antigènes rencontrés dans le microenvironnement épithélial. Pour preuve, la composition du répertoire est différente entre les tissus et le sang circulant (Holtmeier et al., 2001).
- Leur nombre absolu n'est pas très important. Ils sont dispersés, souvent isolés ou en petit groupe de deux à cinq cellules, parfois localisés au contact des cellules épithéliales (cf supra (Chodaczek et al., 2012)) ou au contact des cellules dendritiques immatures résidentes dont ils régulent l'activation.
- Leur fonction au sein de ces tissus est une fonction de "defense de l'épithélium" (Kabelitz et al., 2005), ce qui implique la mise en jeu à la fois de mécanismes effecteurs lytiques (contrôle intestinal précoce du "pathobionte" (Ismail et al., 2011)) mais aussi de mécanismes régulateurs (régulation de la réactivité bronchique (Lahn et al., 1999)).
- Ils sont aussi rencontrés dans d'autres types de tissus tels les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques ou pulpe rouge de la rate (Bucy et al., 1989)) où ils peuvent exercer diverses fonctions de régulation de la réponse immune (cf infra).

## 5. FONCTIONS DES LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$

Elles sont reprises dans la figure 28. A la phase efférente de la réponse immunitaire, le lymphocyte  $\gamma\delta$  semble pouvoir jouer plusieurs rôles, suggérant une grande plasticité fonctionnelle. Ce qui représente là encore un potentiel avantage sélectif, qui pourrait justifier son maintien dans l'évolution.



**Figure 28. Principales fonctions associées aux lymphocytes T  $\gamma\delta$** , adapté de Vantourout et al., Nat Rev Immunol 2013 (Vantourout and Hayday, 2013). CPA Cellule Présentatrice d'Antigène, IGF Insulin Growth Factor, Ig Immunoglobuline, LB Lymphocyte B, LT Lymphocyte T, Tfh T Follicular Helper Lymphocyte) TGF Tumor Growth Factor, TIL Tumor Infiltrating Lymphocyte.

On mentionnera pour illustration :

- Leurs capacités réparatrices (via IL1, TGF $\beta$  (Workalemahu et al., 2003), ou IGF1 (chez les DETC (Sharp et al., 2005) ou les LT  $\gamma\delta$  humains (Toulon et al., 2009)) qui viennent compléter leur arsenal lytique. On remarquera que cette capacité réparatrice recouvre une dimension ontologique dans la perspective du maintien de l'intégrité tissulaire par les lymphocytes T  $\gamma\delta$ .
- Des fonctions coopératrices
  - Interaction avec la cellule B : Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>POS</sup> contribuent à la boucle de rétrocontrôle positive de formation des organes lymphoïdes secondaires (Ansel et al., 2000) via la synthèse de CXCL13 (Vermijlen et al., 2007) qui interagit avec le CXCR5 des lymphocytes B. Ils ont un rôle compensateur des lymphocytes T  $\alpha\beta$  dans un modèle de souris immunodéficientes  $\alpha\beta$  KO, autorisant la production d'IgG1 (y compris d'auto anticorps) et d'IgE après stimulation infectieuse (Wen et al., 1996). Un rôle de cellules Tfh (follicular helper) leur a été récemment attribué (Caccamo et al., 2012).
  - Interaction avec les cellules myéloïdes : Les lymphocytes T agissent en collaboration avec les cellules dendritiques (DC) et permettent de requalifier l'information traitée par les DC sur l'intégrité globale du tissu et de décider si la réponse à adresser aux différents stimuli doit être immunogène ou tolérogène. Ils contribuent notamment à la maturation des DC par les

lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>pos</sup> (Leslie et al., 2002). Ils mettent en place des mécanismes redondants permettant de surmonter les stratégies d'évasion au système immunitaire par différents pathogènes comme les mycobactéries: les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>pos</sup> potentialisent l'action des cellules dendritiques traitées par bisphosphonates (Conti et al., 2005). Ils interagissent également avec les macrophages (Dalton et al., 2004) et les monocytes (Eberl et al., 2009).

- Leurs capacités de cellules présentatrices de l'antigène (Brandes et al., 2005).

## 6. Implication pathologique

Le tableau ci-dessous reprend différentes situations pathologiques où les lymphocytes T  $\gamma\delta$  ont été impliqués (tableau 16).

Situations pathologiques	REFERENCES	Origine	Type LT $\gamma\delta$	Principales conclusions
<b>INFECTIONS</b>				
VIH	(Autran et al., 1989; Boullier et al., 1995; De Maria et al., 1992; De Paoli et al., 1991; Fausther-Bovendo et al., 2008; Fenoglio et al., 2009; Hudspeth et al., 2012; Poccia et al., 1996; Poles et al., 2003; Rossol et al., 1998)	Homme	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2neg	Augmente LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 1 Pas de rôle anti viral propre. Cytotoxicité anti CD4. Contribuerait à la lymphopénie CD4. Rôle anti candida sp ?
HSV	(Bukowski et al., 1994; Johnson et al., 1992; Sciammas et al., 1994)	Souris	LT $\gamma\delta$	
VHC	(Agrati et al., 2006; Agrati et al., 2001)	Homme	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2neg et pos	Augmentation des LT $\gamma\delta$ dans le foie VHC+, corrélation avec le score histologique.
Orthopoxvirus	(Agrati et al., 2006)	Homme	LT $\gamma\delta$	
HHV8	(Barcy et al., 2008)	Homme	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2neg	
Mycoabactéries (BK/Lepre)	(Li et al., 1996; Poccia et al., 1999; Uyemura et al., 1991; Uyemura et al., 1992)	Homme	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2pos	Production PAg. Réaction granulomateuse.
Bactéries utilisant la voie non mévalonate pour la production d'isoprénoides (ex Escherichia Coli, Nocardia, Leptospira...)	(Feurle et al., 2002) (Tam et al., 2001) (Klimpel et al., 2003)	Homme+Souris	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2 pos	Production PAg.
Escherichia Coli	(Shibata et al., 2007; Wu et al., 2009){	Homme	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2neg	Régulation Th17. Phagocytose via CD16
Borrelia Burgdorferi	(Collins et al., 2008; Glatzel et al., 2002; Vincent et al., 1998)	Homme	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2neg	Clone réactif contre lipohexapeptides. Activation TLR. Limité au liquide synovial

Plasmodium	(Costa et al., 2011; Inoue et al., 2012; Langhorne, 1996)	Homme	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2pos	Production PAg. Expansion. Fonctions effectrices. Maturation DC
Toxoplasmose	(Kasper et al., 1996) (Egan et al., 2005)	Homme+Souris	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2neg et pos	Production PAg. Expansion. Destruction macrophages infectés SNC
Onchocerca volvulus	(Munk et al., 1993)	Homme	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2neg	
<b>MALADIES AUTOIMMUNES</b>				
Maladie Coeliaque	(Bhagat et al., 2008)	Homme	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2neg et pos	Fonction régulatrice
Sclérose en plaque	(Blink and Miller, 2009; Oksenberg et al., 1993; Schirmer et al., 2013; Shimonkevitz et al., 1993; Sutton et al., 2009; Sutton et al., 2012)	Homme+Souris	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2neg et pos	Effecteur pathogène. Rôle Th17. Rôle CD16. Corrélation pronostique avec les rechutes
MICI	(Giacomelli et al., 1994; Holtmeier et al., 2002; Kelsen et al., 2011)	Homme	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2neg et pos	Modification de répertoire. Augmentation après infliximab ?
PR et arthrites réactionnelles	(Holoshitz et al., 1989; Olive et al., 1992)	Homme	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2pos	Corrélation avec mycobactéries.
Polymyosite	(Bruder et al., 2012; Hohlfield et al., 1991; Pluschke et al., 1992)	Homme	LT $\gamma\delta$	Clone réactif avec activité anti ARNt synthétase
Sclérodermie	(Giacomelli et al., 1998)	Homme	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2neg et pos	Augmentation dans l'infiltrat cutané
Psoriasis	(Cai et al., 2011)	Souris	LT $\gamma\delta$	Effecteur pathogène. Rôle Th17.
Glomerulonéphrite	(Peng et al., 1996; Turner et al., 2012; Wu et al., 2007)	Souris	LT $\gamma\delta$	Effecteur pathogène. Rôle Th17. Protection modèle néphropathie adriamycine
Diabète	(Zhang et al., 2010a)	Souris	LT $\gamma\delta$	Clone réactif contre peptide insuline
<b>MODE DE VIE</b>				
Alimentation	(Kamath et al., 2003; Nantz et al., 2006) Revue (Kalyan and Kabelitz, 2013)	Homme	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2neg et pos	Induction phosphoantigènes avec le thé, ...
Stress psychologique	(Anane et al., 2010)	Homme	LT $\gamma\delta$	Mobilisation de LT $\gamma\delta$ TEMRA après stress
Syndrome d'apnée du sommeil	(Dyugovskaya et al., 2003b)	Homme	LT $\gamma\delta$	Activation et expansion des LT $\gamma\delta$ . Effecteur pathogène athérosclérose

TRANSPLANTATION				
Alloréactivité	(Coelho et al., 1995; Raasveld et al., 1992; Vaessen et al., 1991)	Homme		Pas d'alloréactivité directe évidente
Ischémie/reperfusion	(Hochegger et al., 2007; Savransky et al., 2006)	Souris	LT $\gamma\delta$	Participation aux lésions
Tolérance	(Gorczyński et al., 1996; Martinez-Llordella et al., 2008)	Homme+Souris	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2neg	Profil de tolérants opérationnels hépatiques
Rôle anti tumoral	(Couzi et al., 2010; Devaud et al., 2009; Devaud et al., 2012; Scheper et al., 2013)	Homme+Souris	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2neg	Fonction effectrice.
Rôle Anti CMV	(Couzi et al., 2009; Couzi et al., 2012b; Dechanet et al., 1999a; Lafarge et al., 2001)	Homme	LT $\gamma\delta$ V $\delta$ 2neg	Fonction effectrice.
Greffe de cellules souches hématopoïétiques	(Drobyski et al., 2000; Godder et al., 2007; Lamb et al., 2001; Maeda et al., 2005; Pabst et al., 2007; Scheper et al., 2013)	Homme+Souris	LT $\gamma\delta$	Promoteur GVH. Prévient récurrence en promouvant la GVL. Rôle régulateur dans certains cas,

**Tableau 16. Différentes situations pathologiques où l'implication des lymphocytes T  $\gamma\delta$  a été rapportée.**

Concernant les propriétés antitumorales observées chez la souris (Gao et al., 2003) (Girardi et al., 2001), elles semblent être partagées entre les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>pos</sup> (Gober et al., 2003) et V $\delta$ 2<sup>neg</sup> (Maeurer et al., 1996) chez l'homme. Toutefois, le spectre des tumeurs reconnues est différent: plutôt dirigés contre des tumeurs hématopoïétiques V $\delta$ 2<sup>pos</sup> (myélomes+++ ) mais élargi à certaines tumeurs solides (Corvaisier et al., 2005) (Viey et al., 2005); plutôt issus de carcinomes pour les V $\delta$ 2<sup>neg</sup> mais ils pourraient aussi avoir une fonction tumorale en hématologie (via notamment leur participation à la GVL (Scheper et al., 2013) ou un rôle dans la leucémie lymphoïde chronique (Catellani et al., 2007)).

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> ont notamment été étudiés au sein des lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs) avec un rôle variable qui va de la lyse à la régulation (repris dans le tableau ci-dessous).

Site tumoral	Références
COLON	(Groh et al., 1999; Maeurer et al., 1996)
OVAIRE	(Groh et al., 1999)
PEAU	(Alaibac et al., 1992; Bachelez et al., 1992; Bialasiewicz et al., 1999; Ebert et al., 2006; Nanno et al., 1992)
POUMON	(Ferrarini et al., 1996; Groh et al., 1999; Zocchi et al., 1994)
PROSTATE	(Groh et al., 1999)
REIN	(Choudhary et al., 1995; Groh et al., 1999)
SEIN	(Groh et al., 1999; Peng et al., 2007)

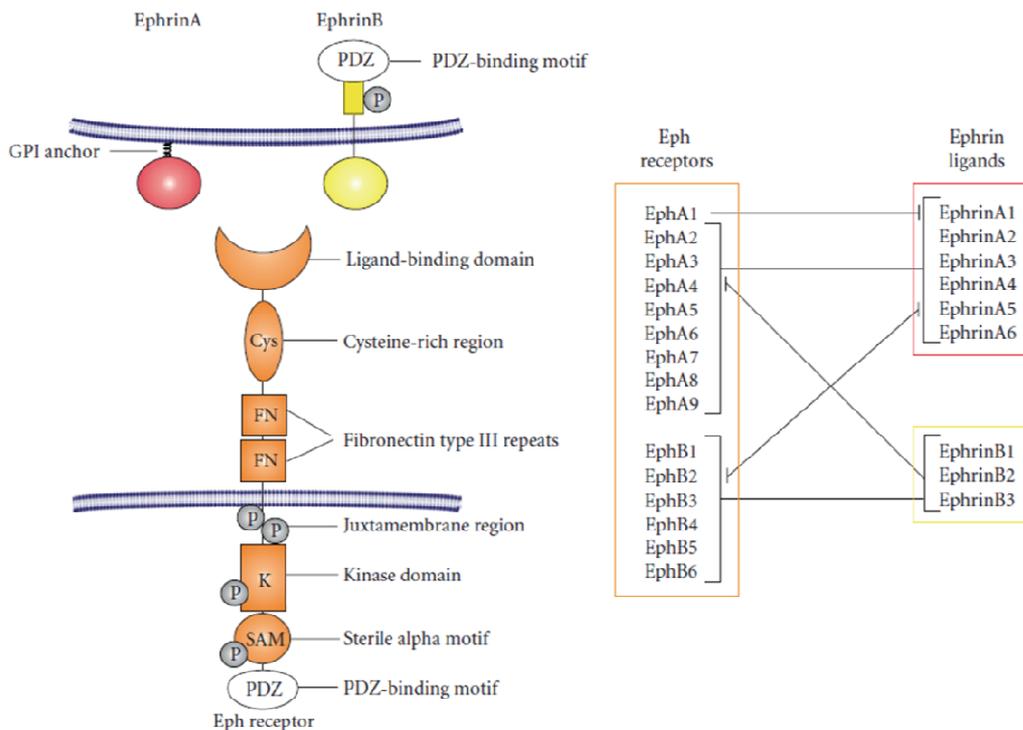
**Tableau 17. Différents cancers où les lymphocytes infiltrant les tumeurs comprenaient des lymphocytes T  $\gamma\delta$ .**

Cette implication dans la réponse antitumorale (et leur contribution à l'éradication des tumeurs) a fait de ces cellules de sérieux candidats à l'immunothérapie. La difficulté est toujours le maintien de leurs propriétés fonctionnelles lors de la phase ex vivo d'amplification. L'espoir suscité autour du maniement de ces cellules apparaît en tout cas réel (Hannani et al., 2012) (Meraviglia et al., 2010a) (Kabelitz et al., 2007). L'application clinique est actuellement en phase I (Meraviglia et al., 2010b). Ces expériences de thérapie cellulaire des lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont à mettre en perspective avec une potentielle future utilisation en post-transplantation basée sur leurs doubles propriétés anti-virales anti CMV et anti-tumorale, tel que cela a pu être rapporté avec des cellules T spécifiques du CMV (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995) (Cobbold et al., 2005).

## E. EphA2 et le couple Eph/ephrin récepteurs

### 1. Généralités

EphA2 (pour Erythropoietin-producing hepatocyte kinase de type 2) appartient à la plus grande famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) de l'organisme (près d'1/4 des RTK) : il s'agit d'une enzyme transmembranaire allostérique de type I contenant un seul domaine de liaison à son ligand sur son pôle extracellulaire (Ligand Binding Domain-LBD) et un domaine intracellulaire conservé qui porte l'activité tyrosine kinase. La structure très conservée des différents domaines de la molécule est reprise dans la figure ci-dessous. A la différence de la plupart des autres RTK –qui lient des ligands solubles tels que les facteurs de croissance- une des caractéristiques différenciant les Ephs est leur liaison avec une famille de ligands situés à la surface membranaire des cellules adjacentes : les éphrines (ephrin). Il existe 9 protéines EphA différentes liant électivement les éphrines A1 à A6. Il existe 6 protéines EphB se liant à 3 éphrins B1 à B3, même si des ponts dans l'interaction entre Eph et leurs ligands éphrins ont été décrits. Ils ont été identifiés à la fin des années 80's dans un modèle tumoral (Hirai et al., 1987). La nomenclature des différentes classes d'Eph a été posée en 1996 dans un modèle d'embryogénèse (Gale et al., 1996).



**Figure 29. Structure des Eph récepteurs et de leurs ligands les éphrins et interactions principales entre les différents Eph et éphrins** (Mosch et al., 2010). The conserved multi-domain Eph structure comprises an N-terminal globular ligand binding domain (LBD), a cysteine-rich domain (CRD), and two fibronectin type III (FNIII) repeats within the extracellular domain (ECD). The CRD comprises a Sushi (or Complement Control Protein) domain, tightly packed to an EGF like module with homology to the TNF $\alpha$  receptor CRD. The intracellular region contains a regulatory juxtamembrane region, a kinase domain, a SAM (sterile- $\alpha$  motif) domain and a PDZ-binding motif (PBM). All ephrins contain a conserved N-terminal receptor binding domain, and whereas ephrin-Bs contain also transmembrane and cytoplasmic sequences, including a PBM, A-type ephrins do not, but are inserted into the plasma membrane via a GPI-linkage. PDZ: Postsynaptic density 95-Discs large-Zonula occludentes-1-protein, GPI: glycosylphosphatidylinositol.

## 2. Implications physiologiques et physiopathologiques

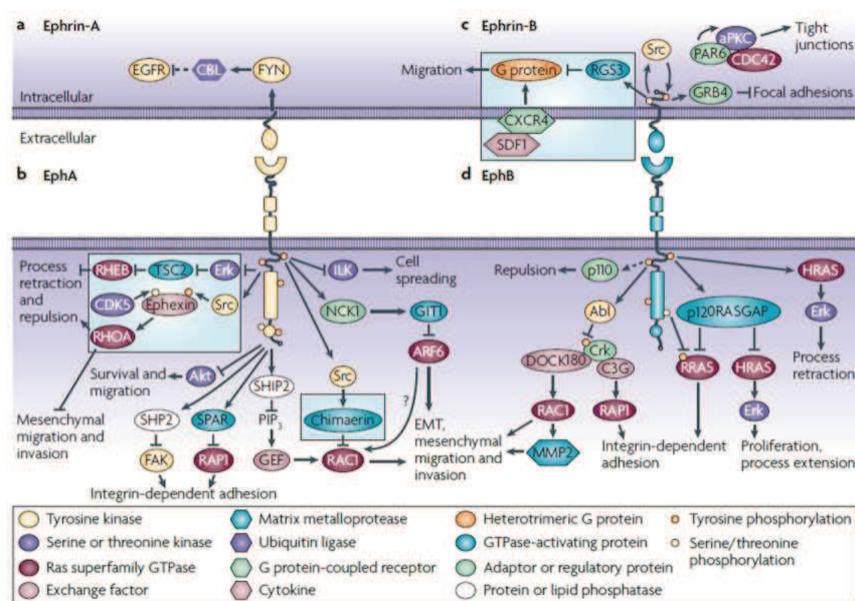
L'interaction Eph/ephrin est basée sur un contact direct d'une cellule avec les cellules du microenvironnement et pourrait constituer un système de communication intercellulaire essentiel. Elle a la particularité de générer une signalisation bidirectionnelle asymétrique (Holland et al., 1996) (Jorgensen et al., 2009). A l'échelon cellulaire, l'expression des ephrins et de leurs ligands est ubiquitaire. Ils ont été fortement associés à la modulation du cytosquelette (organisation de l'actine), l'activité des intégrines et l'expression de molécules d'adhésion ; rendant compte de leur implication dans des phénomènes d'attraction/ de répulsion cellulaire ainsi que de prolifération/ de survie, avec un haut niveau de conservation entre les espèces. Leur rôle a été démontré dans différentes fonctions physiologiques et pathogéniques (voir tableau 18 pour synthèse des fonctions Eph/ephrin ciblée sur EphA2) et relié à différentes situations de stress cellulaire (cancer (Tandon et al., 2011), UV (Zhang et al., 2008), irradiations (Mosch et al., 2012), hypoxie (Vihanto et al., 2005), ischémie/reperfusion (Thundyil et al., 2013)...).

FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES
Morphologie cellulaire : Intégrité des Epithelia (Batlle et al., 2002).
Prolifération cellulaire/survie (Miao et al., 2001).
Développement embryonnaire (Klein, 2012) et neuronal (Depaepe et al., 2005),
Guidance axonale (Bernadskaya et al., 2012).
Plasticité synaptique (Sheffler-Collins and Dalva, 2012).
Secrétion insuline (Konstantinova et al., 2007).
Remodelage osseux (Matsuo and Otaki, 2012).
Angiogénèse (Sawamiphak et al., 2010; Wang et al., 2010b).
Fonction immunologique (cf infra).
IMPLICATION PATHOGENE
Mutation : Cataracte AD (Jun et al., 2009).
Récepteur d'entrée virale : HCV (Lupberger et al., 2011), HHV8 (Hahn et al., 2012).
Réponse granulomateuse aux mycobactéries par inhibition de la migration des cellules immunes (Khounlotham et al., 2009).
Implication dans la carcinogénèse (Pasquale, 2010)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tumorigénèse. Transduction du signal oncogénique.</li> <li>- Organisation spatiale de l'interaction récepteur ligand et potentiel invasif.</li> <li>- Migration/ métastases.</li> <li>- Angiogénèse tumorale.</li> <li>- Résistance à la chimiothérapie. Pronostic.</li> </ul>

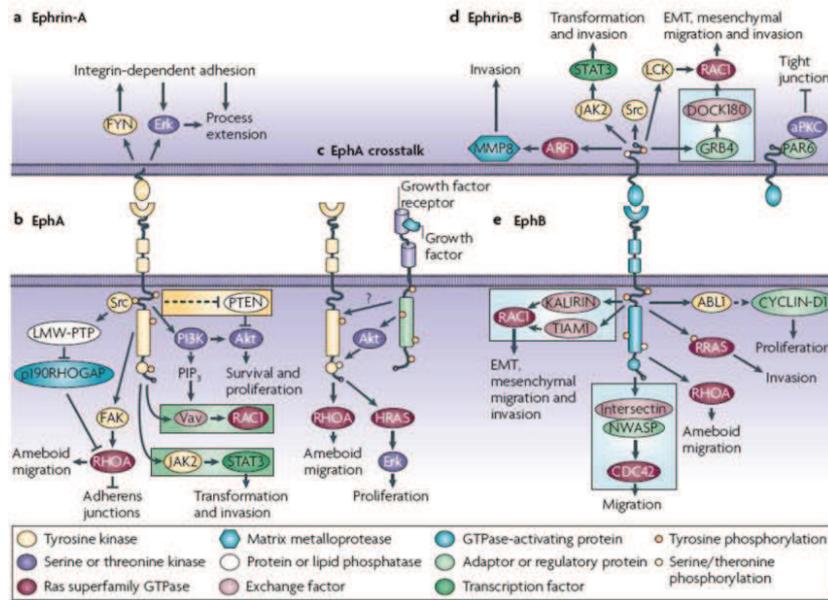
**Tableau 18. Rôle physiologique et implication pathogénique décrite pour Eph/ephrin.**

### 3. Signalisation bidirectionnelle du système Eph/ephrin et implication dans la tumorigénèse.

La multiplicité des situations physiologiques et pathologiques dans lesquelles le système Eph/ephrin a été impliqué, rend sa compréhension complexe. Les signaux générés ont la particularité de l'être le plus souvent de façon bidirectionnelle y compris par les éphrines-A (pourtant uniquement ancrées à la membrane via leur ancre GPI), via le recrutement de corécepteurs ayant la capacité à induire un signal intracellulaire. La revue, pourtant exhaustive de Pasquale (Pasquale, 2010) rend bien compte de cette difficulté de synthèse, en fonction du type d'Eph/ephrin, d'une situation dérégulée ou pas, ...; comme illustrée par les deux figures 30 et 31 des voies impliquées via le système Eph/ephrin dans la suppression ou la promotion tumorale. Ces différentes données ont toutefois fondé le développement de stratégie d'immunothérapie anticancéreuse ciblée sur EphA2 (Tandon et al., 2011).



**Figure 30. Suppression tumorale via la signalisation bidirectionnelle du couple Eph/ephrin (Pasquale, 2010).**  
a | Ephrin-A5 reverse signalling downregulates epidermal growth factor receptor (EGFR) levels in glioma cells. b | EphA receptors activate tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) in neurons to inactivate RHEB181. EphA activation of RHOA involves Ephexin family exchange factors and other pathways. EPHA2 inhibits Akt72,179 and inactivates focal adhesion kinase (FAK) through the SHP2 phosphatase. EPHA4 inhibits RAPI through spine-associated RAPGAP (SPAR). Recruitment of the lipid phosphatase SHIP2 by EPHA2 inhibits RAC1 and EPHA2 internalization. EPHA4 inhibits RAC1 through Chimaerins. EPHA2-mediated inhibition of ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) in epithelial cells inhibits epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). EPHA1 inhibits integrin-linked kinase (ILK). c | Ephrin-B1 disrupts focal adhesions through GRB4. Phosphorylation inhibits ephrin-B1 binding to PAR6, allowing PAR6 to bind GTP-bound CDC42 and activate atypical PKC (aPKC). Ephrin-Bs also inhibit signalling by the CXCR4 G protein-coupled chemokine receptor. d | EphB signalling increases expression of the p110 subunit of PI3K. EphB receptors (and EPHA2) activate Abl, which ultimately inhibits RAPI and RAC1. EPHB2 inactivates RRAS through phosphorylation. EPHB2 (and EPHA2) activates p120RASGAP to inhibit HRAS and RRAS. EPHB2 can also activate Erk79. Some pathways are assembled from different sources, so the complete pathways are hypothetical. Pathways identified in neurons, and predicted to have tumour suppressing activity, are in blue boxes. Most other pathways were identified in cultured cells and their importance in cancer also remains to be proved. Dotted lines indicate the regulation of expression levels. CDK5, cyclin-dependent kinase 5; GIT1, G protein-coupled receptor kinase-interacting ARFGAP 1; MMP2, matrix metalloproteinase 2; RAPGEF1, Rap guanine nucleotide exchange factor 1; RGS3, regulator of G protein signalling 3; SDF1, stromal cell-derived factor 1.



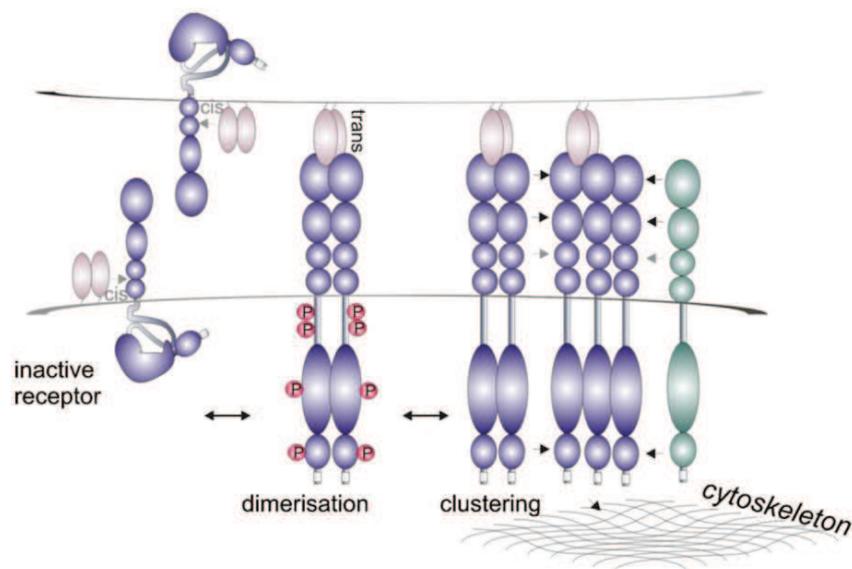
**Figure 31. Effet protumoral du système Eph/ephrin (Pasquale, 2010).** a | Ephrin-A5 reverse signalling promotes activation of FYN,  $\beta$ 1-integrins and Erk in fibroblasts<sup>5</sup>. b | Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP) is activated by Src and dephosphorylates and inactivates p190RHO GAP. This increases RHOA activity to destabilize adherens junctions in EPHA2-overexpressing epithelial cells<sup>103</sup>. EPHA2 (and EPHB2) activate RHOA through focal adhesion kinase (FAK)<sup>7,94</sup>. EPHA4 activates signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). A pathway involving EPHA2, PI3K and Vav family exchange factors for RAC1 operates in endothelial cells. Activation of EPHA2 activates Akt in pancreatic cancer cells. The *Caenorhabditis elegans* Eph receptor inhibits PTEN expression<sup>80</sup>. c | EPHA2–ERBB2 crosstalk activates the HRAS–Erk pathway and RHOA in a mouse mammary tumour model, enhancing tumour growth and *in vitro* cell proliferation and migration. Akt, activated by ERBB2 or other pathways, phosphorylates EPHA2. d | Ephrin-B reverse signalling affects pathways that promote invasiveness, including matrix metalloproteinase 8 (MMP8) secretion and activation of STAT3, Src and RAC1. By contrast, non-phosphorylated ephrin-B1 can bind PAR6 to inhibit atypical protein kinase C (aPKC). e | EphB forward signalling activates RAC1 and CDC42 exchange factors, which could promote cancer cell migration and invasion. EPHB4 activates RHOA<sup>93</sup>. EPHB2-mediated RRAS tyrosine phosphorylation increases glioma cell invasiveness<sup>96</sup>. EPHB2-mediated ABL1 activation increases cyclin-D1 levels. Pathways identified in neurons, endothelial and muscle cells, or *C. elegans* that are predicted to have tumour promoting activity are in blue, green or yellow boxes, respectively. Most other pathways were identified in cultured cells and their importance in cancer remains to be proved. ARF1, ADP-ribosylation factor 1; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; JAK2, Janus kinase 2.

#### 4. Modalités d'activation

Le déterminant majeur des changements fonctionnels consécutifs à ces différents types d'interaction cellulaire réside dans le niveau d'agrégation, d'activation et de phosphorylation du complexe Eph/ephrin. Classiquement, les RTK non liés à leur ligand s'associent très occasionnellement, et leur phosphorylation est strictement contrôlée par des phosphatases. La liaison du ligand induit une oligomérisation qui s'avère indispensable pour induire une phosphorylation efficace des tyrosines intracellulaires, en générant des motifs accessibles à des protéines adaptatrices qui assurent un lien dynamique avec les effecteurs d'aval (Pawson, 2007). Les concepts permettant de comprendre l'interaction Eph/ephrin sont plus complexes et ne peuvent s'interpréter de façon linéaire et classique (ce qui rend peut être compte des données apparemment contradictoires présentes dans la littérature) : schématiquement, (i) un premier complexe hétérotétramérique entre Eph et ephrin situés chacun de part et d'autre des cellules en interaction fait office de nucléation qui (ii) déclenche ensuite une extension latérale des agrégats (clusters) Eph/ephrin via différents types d'interactions Eph/ephrin et Eph/Eph ; (iii) c'est seulement alors que s'ensuit la modulation des circuits de phosphorylation traditionnelles. Il semble donc que c'est la taille et la composition de ces clusters qui détermine le devenir et la nature du signal (Janes et al., 2012).

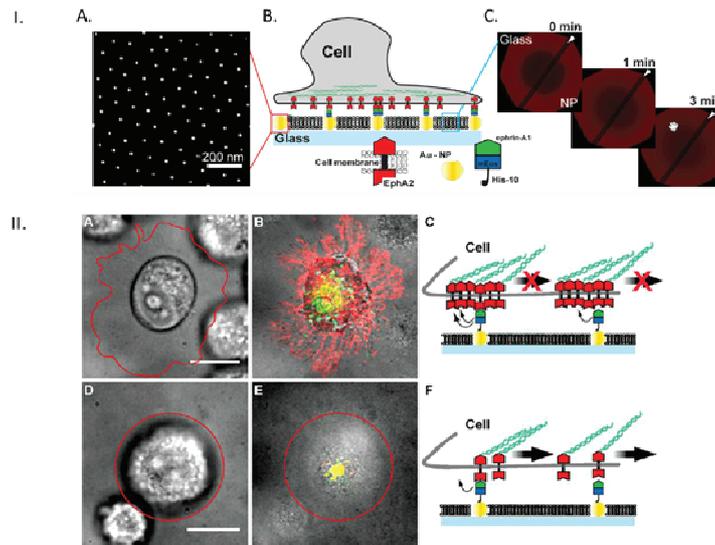
L'apport des structuralistes a été déterminant dans la compréhension de ces différents mécanismes. La cristallisation d'EphB2 a été faite en 1998 (Himanen et al., 1998), la modélisation de l'interaction EphB2-ephrinB1 en 2001 (Himanen et al., 2001), celle d'EphA2-ephrin A1 en 2009 (Himanen et al., 2009) , la démonstration d'un « processus multi-étapes » pour EphA2-ephrin A1 et A5 en 2010 (en relevant l'importance des interactions Eph/Eph en cis permettant d'élargir le complexe) (Himanen et al., 2010) avec l'identification des sites d'interface (Seiradake et al., 2010). La constitution de ces clusters est un phénomène dynamique qui possède ses régulateurs (Ex ADAM10 (Janes et al., 2005)) et dépend aussi de la balance nette du signal d'aval. Les différents types d'Eph n'ont pas la même capacité à s'agréger (Seiradake et al., 2013). Les clusters peuvent associer plusieurs types d'Eph (Janes et al., 2011) suggérant que leur incorporation différentielle pourrait représenter un mécanisme de modulation du signal (Astin et al., 2010).

La figure 32 fait la synthèse de ce modèle.



**Figure 32. Modèle d'agrégation et d'activation des Eph récepteurs (Janes et al., 2012).** The inactive Eph receptor is held in a closed, auto-inhibited conformation, released upon phosphorylation and activation. Ephrin binding to one receptor initiates dimerisation into an Eph/ephrin hetero-tetramer. Further clustering is facilitated by receptor–receptor interactions between multiple domains of adjacent Ephs, including co-clustering of A and B type Ephs (indicated by different colours; grey arrows indicate proposed interactions with conflicting data). Interactions with cytoplasmic proteins and the cytoskeleton may contribute to clustering, as well as transmitting biological responses.

Le développement de nouveaux outils (Groves and Kuriyan, 2010) a permis de démontrer le lien entre la circulation de ces différents récepteurs Eph à la surface de la membrane et leur organisation spatiale en clusters, avec leur fonction. Ceci a notamment été fait pour EphA2/ephrin A1 en démontrant l'impact d'une altération de cette circulation (par des barrières physiques de taille nanométrique) sur l'organisation du cytosquelette et les propriétés invasives de tumeurs mammaires (Salaita and Groves, 2010). La même équipe a développé ce modèle (Lohmuller et al., 2013), dont le principe est repris dans la figure suivante (figure 33).



**Figure 33. Modélisation du transport membranaire des clusters d'EphA2-ephrinA1 par un test d'obstacle nanométrique** (Lohmuller et al., 2013). Up. Schematic illustration of the experimental approach. (A) Scanning electron micrograph (SEM) of gold nanodots on the surface of a glass coverslip. (B) Schematic of the nanodot-supported lipid bilayer (SLB) platform; cancer cells expressing EphA2 deposited on this surface can interact with molecules of ephrin-A1 tethered to the nanodots or to the lipids within the SLB (or both). (C) FRAP images at different time points show the recovery of a Texas Red-DHPE SLB across the entire glass coverslip. This confirms that the membrane fluidity is not affected by the presence of the nanodots as previously reported. The dark diagonal stripe (indicated by the white arrow) across the FRAP images is a result of the dipping process for nanodot functionalization and depicts the border between the bare glass side and the nanodot patterned side. Down. Schematic description of frustrated EphA2 motion on the nanodot array platform. (A–C) Preclustered EphA2 on the surface of invasive cell lines are restrained by molecules of immobilized ephrin-A1 linked to the nanodots. If one EphA2 receptor within the cluster unbinds from ephrin-A1, another one in the cluster may rebind with enhanced probability as a result of proper geometrical juxtaposition. EphA2 clusters (red) are distributed along the cell protrusions. Only a few ephrin-A1 clusters (green) are transported to the center of the cell–SLB contact area and are colocalized with EphA2 (yellow). Cell outlines are highlighted by the red line. (D–F) For noninvasive cells, EphA2 may be less tightly clustered and therefore individual EphA2 receptors can bind immobile ephrin-A1 ligands. As the cell applies a pulling force, these receptors can unbind and become centrally transported by rebinding to mobile ephrin-A1. Scale bars are 10  $\mu\text{m}$ .

A partir de là, ils ont défini un coefficient d'adhésion (jamming coefficient), qui mesure le niveau de blocage du transport d'EphA2 à sa membrane. Ce « jamming coefficient » est corrélé à la tumorigénicité des différentes lignées cellulaires, alors que le niveau d'expression d'EphA2 seul ne l'est pas. Il pourrait être un paramètre de jugement intermédiaire à l'échelon cellulaire des conséquences de différents signaux de stress sur la réorganisation d'EphA2, bien plus pertinent que le niveau d'expression, voire même l'analyse isolée d'une voie de signalisation. Même si nous n'aborderons pas ces derniers aspects dans la suite du travail expérimental, il nous semblait intéressant de rapporter ces données récentes dans la mesure où elles ouvrent des perspectives de réflexion par rapport aux résultats que nous présentons.

## 5. Eph/ephrin et fonctions immunes

On a vu que le couple Eph/ephrin était impliqué dans de nombreux processus. Un rôle immunologique lui a également été attribué. Dans le système que nous présenterons au cours de ce travail, le couple Eph/ephrin est successivement envisagé comme un système de costimulation où le TCR  $\gamma\delta$  reconnaît EphA2 comme ligand puis comme un système d'immunomodulation d'un signal activateur du TCR. Dans les deux cas, il faut se souvenir qu'EphA2 est sur la cellule cible de la cellule T. La difficulté de l'analyse de la littérature réside dans l'angle d'attaque qui distingue le positionnement et l'effet respectif d'Eph et ephrin sur les différentes cellules. Actuellement, on retrouve un peu moins de 80

références PubMed en croisant les termes MeSH « Immunology » et « Ephrins », dans des situations diverses. La plupart des références analysent l'effet des Eph sur la cellule T. Une des limites majeures est l'absence d'anticorps commercial fonctionnant en cytométrie en flux spécifique des éphrines.

#### *a) Immunogénicité d'EphA2*

EphA2 a été rarement appréhendé comme un antigène activateur potentiel. Si tel est le cas, il s'agit d'un autoantigène puisqu'on a vu que son expression était ubiquitaire. Il a été impliqué dans différentes situations de stress dérégulé (cancer (Tandon et al., 2011), UV (Zhang et al., 2008), irradiations (Mosch et al., 2012), hypoxie (Vihanto et al., 2005), ischémie/reperfusion (Thundyil et al., 2013)...). Son niveau d'expression, d'agrégation et de phosphorylation sont autant d'éléments susceptibles de « signer » une agression cellulaire, et d'être « traduits » en signal activateur pour le système immunitaire. On retrouve là le concept évoqué plus haut d'épimunome (Swamy et al., 2010) envoyé par les cellules épithéliales agressées aux cellules lymphoïdes de stress tels que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  (Hayday, 2009), renvoyant à une notion plus générale d'autoimmunogénéité bénéfique inductible par le stress.

#### *b) Immunorégulation de la réponse cellulaire T par le système Eph/ephrin*

Plusieurs mécanismes moléculaires, tels qu'on peut le rencontrer au cours du développement ou la neurogénèse et qui passent souvent par une signalisation bidirectionnelle garantissant une plasticité de réponse adaptée au contexte ont été rapportés comme ayant un rôle en immunologie : ils font intervenir les protéines Net (Larrieu-Lahargue et al., 2012), les protéines « Slit/Roundabout » (Legg et al., 2008) et les semaphorines ((O'Connor et al., 2008) (Suzuki et al., 2007) (Suzuki et al., 2008) (Sakurai et al., 2012) et tout récemment dans le maintien des T regs (Delgoffe et al., 2013)). Ces protéines possèdent de fortes analogies avec le système Eph/ephrin.

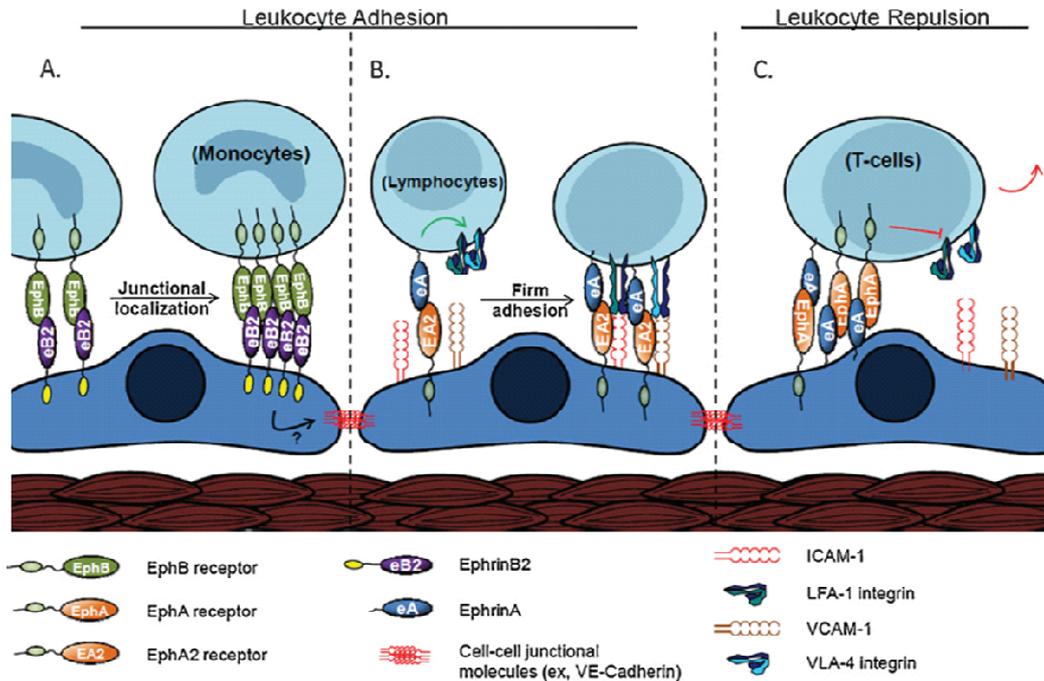
On peut distinguer schématiquement différentes situations :

##### *(1) Développement des cellules T*

Les thymocytes et les cellules du microenvironnement thymique dont les cellules épithéliales thymiques de la médullaire expriment la paire de ligand/récepteurs semaphorines/neurophilines et Eph/ephrins (essentiellement de groupe B). Il a été suggéré que les phénomènes d'attraction/répulsion générés sont susceptibles d'intervenir dans l'entrée, la migration et la sortie des thymocytes, contribuant ainsi à leur différenciation (Mendes-da-Cruz et al., 2012).

##### *(2) Adhésion/migration cellulaire*

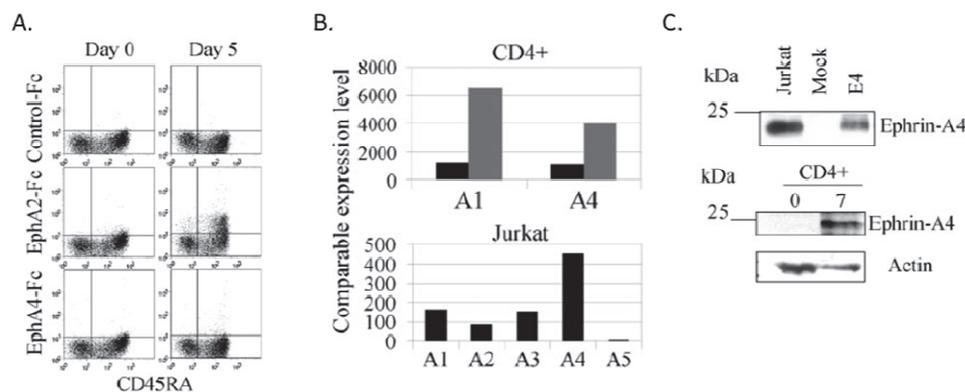
L'extravasation cellulaire est un processus multiétape, durant lequel les mécanismes d'adhésion/répulsion sont majeurs. La phase initiale de roulement (« rolling and tethering ») semble particulièrement critique. Il n'est pas étonnant de retrouver les Eph/ephrins au stade de l'interaction des cellules immunes circulants (monocytes, lymphocytes) avec la cellule endothéliale, impliqués dans la coordination séquentielle des molécules d'adhésion et notamment la modulation des intégrines (Korff et al., 2008; Sharfe et al., 2008). Une synthèse de leur rôle potentiel a récemment été proposée en revue (Funk et al., 2012) (figure 35).



**Figure 34. Exemples documentés d'adhésion ou de répulsion des leucocytes avec les cellules endothéliales médiées par le système Eph/ephrin** (Funk et al., 2012). (A) Korff and colleagues (Korff et al., 2008) demonstrated that monocyte EphB–endothelial ephrinB2 (eB2) interactions induce localization of monocytes and the EphB–ephrinB2 complex to endothelial cell junctions preceding transmigration. (B) Sharfe et al. (Sharfe et al., 2008) showed that lymphocyte ephrinA (eA) activation by EphA2 enhances lymphocyte integrin 41 adhesion to substrates (VCAM-1 or fibronectin), and stimulating endothelial EphA2 with ephrinA ligands promotes EphA2 co-localization with the lymphocyte integrin substrates VCAM-1 and ICAM-1. (C) Sharfe et al. (Sharfe et al., 2008) additionally showed that stimulating lymphocyte EphA receptors with ephrinA ligands inhibits integrin activation and adhesion, suggesting a repulsive response in endothelial cells predominately expressing ephrinA ligands.

La paire Eph/ephrin a été identifiée dans la migration de certaines cellules dendritiques (de Saint-Vis et al., 2003) (Munthe et al., 2004). La lymphocytose B observée durant les leucémies lymphoïdes chroniques pourrait être expliquée par la régulation de la migration des cellules B pathologiques à travers les « hautes veinules endothéliales » (HEV) des organes lymphoïdes secondaires via le système ephrinA4/EphA2 (Trinidad et al., 2009).

Le rôle des Eph/ephrin dans l'adhésion et la migration cellulaire a également été largement documenté par le groupe d'Oslo, qui a en plus procédé à l'analyse de la signalisation cellulaire. Ils se sont focalisés sur les Eph lymphocytaires (Aasheim et al., 2005; Holen et al., 2010) (Hjorthaug and Aasheim, 2007). Leurs données suggèrent que les Eph pourraient interférer avec la signalisation du TCR et des intégrines. Ils ont également étudié la situation inverse des ephrins lymphocytaires (Holen et al., 2008). Ce dernier papier fournit notamment des données intéressantes sur l'expression inductible d'éphrine A4 sur les lymphocytes et sur des lignées Jurkat en présence de sérum humain (figure 36), avec la limite d'une première mise en évidence en cytométrie indirecte par le marquage secondaire de la fixation d'Eph-Fc (et le risque d'une fixation non spécifique sur des récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines, mais surtout l'absence de certitude sur la nature de l'éphrin sur laquelle se fixent les Eph-Fc).



**Figure 35. Expression lymphocytaire des ephrins, adapté de Holen et al, JLB 2008 (Holen et al., 2008).** (A) Costaining of CD4 cells with anti-CD45RA and control-Fc, EphA2-Fc, or EphA4-Fc. Days of incubation in medium with human serum are indicated above the panels. Increase expression of EphA ligands on T cells. (B) Quantitative RT-PCR of ephrin-A mRNA in CD4 cells (upper panel) and Jurkat TAg (lower panel). The specific ephrin-A member is shown below the bars. Black bar, day 0; gray bar, day 5. A representative experiment of three is shown. (C) Detection of ephrin-A4 protein expression by immunoprecipitation. Ephrin-A4 antibody precipitations were performed in lysates prepared from 50.106 Jurkat TAg cells or 0.2.106-transfected 293T cells (upper panel). E4 is an immunoprecipitate from ephrin-A4-transfected HEK293T cells. Mock is an immunoprecipitate from HEK293T lysate transfected with an empty expression vector. Actin antibody incubation serves as a loading control for input lysate. The lower panel shows ephrin-A4 immunoprecipitation from CD4 T cells. Numbers above this panel indicate days of incubation in medium with human serum.

### (3) Activation/Modulation

Quelques situations où le système Eph/ephrin module l'activation cellulaire T ont été rapportées.

La molécule EphB6 pourrait agir comme une molécule de costimulation de l'activation T, en migrant au niveau des radeaux lipidiques de TCR agrégés et modulant le niveau de phosphorylation des protéines d'aval (activation de ZAP-70, phosphorylation de LAT, association de PLC $\gamma$ 1 with SLP-76, activation de p44/42 MAPK). La souris K0 EphB6 présente d'ailleurs une réponse immune T fortement altérée (Luo et al., 2002) (Luo et al., 2004).

L'engagement des EphA par éphrine A1 (Freywald et al., 2006) pourrait contribuer à la résistance à l'apoptose induite par l'activation (AICD) par des anti-CD3 sur des thymocytes.

L'activation de la signalisation d'aval des EphB aurait un rôle immunomodulateur après activation par des anti-CD3 de cellules murines primaires T (Kawano et al., 2012).

La protéine ephrin-A1 au niveau des cellules T CD4+ pourrait avoir un rôle dans la différenciation Th2 : dans le modèle de polarisation Th2 qu'est l'asthme, (i) l'expression génique d'éphrine-A1 est diminuée, (ii) l'immunomarquage éphrine-A1 est fort dans le poumon mais faible dans les aires corticales des ganglions lymphatiques, et absent de la rate (iii) sa colocalisation avec son récepteur n'est retrouvée que dans le poumon, (iv) l'activation in vitro des cellules T induit la diminution des ARN messagers et des protéines d'éphrine-A1, (v) la prolifération cellulaire T et l'AICD sont inhibées par le crosslinking d'éphrine-A1 mais pas par l'engagement des Eph, (vi) l'expression d'IL-2 et d'IL-4 est diminuée par l'engagement d'éphrine-A1. Ces résultats suggèrent donc un rôle immunomodulateur pour éphrine-A1 sur les cellules T CD4 Th2 (Wohlfahrt et al., 2004).

On mentionnera dans cette même perspective qu'un rôle immunomodulateur a aussi été décrit pour le système semaphorin/plexin (Holl et al., 2012) (O'Connor et al., 2008) (Suzuki et al., 2007) (Suzuki et al., 2008) (Sakurai et al., 2012) et la semaphorin D est exprimée par les DETC contribuant à leur régulation (Witherden et al., 2012).

## F. BIBLIOGRAPHIE INTRODUCTION

1. Aasheim, H. C., Delabie, J., and Finne, E. F. (2005). Ephrin-A1 binding to CD4+ T lymphocytes stimulates migration and induces tyrosine phosphorylation of PYK2. *Blood* 105, 2869-2876.
2. Agea, E., Russano, A., Bistoni, O., Mannucci, R., Nicoletti, I., Corazzi, L., Postle, A. D., De Libero, G., Porcelli, S. A., and Spinozzi, F. (2005). Human CD1-restricted T cell recognition of lipids from pollens. *J Exp Med* 202, 295-308.
3. Agrati, C., Alonzi, T., De Santis, R., Castilletti, C., Abbate, I., Capobianchi, M. R., D'Offizi, G., Siepi, F., Fimia, G. M., Tripodi, M., and Poccia, F. (2006). Activation of Vgamma9Vdelta2 T cells by non-peptidic antigens induces the inhibition of subgenomic HCV replication. *Int Immunol* 18, 11-18.
4. Agrati, C., D'Offizi, G., Narciso, P., Abrignani, S., Ippolito, G., Colizzi, V., and Poccia, F. (2001). Vdelta1 T lymphocytes expressing a Th1 phenotype are the major gammadelta T cell subset infiltrating the liver of HCV-infected persons. *Mol Med* 7, 11-19.
5. Alaibac, M., Morris, J., Yu, R., and Chu, A. C. (1992). T lymphocytes bearing the gamma delta T-cell receptor: a study in normal human skin and pathological skin conditions. *Br J Dermatol* 127, 458-462.
6. Allison, T. J., Winter, C. C., Fournie, J. J., Bonneville, M., and Garboczi, D. N. (2001). Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* 411, 820-824.
7. Alwine, J. C. (2008). Modulation of host cell stress responses by human cytomegalovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 325, 263-279.
8. Anane, L. H., Edwards, K. M., Burns, V. E., Zanten, J. J., Drayson, M. T., and Bosch, J. A. (2010). Phenotypic characterization of gammadelta T cells mobilized in response to acute psychological stress. *Brain Behav Immun* 24, 608-614.
9. Ansel, K. M., Ngo, V. N., Hyman, P. L., Luther, S. A., Forster, R., Sedgwick, J. D., Browning, J. L., Lipp, M., and Cyster, J. G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 406, 309-314.
10. Appay, V., Dunbar, P. R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G. M., Papagno, L., Ogg, G. S., King, A., Lechner, F., Spina, C. A., *et al.* (2002). Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 8, 379-385.
11. Archdeacon, P., Chan, M., Neuland, C., Velidedeoglu, E., Meyer, J., Tracy, L., Cavaille-Coll, M., Bala, S., Hernandez, A., and Albrecht, R. (2011). Summary of FDA antibody-mediated rejection workshop. *Am J Transplant* 11, 896-906.
12. Arosa, F. A., Santos, S. G., and Powis, S. J. (2007). Open conformers: the hidden face of MHC-I molecules. *Trends Immunol* 28, 115-123.
13. Asberg, A., Humar, A., Rollag, H., Jardine, A. G., Mouas, H., Pescovitz, M. D., Sgarabotto, D., Tuncer, M., Noronha, I. L., and Hartmann, A. (2007). Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 7, 2106-2113.
14. Astin, J. W., Batson, J., Kadir, S., Charlet, J., Persad, R. A., Gillatt, D., Oxley, J. D., and Nobes, C. D. (2010). Competition amongst Eph receptors regulates contact inhibition of locomotion and invasiveness in prostate cancer cells. *Nat Cell Biol* 12, 1194-1204.
15. Atabani, S. F., Smith, C., Atkinson, C., Aldridge, R. W., Rodriguez-Peralvarez, M., Rolando, N., Harber, M., Jones, G., O'Riordan, A., Burroughs, A. K., *et al.* (2012). Cytomegalovirus replication kinetics in solid organ transplant recipients managed by preemptive therapy. *Am J Transplant* 12, 2457-2464.
16. Audard, V., Matignon, M., Hemery, F., Snanoudj, R., Desgranges, P., Anglade, M. C., Kobeiter, H., Durrbach, A., Charpentier, B., Lang, P., and Grimbirt, P. (2006). Risk factors and long-term outcome of transplant renal artery stenosis in adult recipients after treatment by percutaneous transluminal angioplasty. *Am J Transplant* 6, 95-99.
17. Autran, B., Triebel, F., Katlama, C., Rozenbaum, W., Hercend, T., and Debre, P. (1989). T cell receptor gamma/delta+ lymphocyte subsets during HIV infection. *Clin Exp Immunol* 75, 206-210.
18. Bach, F. H., Ferran, C., Hechenleitner, P., Mark, W., Koyamada, N., Miyatake, T., Winkler, H., Badrichani, A., Candinas, D., and Hancock, W. W. (1997). Accommodation of vascularized xenografts: expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nat Med* 3, 196-204.
19. Bachelez, H., Flageul, B., Degos, L., Boumsell, L., and Bensussan, A. (1992). TCR gamma delta bearing T lymphocytes infiltrating human primary cutaneous melanomas. *J Invest Dermatol* 98, 369-374.
20. Bai, L., Picard, D., Anderson, B., Chaudhary, V., Luoma, A., Jabri, B., Adams, E. J., Savage, P. B., and Bendelac, A. (2012). The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant Vdelta1 TCR. *Eur J Immunol* 42, 2505-2510.
21. Barclay, A. N. (2003). Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules. *Semin Immunol* 15, 215-223.
22. Barcy, S., De Rosa, S. C., Vieira, J., Diem, K., Ikoma, M., Casper, C., and Corey, L. (2008). Gamma delta+ T cells involvement in viral immune control of chronic human herpesvirus 8 infection. *J Immunol* 180, 3417-3425.

23. Batlle, E., Henderson, J. T., Beghtel, H., van den Born, M. M., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van de Wetering, M., Pawson, T., and Clevers, H. (2002). Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* *111*, 251-263.
24. Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* *285*, 727-729.
25. Bentz, G. L., and Yurochko, A. D. (2008). Human CMV infection of endothelial cells induces an angiogenic response through viral binding to EGF receptor and beta1 and beta3 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 5531-5536.
26. Bernadskaya, Y. Y., Wallace, A., Nguyen, J., Mohler, W. A., and Soto, M. C. (2012). UNC-40/DCC, SAX-3/Robo, and VAB-1/Eph polarize F-actin during embryonic morphogenesis by regulating the WAVE/SCAR actin nucleation complex. *PLoS Genet* *8*, e1002863.
27. Bhagat, G., Naiyer, A. J., Shah, J. G., Harper, J., Jabri, B., Wang, T. C., Green, P. H., and Manavalan, J. S. (2008). Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Invest* *118*, 281-293.
28. Bialasiewicz, A. A., Ma, J. X., and Richard, G. (1999). Alpha/beta- and gamma/delta TCR(+) lymphocyte infiltration in necrotising choroidal melanomas. *Br J Ophthalmol* *83*, 1069-1073.
29. Bieniasz, P. D. (2004). Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol* *5*, 1109-1115.
30. Bindon, C. I., Hale, G., Bruggemann, M., and Waldmann, H. (1988). Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J Exp Med* *168*, 127-142.
31. Biron, C. A., Byron, K. S., and Sullivan, J. L. (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* *320*, 1731-1735.
32. Blink, S. E., and Miller, S. D. (2009). The contribution of gammadelta T cells to the pathogenesis of EAE and MS. *Curr Mol Med* *9*, 15-22.
33. Boeckh, M., and Geballe, A. P. (2011). Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest* *121*, 1673-1680.
34. Boehm, T., McCurley, N., Sutoh, Y., Schorpp, M., Kasahara, M., and Cooper, M. D. (2012). VLR-based adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* *30*, 203-220.
35. Boehme, K. W., Guerrero, M., and Compton, T. (2006). Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol* *177*, 7094-7102.
36. Bonneville, M., Ishida, I., Mombaerts, P., Katsuki, M., Verbeek, S., Berns, A., and Tonegawa, S. (1989). Blockage of alpha beta T-cell development by TCR gamma delta transgenes. *Nature* *342*, 931-934.
37. Bonneville, M., Janeway, C. A., Jr., Ito, K., Haser, W., Ishida, I., Nakanishi, N., and Tonegawa, S. (1988). Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of gamma delta T cells. *Nature* *336*, 479-481.
38. Bonneville, M., O'Brien, R. L., and Born, W. K. (2010). Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* *10*, 467-478.
39. Born, W., Hall, L., Dallas, A., Boymel, J., Shinnick, T., Young, D., Brennan, P., and O'Brien, R. (1990). Recognition of a peptide antigen by heat shock--reactive gamma delta T lymphocytes. *Science* *249*, 67-69.
40. Born, W. K., and O'Brien, R. L. (2009). Antigen-restricted gammadelta T-cell receptors? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* *57*, 129-135.
41. Born, W. K., Vollmer, M., Reardon, C., Matsuura, E., Voelker, D. R., Giclas, P. C., and O'Brien, R. L. (2003). Hybridomas expressing gammadelta T-cell receptors respond to cardiolipin and beta2-glycoprotein 1 (apolipoprotein H). *Scand J Immunol* *58*, 374-381.
42. Borst, J., Vroom, T. M., Bos, J. D., and Van Dongen, J. J. (1991). Tissue distribution and repertoire selection of human gamma delta T cells: comparison with the murine system. *Curr Top Microbiol Immunol* *173*, 41-46.
43. Botto, S., Streblov, D. N., DeFilippis, V., White, L., Kreklywich, C. N., Smith, P. P., and Caposio, P. (2011). IL-6 in human cytomegalovirus secretome promotes angiogenesis and survival of endothelial cells through the stimulation of survivin. *Blood* *117*, 352-361.
44. Boullier, S., Cochet, M., Poccia, F., and Gougeon, M. L. (1995). CDR3-independent gamma delta V delta 1+ T cell expansion in the peripheral blood of HIV-infected persons. *J Immunol* *154*, 1418-1431.
45. Boyden, L. M., Lewis, J. M., Barbee, S. D., Bas, A., Girardi, M., Hayday, A. C., Tigelaar, R. E., and Lifton, R. P. (2008). Skint1, the prototype of a newly identified immunoglobulin superfamily gene cluster, positively selects epidermal gammadelta T cells. *Nat Genet* *40*, 656-662.
46. Brandes, M., Willmann, K., and Moser, B. (2005). Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science* *309*, 264-268.
47. Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., *et al.* (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* *12*, 1365-1371.

48. Brestrich, G., Zwinger, S., Roemhild, A., Noutsias, M., Rohde, M., Keeren, K., Sawitzki, B., Volk, H. D., Reinke, P., and Hammer, M. H. (2009). Generation of HCMV-specific T-cell lines from seropositive solid-organ-transplant recipients for adoptive T-cell therapy. *J Immunother* *32*, 932-940.
49. Bruder, J., Siewert, K., Obermeier, B., Malotka, J., Scheinert, P., Kellermann, J., Ueda, T., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2012). Target specificity of an autoreactive pathogenic human gammadelta-T cell receptor in myositis. *J Biol Chem* *287*, 20986-20995.
50. Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S., and Daeron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* *113*, 3716-3725.
51. Bucy, R. P., Chen, C. L., and Cooper, M. D. (1989). Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of T gamma delta cells in humans. *J Immunol* *142*, 3045-3049.
52. Bukowski, J. F., Morita, C. T., and Brenner, M. B. (1994). Recognition and destruction of virus-infected cells by human gamma delta CTL. *J Immunol* *153*, 5133-5140.
53. Bukowski, J. F., Warner, J. F., Dennert, G., and Welsh, R. M. (1985). Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J Exp Med* *161*, 40-52.
54. Caccamo, N., Todaro, M., La Manna, M. P., Sireci, G., Stassi, G., and Dieli, F. (2012). IL-21 regulates the differentiation of a human gammadelta T cell subset equipped with B cell helper activity. *PLoS One* *7*, e41940.
55. Cai, Y., Shen, X., Ding, C., Qi, C., Li, K., Li, X., Jala, V. R., Zhang, H. G., Wang, T., Zheng, J., and Yan, J. (2011). Pivotal role of dermal IL-17-producing gammadelta T cells in skin inflammation. *Immunity* *35*, 596-610.
56. Cantisan, S., Lara, R., Montejo, M., Redel, J., Rodriguez-Benot, A., Gutierrez-Aroca, J., Gonzalez-Padilla, M., Bueno, L., Rivero, A., Solana, R., and Torre-Cisneros, J. (2013). Pretransplant interferon-gamma secretion by CMV-specific CD8+ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am J Transplant* *13*, 738-745.
57. Capone, M., Netzer, S., Villacreces, A., Juzan, M., Praloran, V., Moreau, J. F., and Dechanet-Merville, J. (2012). Implication of gamma delta T cells in the immune response against murine CMV. *Immunology* *137*, 400-400.
58. Caposio, P., Orloff, S. L., and Streblov, D. N. (2011). The role of cytomegalovirus in angiogenesis. *Virus Res* *157*, 204-211.
59. Carding, S. R., and Egan, P. J. (2002). Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* *2*, 336-345.
60. Catellani, S., Poggi, A., Bruzzone, A., Dadati, P., Ravetti, J. L., Gobbi, M., and Zocchi, M. R. (2007). Expansion of Vδ1 T lymphocytes producing IL-4 in low-grade non-Hodgkin lymphomas expressing UL-16-binding proteins. *Blood* *109*, 2078-2085.
61. Cavanaugh, V. J., Deng, Y., Birkenbach, M. P., Slater, J. S., and Campbell, A. E. (2003). Vigorous innate and virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses to murine cytomegalovirus in the submaxillary salivary gland. *J Virol* *77*, 1703-1717.
62. Cavignac, Y., and Esclatine, A. (2010). Herpesviruses and autophagy: catch me if you can! *Viruses* *2*, 314-333.
63. Champagne, E. (2011). gammadelta T cell receptor ligands and modes of antigen recognition. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* *59*, 117-137.
64. Chan, G., Nogalski, M. T., and Yurochko, A. D. (2009). Activation of EGFR on monocytes is required for human cytomegalovirus entry and mediates cellular motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 22369-22374.
65. Chaudhuri, A., Ozawa, M., Everly, M. J., Ettenger, R., Dharnidharka, V., Benfield, M., Mathias, R., Portale, A., McDonald, R., Harmon, W., *et al.* (2013). The clinical impact of humoral immunity in pediatric renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* *24*, 655-664.
66. Cheng, J., Ke, Q., Jin, Z., Wang, H., Kocher, O., Morgan, J. P., Zhang, J., and Crumpacker, C. S. (2009). Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure. *PLoS Pathog* *5*, e1000427.
67. Chiche, L., Forel, J. M., Roch, A., Guervilly, C., Pauly, V., Allardet-Servent, J., Gannier, M., Zandotti, C., and Papazian, L. (2009). Active cytomegalovirus infection is common in mechanically ventilated medical intensive care unit patients. *Crit Care Med* *37*, 1850-1857.
68. Chien, Y. H., and Bonneville, M. (2006). Gamma delta T cell receptors. *Cell Mol Life Sci* *63*, 2089-2094.
69. Chien, Y. H., Iwashima, M., Kaplan, K. B., Elliott, J. F., and Davis, M. M. (1987). A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature* *327*, 677-682.
70. Chien, Y. H., and Konigshofer, Y. (2007). Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunol Rev* *215*, 46-58.
71. Chodaczek, G., Papanna, V., Zal, M. A., and Zal, T. (2012). Body-barrier surveillance by epidermal gammadelta TCRs. *Nat Immunol* *13*, 272-282.
72. Choudhary, A., Davodeau, F., Moreau, A., Peyrat, M. A., Bonneville, M., and Jotereau, F. (1995). Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gamma delta tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma. *J Immunol* *154*, 3932-3940.

73. Ciccone, E., Viale, O., Pende, D., Malnati, M., Battista Ferrara, G., Barocci, S., Moretta, A., and Moretta, L. (1989). Specificity of human T lymphocytes expressing a gamma/delta T cell antigen receptor. Recognition of a polymorphic determinant of HLA class I molecules by a gamma/delta clone. *Eur J Immunol* *19*, 1267-1271.
74. Clatworthy, M. R., Watson, C. J., Plotnek, G., Bardsley, V., Chaudhry, A. N., Bradley, J. A., and Smith, K. G. (2009). B-cell-depleting induction therapy and acute cellular rejection. *N Engl J Med* *360*, 2683-2685.
75. Cobbold, M., Khan, N., Pourgheysari, B., Tauro, S., McDonald, D., Osman, H., Assenmacher, M., Billingham, L., Steward, C., Crawley, C., *et al.* (2005). Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med* *202*, 379-386.
76. Coelho, V., Moliterno, R., Higuchi, M. L., Guilherme, L., Cunha-Neto, E., Fiorelli, A. I., and Kalil, J. (1995). Gamma delta T cells play no major role in human heart allograft rejection. *Transplantation* *60*, 980-984.
77. Collins, C., Shi, C., Russell, J. Q., Fortner, K. A., and Budd, R. C. (2008). Activation of gamma delta T cells by *Borrelia burgdorferi* is indirect via a TLR- and caspase-dependent pathway. *J Immunol* *181*, 2392-2398.
78. Colvin, R. B., and Smith, R. N. (2005). Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol* *5*, 807-817.
79. Constant, P., Davodeau, F., Peyrat, M. A., Poquet, Y., Puzo, G., Bonneville, M., and Fournie, J. J. (1994). Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* *264*, 267-270.
80. Conti, L., Casetti, R., Cardone, M., Varano, B., Martino, A., Belardelli, F., Poccia, F., and Gessani, S. (2005). Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines. *J Immunol* *174*, 252-260.
81. Cook, D. J., Terasaki, P. I., Iwaki, Y., Terashita, G., Takeda, A., Fujikawa, J., Lau, M., Danovitch, G., Rosenthal, J. T., Fine, R., and *et al.* (1987). The flow cytometry crossmatch in kidney transplantation. *Clin Transpl*, 409-414.
82. Corvaisier, M., Moreau-Aubry, A., Diez, E., Bennouna, J., Mosnier, J. F., Scotet, E., Bonneville, M., and Jotereau, F. (2005). V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol* *175*, 5481-5488.
83. Costa, G., Loizon, S., Guenot, M., Mocan, I., Halary, F., de Saint-Basile, G., Pitard, V., Dechanet-Merville, J., Moreau, J. F., Troye-Blomberg, M., *et al.* (2011). Control of *Plasmodium falciparum* erythrocytic cycle: gammadelta T cells target the red blood cell-invasive merozoites. *Blood* *118*, 6952-6962.
84. Couzi, L., Araujo, C., Guidicelli, G., Bachelet, T., Moreau, K., Morel, D., Robert, G., Wallerand, H., Moreau, J. F., Taupin, J. L., and Merville, P. (2011a). Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. *Transplantation* *91*, 527-535.
85. Couzi, L., Helou, S., Bachelet, T., Moreau, K., Martin, S., Morel, D., Lafon, M. E., Boyer, B., Alain, S., Garrigue, I., and Merville, P. (2012a). High incidence of anticytomegalovirus drug resistance among D+R- kidney transplant recipients receiving preemptive therapy. *Am J Transplant* *12*, 202-209.
86. Couzi, L., Lafarge, X., Pitard, V., Neau-Cransac, M., Dromer, C., Billes, M. A., Lacaille, F., Moreau, J. F., Merville, P., and Dechanet-Merville, J. (2011b). Gamma-delta T cell expansion is closely associated with cytomegalovirus infection in all solid organ transplant recipients. *Transpl Int* *24*, e40-42.
87. Couzi, L., Levallant, Y., Jamai, A., Pitard, V., Lassalle, R., Martin, K., Garrigue, I., Hawchar, O., Siberchicot, F., Moore, N., *et al.* (2010). Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* *21*, 181-188.
88. Couzi, L., Pitard, V., Netzer, S., Garrigue, I., Lafon, M. E., Moreau, J. F., Taupin, J. L., Merville, P., and Dechanet-Merville, J. (2009). Common features of gammadelta T cells and CD8(+) alphabeta T cells responding to human cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *J Infect Dis* *200*, 1415-1424.
89. Couzi, L., Pitard, V., Sicard, X., Garrigue, I., Hawchar, O., Merville, P., Moreau, J. F., and Dechanet-Merville, J. (2012b). Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human gammadelta T cells expressing CD16 (FcgammaRIIIa). *Blood* *119*, 1418-1427.
90. Craig, J. M., Macauley, J. C., Weller, T. H., and Wirth, P. (1957). Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Soc Exp Biol Med* *94*, 4-12.
91. Crough, T., and Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* *22*, 76-98, Table of Contents.
92. D'Apice, A. J., and Morris, P. J. (1974). The role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in renal allograft rejection. *Transplantation* *18*, 20-26.
93. Dalton, J. E., Howell, G., Pearson, J., Scott, P., and Carding, S. R. (2004). Fas-Fas ligand interactions are essential for the binding to and killing of activated macrophages by gamma delta T cells. *J Immunol* *173*, 3660-3667.
94. Das, H., Groh, V., Kuijl, C., Sugita, M., Morita, C. T., Spies, T., and Bukowski, J. F. (2001). MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* *15*, 83-93.
95. Dausset, J., Colombani, J., Feingold, N., and Rapaport, F. (1965). [a Leukocyte Group System and Its Relations with Histocompatibility]. *Nouv Rev Fr Hematol* *5*, 17-22.
96. Davey, M. S., Lin, C. Y., Roberts, G. W., Heuston, S., Brown, A. C., Chess, J. A., Toleman, M. A., Gahan, C. G., Hill, C., Parish, T., *et al.* (2011). Human neutrophil clearance of bacterial pathogens triggers anti-microbial gammadelta T cell responses in early infection. *PLoS Pathog* *7*, e1002040.

97. de Kort, H., Willicombe, M., Brookes, P., Dominy, K. M., Santos-Nunez, E., Galliford, J. W., Chan, K., Taube, D., McLean, A. G., Cook, H. T., and Roufousse, C. (2013). Microcirculation inflammation associates with outcome in renal transplant patients with de novo donor-specific antibodies. *Am J Transplant* *13*, 485-492.
98. De Maria, A., Ferrazin, A., Ferrini, S., Ciccone, E., Terragna, A., and Moretta, L. (1992). Selective increase of a subset of T cell receptor gamma delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* *165*, 917-919.
99. De Paoli, P., Gennari, D., Martelli, P., Basaglia, G., Crovatto, M., Battistin, S., and Santini, G. (1991). A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* *83*, 187-191.
100. De Rosa, S. C., Andrus, J. P., Perfetto, S. P., Mantovani, J. J., Herzenberg, L. A., Herzenberg, L. A., and Roederer, M. (2004). Ontogeny of gamma delta T cells in humans. *J Immunol* *172*, 1637-1645.
101. de Saint-Vis, B., Bouchet, C., Gautier, G., Valladeau, J., Caux, C., and Garrone, P. (2003). Human dendritic cells express neuronal Eph receptor tyrosine kinases: role of EphA2 in regulating adhesion to fibronectin. *Blood* *102*, 4431-4440.
102. de Villartay, J. P., Lim, A., Al-Mousa, H., Dupont, S., Dechanet-Merville, J., Coumau-Gatbois, E., Gougeon, M. L., Lemainque, A., Eidenschenk, C., Jouanguy, E., *et al.* (2005). A novel immunodeficiency associated with hypomorphic RAG1 mutations and CMV infection. *J Clin Invest* *115*, 3291-3299.
103. Dean, P. G., Park, W. D., Cornell, L. D., Gloor, J. M., and Stegall, M. D. (2012). Intra-graft gene expression in positive crossmatch kidney allografts: ongoing inflammation mediates chronic antibody-mediated injury. *Am J Transplant* *12*, 1551-1563.
104. Dechanet, J., Merville, P., Berge, F., Bone-Mane, G., Taupin, J. L., Michel, P., Joly, P., Bonneville, M., Potaux, L., and Moreau, J. F. (1999a). Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *J Infect Dis* *179*, 1-8.
105. Dechanet, J., Merville, P., Lim, A., Retiere, C., Pitard, V., Lafarge, X., Michelson, S., Meric, C., Hallet, M. M., Kourilsky, P., *et al.* (1999b). Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest* *103*, 1437-1449.
106. DeFilippis, V. R., Sali, T., Alvarado, D., White, L., Bresnahan, W., and Fruh, K. J. (2010). Activation of the interferon response by human cytomegalovirus occurs via cytoplasmic double-stranded DNA but not glycoprotein B. *J Virol* *84*, 8913-8925.
107. Del Bello, A., Congy, N., Sallusto, F., Cardeau-Desangles, I., Fort, M., Esposito, L., Guitard, J., Cointault, O., Lavayssiere, L., Nogier, M. B., *et al.* (2012). Anti-human leukocyte antigen immunization after early allograft nephrectomy. *Transplantation* *93*, 936-941.
108. Delgoffe, G. M., Woo, S. R., Turnis, M. E., Gravano, D. M., Guy, C., Overacre, A. E., Bettini, M. L., Vogel, P., Finkelstein, D., Bonnevier, J., *et al.* (2013). Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature*.
109. Depaape, V., Suarez-Gonzalez, N., Dufour, A., Passante, L., Gorski, J. A., Jones, K. R., Ledent, C., and Vanderhaeghen, P. (2005). Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature* *435*, 1244-1250.
110. Deteix, C., Attuyl-Audenis, V., Duthey, A., Patey, N., McGregor, B., Dubois, V., Caligiuri, G., Graff-Dubois, S., Morelon, E., and Thauinat, O. (2010). Intra-graft Th17 infiltrate promotes lymphoid neogenesis and hastens clinical chronic rejection. *J Immunol* *184*, 5344-5351.
111. Devaud, C., Bilhere, E., Loizon, S., Pitard, V., Behr, C., Moreau, J. F., Dechanet-Merville, J., and Capone, M. (2009). Antitumor activity of gammadelta T cells reactive against cytomegalovirus-infected cells in a mouse xenograft tumor model. *Cancer Res* *69*, 3971-3978.
112. Devaud, C., Rousseau, B., Netzer, S., Pitard, V., Paroissin, C., Khairallah, C., Costet, P., Moreau, J. F., Couillaud, F., Dechanet-Merville, J., and Capone, M. (2012). Anti-metastatic potential of human Vdelta1(+) gammadelta T cells in an orthotopic mouse xenograft model of colon carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* *62*, 1199-1210.
113. DeVos, J. M., Gaber, A. O., Knight, R. J., Land, G. A., Suki, W. N., Gaber, L. W., and Patel, S. J. (2012). Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation. *Kidney Int* *82*, 598-604.
114. DeVos, J. M., Patel, S. J., Burns, K. M., Dilioglou, S., Gaber, L. W., Knight, R. J., Gaber, A. O., and Land, G. A. (2011). De novo donor specific antibodies and patient outcomes in renal transplantation. *Clin Transpl*, 351-358.
115. Dickenmann, M. J., Cathomas, G., Steiger, J., Mihatsch, M. J., Thiel, G., and Tamm, M. (2001). Cytomegalovirus infection and graft rejection in renal transplantation. *Transplantation* *71*, 764-767.
116. Dieli, F., Poccia, F., Lipp, M., Sireci, G., Caccamo, N., Di Sano, C., and Salerno, A. (2003). Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med* *198*, 391-397.
117. Do, J. S., and Min, B. (2009). IL-15 produced and trans-presented by DCs underlies homeostatic competition between CD8 and {gamma}{delta} T cells in vivo. *Blood* *113*, 6361-6371.

118. Docke, W. D., Prosch, S., Fietze, E., Kimel, V., Zuckermann, H., Klug, C., Syrbe, U., Kruger, D. H., von Baehr, R., and Volk, H. D. (1994). Cytomegalovirus reactivation and tumour necrosis factor. *Lancet* *343*, 268-269.
119. Drachenberg, C. B., and Papadimitriou, J. C. (2013). Endothelial Injury in Renal Antibody-Mediated Allograft Rejection: A Schematic View Based on Pathogenesis. *Transplantation*.
120. Drobyski, W. R., Vodanovic-Jankovic, S., and Klein, J. (2000). Adoptively transferred gamma delta T cells indirectly regulate murine graft-versus-host reactivity following donor leukocyte infusion therapy in mice. *J Immunol* *165*, 1634-1640.
121. Dudley, E. C., Girardi, M., Owen, M. J., and Hayday, A. C. (1995). Alpha beta and gamma delta T cells can share a late common precursor. *Curr Biol* *5*, 659-669.
122. Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolz, V., Zhu, H., and Liu, F. (2003). Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 14223-14228.
123. Dyugovskaya, L., Hirsh, M., and Ginsburg, H. (2003a). Phenotypic profile and functional characterization of rat lymph node-derived gammadelta T cells: implication in the immune response to cytomegalovirus. *Immunology* *108*, 129-136.
124. Dyugovskaya, L., Lavie, P., and Lavie, L. (2003b). Phenotypic and functional characterization of blood gammadelta T cells in sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* *168*, 242-249.
125. Dzabic, M., Rahbar, A., Yaiw, K. C., Naghibi, M., Religa, P., Fellstrom, B., Larsson, E., and Soderberg-Naucler, C. (2011). Intragraft cytomegalovirus protein expression is associated with reduced renal allograft survival. *Clin Infect Dis* *53*, 969-976.
126. Eberl, M., Roberts, G. W., Meuter, S., Williams, J. D., Topley, N., and Moser, B. (2009). A rapid crosstalk of human gammadelta T cells and monocytes drives the acute inflammation in bacterial infections. *PLoS Pathog* *5*, e1000308.
127. Ebert, L. M., Meuter, S., and Moser, B. (2006). Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance. *J Immunol* *176*, 4331-4336.
128. Egan, C. E., Dalton, J. E., Andrew, E. M., Smith, J. E., Gubbels, M. J., Striepen, B., and Carding, S. R. (2005). A requirement for the Vgamma1+ subset of peripheral gammadelta T cells in the control of the systemic growth of *Toxoplasma gondii* and infection-induced pathology. *J Immunol* *175*, 8191-8199.
129. Egli, A., Humar, A., and Kumar, D. (2012). State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin Infect Dis* *55*, 1678-1689.
130. Ehl, S., Schwarz, K., Enders, A., Duffner, U., Pannicke, U., Kuhr, J., Mascart, F., Schmitt-Graeff, A., Niemeyer, C., and Fisch, P. (2005). A variant of SCID with specific immune responses and predominance of gamma delta T cells. *J Clin Invest* *115*, 3140-3148.
131. Einecke, G., Reeve, J., Sis, B., Mengel, M., Hidalgo, L., Famulski, K. S., Matas, A., Kasiske, B., Kaplan, B., and Halloran, P. F. (2010). A molecular classifier for predicting future graft loss in late kidney transplant biopsies. *J Clin Invest* *120*, 1862-1872.
132. Einecke, G., Sis, B., Reeve, J., Mengel, M., Campbell, P. M., Hidalgo, L. G., Kaplan, B., and Halloran, P. F. (2009). Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* *9*, 2520-2531.
133. El-Zoghby, Z. M., Stegall, M. D., Lager, D. J., Kremers, W. K., Amer, H., Gloor, J. M., and Cosio, F. G. (2009). Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant* *9*, 527-535.
134. Elliott, J. F., Rock, E. P., Patten, P. A., Davis, M. M., and Chien, Y. H. (1988). The adult T-cell receptor delta-chain is diverse and distinct from that of fetal thymocytes. *Nature* *331*, 627-631.
135. Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Fraumeni, J. F., Jr., Kasiske, B. L., Israni, A. K., Snyder, J. J., Wolfe, R. A., Goodrich, N. P., Bayakly, A. R., Clarke, C. A., *et al.* (2013). Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *Jama* *306*, 1891-1901.
136. Evans, P. C., Soin, A., Wreghitt, T. G., Taylor, C. J., Wight, D. G., and Alexander, G. J. (2000). An association between cytomegalovirus infection and chronic rejection after liver transplantation. *Transplantation* *69*, 30-35.
137. Everly, M. J., Everly, J. J., Arend, L. J., Brailley, P., Susskind, B., Govil, A., Rike, A., Roy-Chaudhury, P., Mogilishetty, G., Alloway, R. R., *et al.* (2009). Reducing de novo donor-specific antibody levels during acute rejection diminishes renal allograft loss. *Am J Transplant* *9*, 1063-1071.
138. Everly, M. J., Rebellato, L. M., Haisch, C. E., Ozawa, M., Parker, K., Briley, K. P., Catrou, P. G., Bolin, P., Kendrick, W. T., Kendrick, S. A., *et al.* (2013). Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation* *95*, 410-417.
139. Everly, M. J., Rebellato, L. M., Ozawa, M., Briley, K. P., Catrou, P. G., Haisch, C. E., and Terasaki, P. I. (2010). Beyond histology: lowering human leukocyte antigen antibody to improve renal allograft survival in acute rejection. *Transplantation* *89*, 962-967.

140. Falini, B., Flenghi, L., Pileri, S., Pelicci, P., Fagioli, M., Martelli, M. F., Moretta, L., and Ciccone, E. (1989). Distribution of T cells bearing different forms of the T cell receptor gamma/delta in normal and pathological human tissues. *J Immunol* *143*, 2480-2488.
141. Fausther-Bovendo, H., Wauquier, N., Cherfils-Vicini, J., Cremer, I., Debre, P., and Vieillard, V. (2008). NKG2C is a major triggering receptor involved in the V[delta]1 T cell-mediated cytotoxicity against HIV-infected CD4 T cells. *Aids* *22*, 217-226.
142. Fenoglio, D., Poggi, A., Catellani, S., Battaglia, F., Ferrera, A., Setti, M., Murdaca, G., and Zocchi, M. R. (2009). Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to *Candida albicans*. *Blood* *113*, 6611-6618.
143. Ferrarini, M., Heltai, S., Pupa, S. M., Mernard, S., and Zocchi, R. (1996). Killing of laminin receptor-positive human lung cancers by tumor infiltrating lymphocytes bearing gammadelta(+) t-cell receptors. *J Natl Cancer Inst* *88*, 436-441.
144. Feucht, H. E., Schneeberger, H., Hillebrand, G., Burkhardt, K., Weiss, M., Riethmuller, G., Land, W., and Albert, E. (1993). Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* *43*, 1333-1338.
145. Feurle, J., Espinosa, E., Eckstein, S., Pont, F., Kunzmann, V., Fournie, J. J., Herderich, M., and Wilhelm, M. (2002). *Escherichia coli* produces phosphoantigens activating human gamma delta T cells. *J Biol Chem* *277*, 148-154.
146. Fildes, J. E., Walker, A. H., Williams, S. G., Yonan, N., and Leonard, C. T. (2008). CMV infection is associated with the depletion but lack of activation of peripheral blood natural killer cells in a lung transplant cohort. *Transpl Immunol* *19*, 235-237.
147. Fisch, P., Malkovsky, M., Kovats, S., Sturm, E., Braakman, E., Klein, B. S., Voss, S. D., Morrissey, L. W., DeMars, R., Welch, W. J., and et al. (1990). Recognition by human V gamma 9/V delta 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science* *250*, 1269-1273.
148. Fishman, J. A. (2007). Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* *357*, 2601-2614.
149. Fliss, P. M., Jowers, T. P., Brinkmann, M. M., Holstermann, B., Mack, C., Dickinson, P., Hohenberg, H., Ghazal, P., and Brune, W. (2012). Viral mediated redirection of NEMO/IKKgamma to autophagosomes curtails the inflammatory cascade. *PLoS Pathog* *8*, e1002517.
150. Fornara, C., Lilleri, D., Revello, M. G., Furione, M., Zavattoni, M., Lenta, E., and Gerna, G. (2011). Kinetics of effector functions and phenotype of virus-specific and gammadelta T lymphocytes in primary human cytomegalovirus infection during pregnancy. *J Clin Immunol* *31*, 1054-1064.
151. Fowler, K. B., Stagno, S., Pass, R. F., Britt, W. J., Boll, T. J., and Alford, C. A. (1992). The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* *326*, 663-667.
152. Freeman, R. B., Jr. (2009). The 'indirect' effects of cytomegalovirus infection. *Am J Transplant* *9*, 2453-2458.
153. Freitas, M. C., Rebellato, L. M., Ozawa, M., Nguyen, A., Sasaki, N., Everly, M., Briley, K. P., Haisch, C. E., Bolin, P., Parker, K., et al. (2013). The role of immunoglobulin-G subclasses and C1q in de novo HLA-DQ donor-specific antibody kidney transplantation outcomes. *Transplantation* *95*, 1113-1119.
154. French, J. D., Roark, C. L., Born, W. K., and O'Brien R, L. (2005). {gamma}{delta} T cell homeostasis is established in competition with {alpha}{beta} T cells and NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 14741-14746.
155. Freywald, A., Sharfe, N., Miller, C. D., Rashotte, C., and Roifman, C. M. (2006). EphA receptors inhibit anti-CD3-induced apoptosis in thymocytes. *J Immunol* *176*, 4066-4074.
156. Fu, Y. X., Cranfill, R., Vollmer, M., Van Der Zee, R., O'Brien, R. L., and Born, W. (1993). In vivo response of murine gamma delta T cells to a heat shock protein-derived peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 322-326.
157. Funch, D. P., Walker, A. M., Schneider, G., Ziyadeh, N. J., and Pescovitz, M. D. (2005). Ganciclovir and acyclovir reduce the risk of post-transplant lymphoproliferative disorder in renal transplant recipients. *Am J Transplant* *5*, 2894-2900.
158. Funk, S. D., Yurdagul, A., Jr., Albert, P., Traylor, J. G., Jr., Jin, L., Chen, J., and Orr, A. W. (2012). EphA2 activation promotes the endothelial cell inflammatory response: a potential role in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *32*, 686-695.
159. Gaber, A. O., Monaco, A. P., Russell, J. A., Lebranchu, Y., and Mohty, M. (2010). Rabbit antithymocyte globulin (thymoglobulin): 25 years and new frontiers in solid organ transplantation and haematology. *Drugs* *70*, 691-732.
160. Gale, N. W., Holland, S. J., Valenzuela, D. M., Flenniken, A., Pan, L., Ryan, T. E., Henkemeyer, M., Strebhardt, K., Hirai, H., Wilkinson, D. G., et al. (1996). Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* *17*, 9-19.
161. Galvani, S., Trayssac, M., Auge, N., Thiers, J. C., Calise, D., Krell, H. W., Sallusto, F., Kamar, N., Rostaing, L., Thomsen, M., et al. (2011). A Key Role for Matrix Metalloproteinases and Neutral Sphingomyelinase-2 in Transplant Vasculopathy Triggered by Anti-HLA Antibody. *Circulation* *124*, 2725-2734.

162. Gamadia, L. E., Remmerswaal, E. B., Weel, J. F., Bemelman, F., van Lier, R. A., and Ten Berge, I. J. (2003). Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood* *101*, 2686-2692.
163. Gao, Y., Yang, W., Pan, M., Scully, E., Girardi, M., Augenlicht, L. H., Craft, J., and Yin, Z. (2003). Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J Exp Med* *198*, 433-442.
164. Gaston, R. S., Cecka, J. M., Kasiske, B. L., Fieberg, A. M., Leduc, R., Cosio, F. C., Gourishankar, S., Grande, J., Halloran, P., Hunsicker, L., *et al.* (2010). Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation* *90*, 68-74.
165. Gatault, P., Jollet, I., Rabot, N., Boulanger, M. D., Taupin, J. L., Barbet, C., Baron, C., Thierry, A., Halimi, J. M., Lebranchu, Y., *et al.* (2012). Mothers without HLA antibodies before transplantation have a low risk of alloimmunization post-transplantation. *Tissue Antigens* *78*, 241-248.
166. Giacomelli, R., Matucci-Cerinic, M., Cipriani, P., Ghersetich, I., Lattanzio, R., Pavan, A., Pignone, A., Cagnoni, M. L., Lotti, T., and Tonietti, G. (1998). Circulating Vdelta1+ T cells are activated and accumulate in the skin of systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* *41*, 327-334.
167. Giacomelli, R., Parzanese, I., Frieri, G., Passacantando, A., Pizzuto, F., Pimpo, T., Cipriani, P., Viscido, A., Caprilli, R., and Tonietti, G. (1994). Increase of circulating gamma/delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients affected by active inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* *98*, 83-88.
168. Gibson, I. W., Gwinner, W., Brocker, V., Sis, B., Riopel, J., Roberts, I. S., Scheffner, I., Jhangri, G. S., and Mengel, M. (2008). Peritubular capillaritis in renal allografts: prevalence, scoring system, reproducibility and clinicopathological correlates. *Am J Transplant* *8*, 819-825.
169. Gill, J. S., Landsberg, D., Johnston, O., Shapiro, R. J., Magil, A. B., Wu, V., Tinckam, K., and Keown, P. (2010). Screening for de novo anti-human leukocyte antigen antibodies in nonsensitized kidney transplant recipients does not predict acute rejection. *Transplantation* *89*, 178-184.
170. Ginevri, F., Nocera, A., Comoli, P., Innocente, A., Cioni, M., Parodi, A., Fontana, I., Magnasco, A., Nocco, A., Tagliamacco, A., *et al.* (2012). Posttransplant de novo donor-specific hla antibodies identify pediatric kidney recipients at risk for late antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* *12*, 3355-3362.
171. Girardi, M., Oppenheim, D. E., Steele, C. R., Lewis, J. M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R. E., and Hayday, A. C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* *294*, 605-609.
172. Glatzel, A., Entschladen, F., Zollner, T. M., Kraiczky, P., Brade, V., Kaufmann, R., Janssen, O., Lengel-Janssen, B., Wesch, D., and Kabelitz, D. (2002). The responsiveness of human V delta 1 gamma delta T cells to *Borrelia burgdorferi* is largely restricted to synovial-fluid cells from patients with Lyme arthritis. *J Infect Dis* *186*, 1043-1046.
173. Gloor, J., and Stegall, M. D. (2010). Sensitized renal transplant recipients: current protocols and future directions. *Nat Rev Nephrol* *6*, 297-306.
174. Gloor, J. M., Sethi, S., Stegall, M. D., Park, W. D., Moore, S. B., DeGoey, S., Griffin, M. D., Larson, T. S., and Cosio, F. G. (2007). Transplant glomerulopathy: subclinical incidence and association with alloantibody. *Am J Transplant* *7*, 2124-2132.
175. Glotz, D., Antoine, C., Julia, P., Suberbielle-Boissel, C., Boudjeltia, S., Fraoui, R., Hacen, C., Duboust, A., and Bariety, J. (2002). Desensitization and subsequent kidney transplantation of patients using intravenous immunoglobulins (IVIg). *Am J Transplant* *2*, 758-760.
176. Gober, H. J., Kistowska, M., Angman, L., Jenö, P., Mori, L., and De Libero, G. (2003). Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* *197*, 163-168.
177. Godder, K. T., Henslee-Downey, P. J., Mehta, J., Park, B. S., Chiang, K. Y., Abhyankar, S., and Lamb, L. S. (2007). Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* *39*, 751-757.
178. Gorczynski, R. M., Cohen, Z., Levy, G., and Fu, X. M. (1996). A role for gamma(delta)TCR+ cells in regulation of rejection of small intestinal allografts in rats. *Transplantation* *62*, 844-851.
179. Grattan, M. T., Moreno-Cabral, C. E., Starnes, V. A., Oyer, P. E., Stinson, E. B., and Shumway, N. E. (1989). Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *Jama* *261*, 3561-3566.
180. Greiner, M., Cusini, A., Ruesch, M., Schiesser, M., Ledergerber, B., Fehr, T., and Mueller, N. J. (2012). A stringent preemptive protocol reduces cytomegalovirus disease in the first 6 months after kidney transplantation. *Infection* *40*, 669-675.
181. Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K. H., and Spies, T. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 6879-6884.
182. Groh, V., Steinle, A., Bauer, S., and Spies, T. (1998). Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* *279*, 1737-1740.

183. Groves, J. T., and Kuriyan, J. (2010). Molecular mechanisms in signal transduction at the membrane. *Nat Struct Mol Biol* *17*, 659-665.
184. Guidicelli, G., Anies, G., Bachelet, T., Dubois, V., Moreau, J. F., Merville, P., Couzi, L., and Taupin, J. L. (2013). The complement interference phenomenon as a cause for sharp fluctuations of serum anti-HLA antibody strength in kidney transplant patients. *Transpl Immunol*.
185. Guma, M., Angulo, A., Vilches, C., Gomez-Lozano, N., Malats, N., and Lopez-Botet, M. (2004). Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* *104*, 3664-3671.
186. Guma, M., Budt, M., Saez, A., Brckalo, T., Hengel, H., Angulo, A., and Lopez-Botet, M. (2006). Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* *107*, 3624-3631.
187. Haas, J. D., Ravens, S., Duber, S., Sandrock, I., Oberdorfer, L., Kashani, E., Chennupati, V., Fohse, L., Naumann, R., Weiss, S., *et al.* (2012). Development of interleukin-17-producing gammadelta T cells is restricted to a functional embryonic wave. *Immunity* *37*, 48-59.
188. Hadaya, K., de Rham, C., Bandelier, C., Bandelier, C., Ferrari-Lacraz, S., Jendly, S., Berney, T., Buhler, L., Kaiser, L., Seebach, J. D., *et al.* (2008). Natural killer cell receptor repertoire and their ligands, and the risk of CMV infection after kidney transplantation. *Am J Transplant* *8*, 2674-2683.
189. Hahn, A. S., Kaufmann, J. K., Wies, E., Naschberger, E., Pantelev-Ivlev, J., Schmidt, K., Holzer, A., Schmidt, M., Chen, J., Konig, S., *et al.* (2012). The ephrin receptor tyrosine kinase A2 is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Med* *18*, 961-966.
190. Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houles, C., Fieschi, F., Arenzana-Seisdedos, F., Moreau, J. F., and Dechanet-Merville, J. (2002). Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* *17*, 653-664.
191. Halary, F., Pitard, V., Dlubek, D., Krzysiek, R., de la Salle, H., Merville, P., Dromer, C., Emilie, D., Moreau, J. F., and Dechanet-Merville, J. (2005). Shared reactivity of V $\delta$ 2(neg)  $\gamma$  $\delta$  T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med* *201*, 1567-1578.
192. Halloran, P. F. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* *351*, 2715-2729.
193. Hannani, D., Ma, Y., Yamazaki, T., Dechanet-Merville, J., Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2012). Harnessing gammadelta T cells in anticancer immunotherapy. *Trends Immunol* *33*, 199-206.
194. Harly, C., Bachelet, T., Willcox, C., Pitard, V., Netzer, S., Marlin, R., Moreau, J. F., Willcox, B., and Dechanet-Merville, J. (2012). CMV and tumor stress surveillance by human V $\delta$ 1 gd TCR binding to ephrin receptor A2 (EphA2). *Immunology* *137*, 105-105.
195. Harly, C., Peyrat, M. A., Netzer, S., Dechanet-Merville, J., Bonneville, M., and Scotet, E. (2011). Up-regulation of cytolytic functions of human V $\delta$ 2-gamma T lymphocytes through engagement of ILT2 expressed by tumor target cells. *Blood* *117*, 2864-2873.
196. Havran, W. L., and Allison, J. P. (1988). Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. *Nature* *335*, 443-445.
197. Hayday, A. C. (2009). Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity* *31*, 184-196.
198. Hayden, R. T., Yan, X., Wick, M. T., Rodriguez, A. B., Xiong, X., Ginocchio, C. C., Mitchell, M. J., and Caliendo, A. M. (2012). Factors contributing to variability of quantitative viral PCR results in proficiency testing samples: a multivariate analysis. *J Clin Microbiol* *50*, 337-345.
199. Helanterä, I., Koskinen, P., Finne, P., Loginov, R., Kyllönen, L., Salmela, K., Gronhagen-Riska, C., and Lautenschlager, I. (2006). Persistent cytomegalovirus infection in kidney allografts is associated with inferior graft function and survival. *Transpl Int* *19*, 893-900.
200. Helanterä, I., Koskinen, P., Tornroth, T., Loginov, R., Gronhagen-Riska, C., and Lautenschlager, I. (2003). The impact of cytomegalovirus infections and acute rejection episodes on the development of vascular changes in 6-month protocol biopsy specimens of cadaveric kidney allograft recipients. *Transplantation* *75*, 1858-1864.
201. Helanterä, I., Kyllönen, L., Lautenschlager, I., Salmela, K., and Koskinen, P. (2010). Primary CMV infections are common in kidney transplant recipients after 6 months valganciclovir prophylaxis. *Am J Transplant* *10*, 2026-2032.
202. Helanterä, I., Loginov, R., Koskinen, P., Tornroth, T., Gronhagen-Riska, C., and Lautenschlager, I. (2005). Persistent cytomegalovirus infection is associated with increased expression of TGF- $\beta$ 1, PDGF-AA and ICAM-1 and arterial intimal thickening in kidney allografts. *Nephrol Dial Transplant* *20*, 790-796.
203. Hidalgo, L. G., Campbell, P. M., Sis, B., Einecke, G., Mengel, M., Chang, J., Sellares, J., Reeve, J., and Halloran, P. F. (2009). De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am J Transplant* *9*, 2532-2541.
204. Hidalgo, L. G., Sellares, J., Sis, B., Mengel, M., Chang, J., and Halloran, P. F. (2012). Interpreting NK cell transcripts versus T cell transcripts in renal transplant biopsies. *Am J Transplant* *12*, 1180-1191.
205. Hidalgo, L. G., Sis, B., Sellares, J., Campbell, P. M., Mengel, M., Einecke, G., Chang, J., and Halloran, P. F. (2010). NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* *10*, 1812-1822.

206. Hill, G. S., Nochy, D., Bruneval, P., Duong van Huyen, J. P., Glotz, D., Suberbielle, C., Zuber, J., Anglicheau, D., Empana, J. P., Legendre, C., and Loupy, A. (2011). Donor-specific antibodies accelerate arteriosclerosis after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 22, 975-983.
207. Himanen, J. P., Goldgur, Y., Miao, H., Myshkin, E., Guo, H., Buck, M., Nguyen, M., Rajashankar, K. R., Wang, B., and Nikolov, D. B. (2009). Ligand recognition by A-class Eph receptors: crystal structures of the EphA2 ligand-binding domain and the EphA2/ephrin-A1 complex. *EMBO Rep* 10, 722-728.
208. Himanen, J. P., Henkemeyer, M., and Nikolov, D. B. (1998). Crystal structure of the ligand-binding domain of the receptor tyrosine kinase EphB2. *Nature* 396, 486-491.
209. Himanen, J. P., Rajashankar, K. R., Lackmann, M., Cowan, C. A., Henkemeyer, M., and Nikolov, D. B. (2001). Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature* 414, 933-938.
210. Himanen, J. P., Yermekbayeva, L., Janes, P. W., Walker, J. R., Xu, K., Atapattu, L., Rajashankar, K. R., Mensinga, A., Lackmann, M., Nikolov, D. B., and Dhe-Paganon, S. (2010). Architecture of Eph receptor clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10860-10865.
211. Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J., and Takaku, F. (1987). A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* 238, 1717-1720.
212. Hirohashi, T., Uehara, S., Chase, C. M., DellaPelle, P., Madsen, J. C., Russell, P. S., and Colvin, R. B. (2010). Complement independent antibody-mediated endarteritis and transplant arteriopathy in mice. *Am J Transplant* 10, 510-517.
213. Hirsch, H. H., Lautenschlager, I., Pinsky, B. A., Cardenoso, L., Aslam, S., Cobb, B., Vilchez, R. A., and Valsamakis, A. (2013). An international multicenter performance analysis of cytomegalovirus load tests. *Clin Infect Dis* 56, 367-373.
214. Hjelmesaeth, J., Sagedal, S., Hartmann, A., Rollag, H., Egeland, T., Hagen, M., Nordal, K. P., and Jenssen, T. (2004). Asymptomatic cytomegalovirus infection is associated with increased risk of new-onset diabetes mellitus and impaired insulin release after renal transplantation. *Diabetologia* 47, 1550-1556.
215. Hjorthaug, H. S., and Aasheim, H. C. (2007). Ephrin-A1 stimulates migration of CD8+CCR7+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 37, 2326-2336.
216. Hochegger, K., Schatz, T., Eller, P., Tagwerker, A., Heining, D., Mayer, G., and Rosenkranz, A. R. (2007). Role of alpha/beta and gamma/delta T cells in renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F741-747.
217. Hodson, E. M., Craig, J. C., Strippoli, G. F., and Webster, A. C. (2008). Antiviral medications for preventing cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003774.
218. Hoffmann, T. W., Halimi, J. M., Buchler, M., Velge-Roussel, F., Goudeau, A., Al-Najjar, A., Marliere, J. F., Lebranchu, Y., and Baron, C. (2010). Association between a polymorphism in the human programmed death-1 (PD-1) gene and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *J Med Genet* 47, 54-58.
219. Hoffmann, T. W., Halimi, J. M., Buchler, M., Velge-Roussel, F., Goudeau, A., Al Najjar, A., Boulanger, M. D., Houssaini, T. S., Marliere, J. F., Lebranchu, Y., and Baron, C. (2008). Association between a polymorphism in the IL-12p40 gene and cytomegalovirus reactivation after kidney transplantation. *Transplantation* 85, 1406-1411.
220. Hohlfeld, R., Engel, A. G., Ii, K., and Harper, M. C. (1991). Polymyositis mediated by T lymphocytes that express the gamma/delta receptor. *N Engl J Med* 324, 877-881.
221. Holen, H. L., Nustad, K., and Aasheim, H. C. (2010). Activation of EphA receptors on CD4+CD45RO+ memory cells stimulates migration. *J Leukoc Biol* 87, 1059-1068.
222. Holen, H. L., Shadidi, M., Narvhus, K., Kjosnes, O., Tierens, A., and Aasheim, H. C. (2008). Signaling through ephrin-A ligand leads to activation of Src-family kinases, Akt phosphorylation, and inhibition of antigen receptor-induced apoptosis. *J Leukoc Biol* 84, 1183-1191.
223. Holl, E. K., Roney, K. E., Allen, I. C., Steinbach, E., Arthur, J. C., Buntzman, A., Plevy, S., Frelinger, J., and Ting, J. P. (2012). Plexin-B2 and Plexin-D1 in dendritic cells: expression and IL-12/IL-23p40 production. *PLoS One* 7, e43333.
224. Holland, S. J., Bartok, I., Attaf, M., Genolet, R., Luescher, I. F., Kotsiou, E., Richard, A., Wang, E., White, M., Coe, D. J., et al. (2013). The T-cell receptor is not hardwired to engage MHC ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E3111-3118.
225. Holland, S. J., Gale, N. W., Mbamalu, G., Yancopoulos, G. D., Henkemeyer, M., and Pawson, T. (1996). Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* 383, 722-725.
226. Holoshitz, J., Koning, F., Coligan, J. E., De Bruyn, J., and Strober, S. (1989). Isolation of CD4- CD8- mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid. *Nature* 339, 226-229.
227. Holtmeier, W., Hennemann, A., May, E., Duchmann, R., and Caspary, W. F. (2002). T cell receptor delta repertoire in inflamed and noninflamed colon of patients with IBD analyzed by CDR3 spectratyping. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282, G1024-1034.

228. Holtmeier, W., Pfander, M., Hennemann, A., Zollner, T. M., Kaufmann, R., and Caspary, W. F. (2001). The TCR-delta repertoire in normal human skin is restricted and distinct from the TCR-delta repertoire in the peripheral blood. *J Invest Dermatol* *116*, 275-280.
229. Homs, S., Mansour, H., Desvaux, D., Diet, C., Hazan, M., Buchler, M., Lebranchu, Y., Buob, D., Badoual, C., Matignon, M., *et al.* (2009). Predominant Th1 and cytotoxic phenotype in biopsies from renal transplant recipients with transplant glomerulopathy. *Am J Transplant* *9*, 1230-1236.
230. Honger, G., Hopfer, H., Arnold, M. L., Spriewald, B. M., Schaub, S., and Amico, P. (2011). Pretransplant IgG subclasses of donor-specific human leukocyte antigen antibodies and development of antibody-mediated rejection. *Transplantation* *92*, 41-47.
231. Hourmant, M., Cesbron-Gautier, A., Terasaki, P. I., Mizutani, K., Moreau, A., Meurette, A., Dantal, J., Giral, M., Blanco, G., Cantarovich, D., *et al.* (2005). Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* *16*, 2804-2812.
232. Hudspeth, K., Fogli, M., Correia, D. V., Mikulak, J., Roberto, A., Della Bella, S., Silva-Santos, B., and Mavilio, D. (2012). Engagement of NKp30 on Vdelta1 T cells induces the production of CCL3, CCL4, and CCL5 and suppresses HIV-1 replication. *Blood* *119*, 4013-4016.
233. Humar, A., Gillingham, K. J., Payne, W. D., Dunn, D. L., Sutherland, D. E., and Matas, A. J. (1999). Association between cytomegalovirus disease and chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* *68*, 1879-1883.
234. Humar, A., Lebranchu, Y., Vincenti, F., Blumberg, E. A., Punch, J. D., Limaye, A. P., Abramowicz, D., Jardine, A. G., Voulgari, A. T., Ives, J., *et al.* (2010). The efficacy and safety of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. *Am J Transplant* *10*, 1228-1237.
235. Humar, A., Mazzulli, T., Moussa, G., Razonable, R. R., Paya, C. V., Pescovitz, M. D., Covington, E., and Alecock, E. (2005). Clinical utility of cytomegalovirus (CMV) serology testing in high-risk CMV D+/R- transplant recipients. *Am J Transplant* *5*, 1065-1070.
236. Hurst, F. P., Belur, P., Nee, R., Agodoa, L. Y., Patel, P., Abbott, K. C., and Jindal, R. M. (2011). Poor outcomes associated with neutropenia after kidney transplantation: analysis of United States renal data system. *Transplantation* *92*, 36-40.
237. Inoue, S., Niihara, M., Takeo, S., Mineo, S., Kawakami, Y., Uchida, A., Kamiya, S., and Kobayashi, F. (2012). Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing gammadelta T cells is responsible for protective immunity to Plasmodium parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 12129-12134.
238. Isler, J. A., Skalet, A. H., and Alwine, J. C. (2005). Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *J Virol* *79*, 6890-6899.
239. Ismail, A. S., Severson, K. M., Vaishnava, S., Behrendt, C. L., Yu, X., Benjamin, J. L., Ruhn, K. A., Hou, B., DeFranco, A. L., Yarovinsky, F., and Hooper, L. V. (2011). Gammadelta intraepithelial lymphocytes are essential mediators of host-microbial homeostasis at the intestinal mucosal surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 8743-8748.
240. Issa, N., Cosio, F. G., Gloor, J. M., Sethi, S., Dean, P. G., Moore, S. B., DeGoey, S., and Stegall, M. D. (2008). Transplant glomerulopathy: risk and prognosis related to anti-human leukocyte antigen class II antibody levels. *Transplantation* *86*, 681-685.
241. Itoharu, S., Farr, A. G., Lafaille, J. J., Bonneville, M., Takagaki, Y., Haas, W., and Tonegawa, S. (1990). Homing of a gamma delta thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. *Nature* *343*, 754-757.
242. Jameson, J. M., Cruz, J., Costanzo, A., Terajima, M., and Ennis, F. A. (2010). A role for the mevalonate pathway in the induction of subtype cross-reactive immunity to influenza A virus by human gammadelta T lymphocytes. *Cell Immunol* *264*, 71-77.
243. Janes, P. W., Griesshaber, B., Atapattu, L., Nievergall, E., Hii, L. L., Mensinga, A., Chheang, C., Day, B. W., Boyd, A. W., Bastiaens, P. I., *et al.* (2011). Eph receptor function is modulated by heterooligomerization of A and B type Eph receptors. *J Cell Biol* *195*, 1033-1045.
244. Janes, P. W., Nievergall, E., and Lackmann, M. (2012). Concepts and consequences of Eph receptor clustering. *Semin Cell Dev Biol* *23*, 43-50.
245. Janes, P. W., Saha, N., Barton, W. A., Kolev, M. V., Wimmer-Kleikamp, S. H., Nievergall, E., Blobel, C. P., Himanen, J. P., Lackmann, M., and Nikolov, D. B. (2005). Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* *123*, 291-304.
246. Jeannet, M., Pinn, V. W., Flax, M. H., Winn, H. J., and Russell, P. S. (1970). Humoral antibodies in renal allotransplantation in man. *N Engl J Med* *282*, 111-117.
247. Jensen, K. D., Su, X., Shin, S., Li, L., Youssef, S., Yamasaki, S., Steinman, L., Saito, T., Locksley, R. M., Davis, M. M., *et al.* (2008). Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. *Immunity* *29*, 90-100.

248. Jindra, P. T., Jin, Y. P., Jacamo, R., Rozengurt, E., and Reed, E. F. (2008). MHC class I and integrin ligation induce ERK activation via an mTORC2-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 369, 781-787.
249. Johnson, R. M., Lancki, D. W., Sperling, A. I., Dick, R. F., Spear, P. G., Fitch, F. W., and Bluestone, J. A. (1992). A murine CD4-, CD8- T cell receptor-gamma delta T lymphocyte clone specific for herpes simplex virus glycoprotein I. *J Immunol* 148, 983-988.
250. Jonjic, S., Pavic, I., Lucin, P., Rukavina, D., and Koszinowski, U. H. (1990). Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *J Virol* 64, 5457-5464.
251. Jorgensen, C., Sherman, A., Chen, G. I., Pasculescu, A., Poliakov, A., Hsiung, M., Larsen, B., Wilkinson, D. G., Linding, R., and Pawson, T. (2009). Cell-specific information processing in segregating populations of Eph receptor ephrin-expressing cells. *Science* 326, 1502-1509.
252. Jun, G., Guo, H., Klein, B. E., Klein, R., Wang, J. J., Mitchell, P., Miao, H., Lee, K. E., Joshi, T., Buck, M., *et al.* (2009). EPHA2 is associated with age-related cortical cataract in mice and humans. *PLoS Genet* 5, e1000584.
253. Jutte, N. H., Vandekerckhove, B. A., Vaessen, L. M., Ouwehand, A. J., Baan, C. C., Bos, E., Claas, F. H., and Weimar, W. (1990). gamma delta T-cell receptor-positive T-cell clones derived from human heart transplants do not show donor-specific cytotoxicity. *Hum Immunol* 28, 170-174.
254. Kabelitz, D., Marischen, L., Oberg, H. H., Holtmeier, W., and Wesch, D. (2005). Epithelial defence by gamma delta T cells. *Int Arch Allergy Immunol* 137, 73-81.
255. Kabelitz, D., Wesch, D., and He, W. (2007). Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology. *Cancer Res* 67, 5-8.
256. Kalil, A. C., Freifeld, A. G., Lyden, E. R., and Stoner, J. A. (2009). Valganciclovir for cytomegalovirus prevention in solid organ transplant patients: an evidence-based reassessment of safety and efficacy. *PLoS One* 4, e5512.
257. Kalyan, S., and Kabelitz, D. (2013). Defining the nature of human gammadelta T cells: a biographical sketch of the highly empathetic. *Cell Mol Immunol* 10, 21-29.
258. Kamar, N., Del Bello, A., Congy-Jolivet, N., Guilbeau-Frugier, C., Cardeau-Desangles, I., Fort, M., Esposito, L., Guitard, J., Game, X., and Rostaing, L. (2013). Incidence of donor-specific antibodies in kidney transplant patients following conversion to an everolimus-based calcineurin inhibitor-free regimen. *Clin Transplant* 27, 455-462.
259. Kamar, N., Milioto, O., Puissant-Lubrano, B., Esposito, L., Pierre, M. C., Mohamed, A. O., Lavayssiere, L., Cointault, O., Ribes, D., Cardeau, I., *et al.* (2010). Incidence and predictive factors for infectious disease after rituximab therapy in kidney-transplant patients. *Am J Transplant* 10, 89-98.
260. Kamath, A. B., Wang, L., Das, H., Li, L., Reinhold, V. N., and Bukowski, J. F. (2003). Antigens in tea-beverage prime human Vgamma 2Vdelta 2 T cells in vitro and in vivo for memory and nonmemory antibacterial cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6009-6014.
261. Kaminski, H., Couzi, L., Helou, S., Guarigue, I., Bachelet, T., Dechanet-Merville, J., and Merville, P. (2012). T Lymphocytes Subpopulation into Cmv Infection with Antiviral Drug Resistance. *Transplant International* 25, 36-36.
262. Kanter Berga, J., Pallardo Mateu, L. M., Beltran Catalan, S., Puig Alcaraz, N., Sancho Calabuig, A., Gavela Martinez, E., Avila Bernabeu, A., and Crespo Albiach, J. (2011). Donor-specific HLA antibodies: risk factors and outcomes after kidney transplantation. *Transplant Proc* 43, 2154-2156.
263. Kasper, L. H., Matsuura, T., Fonseka, S., Arruda, J., Channon, J. Y., and Khan, I. A. (1996). Induction of gammadelta T cells during acute murine infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 157, 5521-5527.
264. Katerinis, I., Hadaya, K., Duquesnoy, R., Ferrari-Lacraz, S., Meier, S., van Delden, C., Martin, P. Y., Siegrist, C. A., and Villard, J. (2011). De novo anti-HLA antibody after pandemic H1N1 and seasonal influenza immunization in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 11, 1727-1733.
265. Kawano, H., Katayama, Y., Minagawa, K., Shimoyama, M., Henkemeyer, M., and Matsui, T. (2012). A novel feedback mechanism by Ephrin-B1/B2 in T-cell activation involves a concentration-dependent switch from costimulation to inhibition. *Eur J Immunol* 42, 1562-1572.
266. Kazen, A. R., and Adams, E. J. (2011). Evolution of the V, D, and J gene segments used in the primate gammadelta T-cell receptor reveals a dichotomy of conservation and diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E332-340.
267. Keenan, R. J., Lega, M. E., Dummer, J. S., Paradis, I. L., Dauber, J. H., Rabinowich, H., Yousem, S. A., Hardesty, R. L., Griffith, B. P., Duquesnoy, R. J., and *et al.* (1991). Cytomegalovirus serologic status and postoperative infection correlated with risk of developing chronic rejection after pulmonary transplantation. *Transplantation* 51, 433-438.
268. Keller, R., Peitchel, R., Goldman, J. N., and Goldman, M. (1976). An IgG-Fc receptor induced in cytomegalovirus-infected human fibroblasts. *J Immunol* 116, 772-777.
269. Kelsen, J., Dige, A., Schwindt, H., D'Amore, F., Pedersen, F. S., Agnholt, J., Christensen, L. A., Dahlerup, J. F., and Hvas, C. L. (2011). Infliximab induces clonal expansion of gammadelta-T cells in Crohn's disease: a predictor of lymphoma risk? *PLoS One* 6, e17890.

270. Khounloatham, M., Subbian, S., Smith, R., 3rd, Cirillo, S. L., and Cirillo, J. D. (2009). Mycobacterium tuberculosis interferes with the response to infection by inducing the host EphA2 receptor. *J Infect Dis* *199*, 1797-1806.
271. Khoury, J. A., Storch, G. A., Bohl, D. L., Schuessler, R. M., Torrence, S. M., Lockwood, M., Gaudreault-Keener, M., Koch, M. J., Miller, B. W., Hardinger, K. L., *et al.* (2006). Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *Am J Transplant* *6*, 2134-2143.
272. Kim, S., Lee, S., Shin, J., Kim, Y., Evnouchidou, I., Kim, D., Kim, Y. K., Kim, Y. E., Ahn, J. H., Riddell, S. R., *et al.* (2011). Human cytomegalovirus microRNA miR-US4-1 inhibits CD8(+) T cell responses by targeting the aminopeptidase ERAP1. *Nat Immunol* *12*, 984-991.
273. Kim, Y., Lee, S., Kim, S., Kim, D., Ahn, J. H., and Ahn, K. (2012). Human cytomegalovirus clinical strain-specific microRNA miR-UL148D targets the human chemokine RANTES during infection. *PLoS Pathog* *8*, e1002577.
274. Kirk, A. D., Morrell, C. N., and Baldwin, W. M., 3rd (2009). Platelets influence vascularized organ transplants from start to finish. *Am J Transplant* *9*, 14-22.
275. Kisielow, J., Tortola, L., Weber, J., Karjalainen, K., and Kopf, M. (2011). Evidence for the divergence of innate and adaptive T-cell precursors before commitment to the alphabeta and gammadelta lineages. *Blood* *118*, 6591-6600.
276. Kissmeyer-Nielsen, F., Olsen, S., Petersen, V. P., and Fjeldborg, O. (1966). Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* *2*, 662-665.
277. Klein, R. (2012). Eph/ephrin signalling during development. *Development* *139*, 4105-4109.
278. Kliem, V., Fricke, L., Wollbrink, T., Burg, M., Radermacher, J., and Rohde, F. (2008). Improvement in long-term renal graft survival due to CMV prophylaxis with oral ganciclovir: results of a randomized clinical trial. *Am J Transplant* *8*, 975-983.
279. Klimpel, G. R., Matthias, M. A., and Vinetz, J. M. (2003). Leptospira interrogans activation of human peripheral blood mononuclear cells: preferential expansion of TCR gamma delta+ T cells vs TCR alpha beta+ T cells. *J Immunol* *171*, 1447-1455.
280. Knight, A., Madrigal, A. J., Grace, S., Sivakumaran, J., Kottaridis, P., Mackinnon, S., Travers, P. J., and Lowdell, M. W. (2010). The role of Vdelta2-negative gammadelta T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Blood* *116*, 2164-2172.
281. Koch, S., Larbi, A., Ozcelik, D., Solana, R., Gouttefangeas, C., Attig, S., Wikby, A., Strindhall, J., Franceschi, C., and Pawelec, G. (2007). Cytomegalovirus infection: a driving force in human T cell immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* *1114*, 23-35.
282. Koh, K. P., Wang, Y., Yi, T., Shiao, S. L., Lorber, M. I., Sessa, W. C., Tellides, G., and Pober, J. S. (2004). T cell-mediated vascular dysfunction of human allografts results from IFN-gamma dysregulation of NO synthase. *J Clin Invest* *114*, 846-856.
283. Komori, H. K., Witherden, D. A., Kelly, R., Sendaydiego, K., Jameson, J. M., Teyton, L., and Havran, W. L. (2012). Cutting edge: dendritic epidermal gammadelta T cell ligands are rapidly and locally expressed by keratinocytes following cutaneous wounding. *J Immunol* *188*, 2972-2976.
284. Kong, Y., Cao, W., Xi, X., Ma, C., Cui, L., and He, W. (2009). The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRgamma9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRgammadelta and NKG2D. *Blood* *114*, 310-317.
285. Konstantinova, I., Nikolova, G., Ohara-Imaizumi, M., Meda, P., Kucera, T., Zarbalis, K., Wurst, W., Nagamatsu, S., and Lammert, E. (2007). EphA-Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. *Cell* *129*, 359-370.
286. Korff, T., Braun, J., Pfaff, D., Augustin, H. G., and Hecker, M. (2008). Role of ephrinB2 expression in endothelial cells during arteriogenesis: impact on smooth muscle cell migration and monocyte recruitment. *Blood* *112*, 73-81.
287. Koskinen, P. K., Kallio, E. A., Tikkanen, J. M., Sihvola, R. K., Hayry, P. J., and Lemstrom, K. B. (1999). Cytomegalovirus infection and cardiac allograft vasculopathy. *Transpl Infect Dis* *1*, 115-126.
288. Kotton, C. N., Kumar, D., Caliendo, A. M., Asberg, A., Chou, S., Danziger-Isakov, L., and Humar, A. (2013). Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-Organ Transplantation. *Transplantation*.
289. Kotton, C. N., Kumar, D., Caliendo, A. M., Asberg, A., Chou, S., Snyderman, D. R., Allen, U., and Humar, A. (2010). International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* *89*, 779-795.
290. Kozbor, D., Trinchieri, G., Monos, D. S., Isobe, M., Russo, G., Haney, J. A., Zmijewski, C., and Croce, C. M. (1989). Human TCR-gamma+/delta+, CD8+ T lymphocytes recognize tetanus toxoid in an MHC-restricted fashion. *J Exp Med* *169*, 1847-1851.

291. Krangel, M. S., Yssel, H., Brocklehurst, C., and Spits, H. (1990). A distinct wave of human T cell receptor gamma/delta lymphocytes in the early fetal thymus: evidence for controlled gene rearrangement and cytokine production. *J Exp Med* *172*, 847-859.
292. Kreis, H., Noel, L. H., and Legendre, C. (2013). The First Transplant Kidney Biopsy Ever Performed. *Am J Transplant*.
293. Kuijpers, T. W., Vossen, M. T., Gent, M. R., Davin, J. C., Roos, M. T., Wertheim-van Dillen, P. M., Weel, J. F., Baars, P. A., and van Lier, R. A. (2003). Frequencies of circulating cytolytic, CD45RA+CD27-, CD8+ T lymphocytes depend on infection with CMV. *J Immunol* *170*, 4342-4348.
294. Kunzmann, V., Bauer, E., and Wilhelm, M. (1999). Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N Engl J Med* *340*, 737-738.
295. Lachmann, N., Terasaki, P. I., Budde, K., Liefeldt, L., Kahl, A., Reinke, P., Pratschke, J., Rudolph, B., Schmidt, D., Salama, A., and Schonemann, C. (2009). Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminescence posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation* *87*, 1505-1513.
296. Lafarge, X., Merville, P., Cazin, M. C., Berge, F., Potaux, L., Moreau, J. F., and Dechanet-Merville, J. (2001). Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* *184*, 533-541.
297. Lahn, M., Kanehiro, A., Takeda, K., Joetham, A., Schwarze, J., Kohler, G., O'Brien, R., Gelfand, E. W., and Born, W. (1999). Negative regulation of airway responsiveness that is dependent on gammadelta T cells and independent of alphabeta T cells. *Nat Med* *5*, 1150-1156.
298. Lator, S. J., Dungan, L. S., Sutton, C. E., Basdeo, S. A., Fletcher, J. M., and Mills, K. H. (2011). Caspase-1-processed cytokines IL-1beta and IL-18 promote IL-17 production by gammadelta and CD4 T cells that mediate autoimmunity. *J Immunol* *186*, 5738-5748.
299. Lamb, K. E., Lodhi, S., and Meier-Kriesche, H. U. (2011). Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant* *11*, 450-462.
300. Lamb, L. S., Jr., Musk, P., Ye, Z., van Rhee, F., Geier, S. S., Tong, J. J., King, K. M., and Henslee-Downey, P. J. (2001). Human gammadelta(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response. *Bone Marrow Transplant* *27*, 601-606.
301. Lang, P., Griesinger, A., Hamprecht, K., Feuchtinger, T., Schumm, M., Neuhauser, F., Greil, J., Martin, D., Handgretinger, R., and Niethammer, D. (2004). Antiviral activity against CMV-infected fibroblasts in pediatric patients transplanted with CD34(+)-selected allografts from alternative donors. *Hum Immunol* *65*, 423-431.
302. Langhorne, J. (1996). gammadelta T cells in malaria infections. *Parasitol Today* *12*, 200-203.
303. Larrieu-Lahargue, F., Thomas, K. R., and Li, D. Y. (2012). Netrin ligands and receptors: lessons from neurons to the endothelium. *Trends Cardiovasc Med* *22*, 44-47.
304. Le Texier, L., Thebault, P., Lavault, A., Usal, C., Merieau, E., Quillard, T., Charreau, B., Soullillou, J. P., Cuturi, M. C., Brouard, S., and Chiffolleau, E. (2011). Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am J Transplant* *11*, 429-438.
305. Lee, C. Y., Lotfi-Emran, S., Erdinc, M., Murata, K., Velidedeoglu, E., Fox-Talbot, K., Liu, J., Garyu, J., Baldwin, W. M., 3rd, and Wasowska, B. A. (2007). The involvement of FcR mechanisms in antibody-mediated rejection. *Transplantation* *84*, 1324-1334.
306. Lee, P. C., Terasaki, P. I., Takemoto, S. K., Lee, P. H., Hung, C. J., Chen, Y. L., Tsai, A., and Lei, H. Y. (2002). All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* *74*, 1192-1194.
307. Lee, S., Song, J., Kim, S., Kim, J., Hong, Y., Kim, Y., Kim, D., Baek, D., and Ahn, K. (2013). Selective degradation of host MicroRNAs by an intergenic HCMV noncoding RNA accelerates virus production. *Cell Host Microbe* *13*, 678-690.
308. Lefaucheur, C., Loupy, A., Vernerey, D., Duong-Van-Huyen, J. P., Suberbielle, C., Anglicheau, D., Verine, J., Beuscart, T., Nochy, D., Bruneval, P., *et al.* (2013a). Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. *Lancet* *381*, 313-319.
309. Lefaucheur, C., Loupy, A., Vernerey, D., Suberbielle, C., Jouven, X., Legendre, C., Glotz, D., and Zeevi, A. (2013b). Post-Transplant Complement Binding DSA: Higher Risk of Kidney Allograft Loss. *American Journal of Transplantation* *13*, 193-193.
310. Lefaucheur, C., Nochy, D., Andrade, J., Verine, J., Gautreau, C., Charron, D., Hill, G. S., Glotz, D., and Suberbielle-Boissel, C. (2009). Comparison of combination Plasmapheresis/IVIg/anti-CD20 versus high-dose IVIg in the treatment of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* *9*, 1099-1107.
311. Lefaucheur, C., Nochy, D., Hill, G. S., Suberbielle-Boissel, C., Antoine, C., Charron, D., and Glotz, D. (2007). Determinants of poor graft outcome in patients with antibody-mediated acute rejection. *Am J Transplant* *7*, 832-841.

312. Lefaucheur, C., Suberbielle-Boissel, C., Hill, G. S., Nochy, D., Andrade, J., Antoine, C., Gautreau, C., Charron, D., and Glotz, D. (2008). Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Am J Transplant* 8, 324-331.
313. Lefranc, M. P. (1990). Organization of the human T-cell receptor genes. *Eur Cytokine Netw* 1, 121-130.
314. Legg, J. A., Herbert, J. M., Clissold, P., and Bicknell, R. (2008). Slits and Roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration. *Angiogenesis* 11, 13-21.
315. Lemmermann, N. A., Fink, A., Podlech, J., Ebert, S., Wilhelmi, V., Bohm, V., Holtappels, R., and Reddehase, M. J. (2012). Murine cytomegalovirus immune evasion proteins operative in the MHC class I pathway of antigen processing and presentation: state of knowledge, revisions, and questions. *Med Microbiol Immunol* 201, 497-512.
316. Leone, J. P., Bowers, V., Baliga, R., Sanders, C., LeFor, W., Becker, D., Thompson, D., Resto-Ruiz, S., and Lopez-Cepero, M. (2012). The acceptable reactive crossmatch (ARC), post-transplant monitoring, and their impact on kidney transplantation: a single center experience. *Clin Transpl*, 373-379.
317. Leslie, D. S., Vincent, M. S., Spada, F. M., Das, H., Sugita, M., Morita, C. T., and Brenner, M. B. (2002). CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells. *J Exp Med* 196, 1575-1584.
318. Li, B., Rossman, M. D., Imir, T., Oner-Eyuboglu, A. F., Lee, C. W., Biancaniello, R., and Carding, S. R. (1996). Disease-specific changes in gammadelta T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis. *J Immunol* 157, 4222-4229.
319. Li, H., Lebedeva, M. I., Llera, A. S., Fields, B. A., Brenner, M. B., and Mariuzza, R. A. (1998). Structure of the Vdelta domain of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* 391, 502-506.
320. Li, X., Ishida, H., Yamaguchi, Y., and Tanabe, K. (2008). Poor graft outcome in recipients with de novo donor-specific anti-HLA antibodies after living related kidney transplantation. *Transpl Int* 21, 1145-1152.
321. Li, Y., Innocentin, S., Withers, D. R., Roberts, N. A., Gallagher, A. R., Grigorieva, E. F., Wilhelm, C., and Veldhoen, M. (2011). Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. *Cell* 147, 629-640.
322. Liefeldt, L., Brakemeier, S., Glander, P., Waiser, J., Lachmann, N., Schonemann, C., Zukunft, B., Illigens, P., Schmidt, D., Wu, K., *et al.* (2012). Donor-specific HLA antibodies in a cohort comparing everolimus with cyclosporine after kidney transplantation. *Am J Transplant* 12, 1192-1198.
323. Limaye, A. P., Kirby, K. A., Rubinfeld, G. D., Leisenring, W. M., Bulger, E. M., Neff, M. J., Gibran, N. S., Huang, M. L., Santo Hayes, T. K., Corey, L., and Boeckh, M. (2008). Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *Jama* 300, 413-422.
324. Locke, J. E., Zachary, A. A., Warren, D. S., Segev, D. L., Hou, J. A., Montgomery, R. A., and Leffell, M. S. (2009). Proinflammatory events are associated with significant increases in breadth and strength of HLA-specific antibody. *Am J Transplant* 9, 2136-2139.
325. Loebe, M., Schuler, S., Zais, O., Warnecke, H., Fleck, E., and Hetzer, R. (1990). Role of cytomegalovirus infection in the development of coronary artery disease in the transplanted heart. *J Heart Transplant* 9, 707-711.
326. Lohmuller, T., Xu, Q., and Groves, J. T. (2013). Nanoscale Obstacle Arrays Frustrate Transport of EphA2-Ephrin-A1 Clusters in Cancer Cell Lines. *Nano Lett.*
327. Loupy, A., Cazes, A., Guillemain, R., Amrein, C., Hedjoudje, A., Tible, M., Pezzella, V., Fabiani, J. N., Suberbielle, C., Nochy, D., *et al.* (2011a). Very late heart transplant rejection is associated with microvascular injury, complement deposition and progression to cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant* 11, 1478-1487.
328. Loupy, A., Hill, G. S., and Jordan, S. C. (2012). The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat Rev Nephrol* 8, 348-357.
329. Loupy, A., Hill, G. S., Suberbielle, C., Charron, D., Anglicheau, D., Zuber, J., Timsit, M. O., Duong, J. P., Bruneval, P., Vernerey, D., *et al.* (2011b). Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). *Am J Transplant* 11, 56-65.
330. Loupy, A., Lefaucheur, C., Vernerey, D., Prugger, C., van Huyen, J. P., Mooney, N., Suberbielle, C., Fremeaux-Bacchi, V., Mejean, A., Desgrandchamps, F., *et al.* (2013). Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med* 369, 1215-1226.
331. Loupy, A., Suberbielle-Boissel, C., Zuber, J., Anglicheau, D., Timsit, M. O., Martinez, F., Thervet, E., Bruneval, P., Charron, D., Hill, G. S., *et al.* (2010). Combined posttransplant prophylactic IVIg/anti-CD 20/plasmapheresis in kidney recipients with preformed donor-specific antibodies: a pilot study. *Transplantation* 89, 1403-1410.
332. Lowance, D., Neumayer, H. H., Legendre, C. M., Squifflet, J. P., Kovarik, J., Brennan, P. J., Norman, D., Mendez, R., Keating, M. R., Coggon, G. L., *et al.* (1999). Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. International Valacyclovir Cytomegalovirus Prophylaxis Transplantation Study Group. *N Engl J Med* 340, 1462-1470.
333. Luan, F. L., Kommareddi, M., and Ojo, A. O. (2011). Universal prophylaxis is cost effective in cytomegalovirus serology-positive kidney transplant patients. *Transplantation* 91, 237-244.

334. Luan, F. L., Stuckey, L. J., Park, J. M., Kaul, D., Cibrik, D., and Ojo, A. (2009). Six-month prophylaxis is cost effective in transplant patients at high risk for cytomegalovirus infection. *J Am Soc Nephrol* *20*, 2449-2458.
335. Luo, H., Yu, G., Tremblay, J., and Wu, J. (2004). EphB6-null mutation results in compromised T cell function. *J Clin Invest* *114*, 1762-1773.
336. Luo, H., Yu, G., Wu, Y., and Wu, J. (2002). EphB6 crosslinking results in costimulation of T cells. *J Clin Invest* *110*, 1141-1150.
337. Lupberger, J., Zeisel, M. B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C. J., Turek, M., Gorke, S., *et al.* (2011). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* *17*, 589-595.
338. Maeda, Y., Reddy, P., Lowler, K. P., Liu, C., Bishop, D. K., and Ferrara, J. L. (2005). Critical role of host gammadelta T cells in experimental acute graft-versus-host disease. *Blood* *106*, 749-755.
339. Maeurer, M. J., Martin, D., Walter, W., Liu, K., Zitvogel, L., Haluszczak, K., Rabinowich, H., Duquesnoy, R., Storkus, W., and Lotze, M. T. (1996). Human intestinal Vdelta1+ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin. *J Exp Med* *183*, 1681-1696.
340. Magri, G., Muntasell, A., Romo, N., Saez-Borderias, A., Pende, D., Geraghty, D. E., Hengel, H., Angulo, A., Moretta, A., and Lopez-Botet, M. (2011). Nkp46 and DNAM-1 NK-cell receptors drive the response to human cytomegalovirus-infected myeloid dendritic cells overcoming viral immune evasion strategies. *Blood* *117*, 848-856.
341. Malhotra, N., Narayan, K., Cho, O. H., Sylvia, K. E., Yin, C., Melichar, H., Rashighi, M., Lefebvre, V., Harris, J. E., Berg, L. J., and Kang, J. (2013). A network of high-mobility group box transcription factors programs innate interleukin-17 production. *Immunity* *38*, 681-693.
342. Mangan, B. A., Dunne, M. R., O'Reilly, V. P., Dunne, P. J., Exley, M. A., O'Shea, D., Scotet, E., Hogan, A. E., and Doherty, D. G. (2013). Cutting edge: CD1d restriction and Th1/Th2/Th17 cytokine secretion by human Vdelta3 T cells. *J Immunol* *191*, 30-34.
343. Manuel, O., Husain, S., Kumar, D., Zayas, C., Mawhorter, S., Levi, M. E., Kalpoe, J., Lisboa, L., Ely, L., Kaul, D. R., *et al.* (2013a). Assessment of Cytomegalovirus-Specific Cell-Mediated Immunity for the Prediction of Cytomegalovirus Disease in High-Risk Solid-Organ Transplant Recipients: A Multicenter Cohort Study. *Clin Infect Dis*.
344. Manuel, O., Kralidis, G., Mueller, N. J., Hirsch, H. H., Garzoni, C., van Delden, C., Berger, C., Boggian, K., Cusini, A., Koller, M. T., *et al.* (2013b). Impact of Antiviral Preventive Strategies on the Incidence and Outcomes of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients. *Am J Transplant*.
345. Mao, Q., Terasaki, P. I., Cai, J., Briley, K., Catrou, P., Haisch, C., and Rebellato, L. (2007). Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study. *Am J Transplant* *7*, 864-871.
346. Marlin, R., Netzer, S., Pitard, V., Daburon, S., Harly, C., Moreau, J. F., Taupin, J. L., and Dechanet-Merville, J. (2012). HLA class I molecules in tumor B cells: stress antigens for Vdelta3 gamma-delta TCR? *Immunology* *137*, 399-399.
347. Marques, R., and Boneca, I. G. (2011). Expression and functional importance of innate immune receptors by intestinal epithelial cells. *Cell Mol Life Sci* *68*, 3661-3673.
348. Martin-Gandul, C., Perez-Romero, P., Sanchez, M., Bernal, G., Suarez, G., Sobrino, M., Merino, L., Cisneros, J. M., and Cordero, E. (2013). Determination, validation and standardization of a CMV DNA cut-off value in plasma for preemptive treatment of CMV infection in solid organ transplant recipients at lower risk for CMV infection. *J Clin Virol* *56*, 13-18.
349. Martinez-Llordella, M., Lozano, J. J., Puig-Pey, I., Orlando, G., Tisone, G., Lerut, J., Benitez, C., Pons, J. A., Parrilla, P., Ramirez, P., *et al.* (2008). Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest* *118*, 2845-2857.
350. Matis, L. A., Fry, A. M., Cron, R. Q., Cotterman, M. M., Dick, R. F., and Bluestone, J. A. (1989). Structure and specificity of a class II MHC alloreactive gamma delta T cell receptor heterodimer. *Science* *245*, 746-749.
351. Matsuo, K., and Otaki, N. (2012). Bone cell interactions through Eph/ephrin: bone modeling, remodeling and associated diseases. *Cell Adh Migr* *6*, 148-156.
352. Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* *296*, 301-305.
353. Mazon, M. C., Alain, S., Leruez-Ville, M., and Schnepf, N. (2009). Infections à cytomégalo virus. *Encyclopédie Médico Chirurgicale*.
354. McGillicuddy, J. W., Weimert, N. A., Taber, D. J., Turner, A., Mitchell, L. A., Wray, D. W., Egidi, M. F., Kuppachi, S., Hughes, M. G., Baliga, P. K., and Chavin, K. D. (2010). Can preemptive cytomegalovirus monitoring be as effective as universal prophylaxis when implemented as the standard of care in patients at moderate risk? *Transplantation* *89*, 1218-1223.

355. Meehan, S. M., Kremer, J., Ali, F. N., Curley, J., Marino, S., Chang, A., and Kadambi, P. V. (2011). Thrombotic microangiopathy and peritubular capillary C4d expression in renal allograft biopsies. *Clin J Am Soc Nephrol* 6, 395-403.
356. Meier-Kriesche, H. U., Li, S., Gruessner, R. W., Fung, J. J., Bustami, R. T., Barr, M. L., and Leichtman, A. B. (2006). Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004. *Am J Transplant* 6, 1111-1131.
357. Meier-Kriesche, H. U., Schold, J. D., Srinivas, T. R., and Kaplan, B. (2004). Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 4, 378-383.
358. Mendes-da-Cruz, D. A., Stimamiglio, M. A., Munoz, J. J., Alfaro, D., Terra-Granado, E., Garcia-Ceca, J., Alonso-Colmenar, L. M., Savino, W., and Zapata, A. G. (2012). Developing T-cell migration: role of semaphorins and ephrins. *Faseb J* 26, 4390-4399.
359. Mengel, M., Husain, S., Hidalgo, L., and Sis, B. (2012a). Phenotypes of antibody-mediated rejection in organ transplants. *Transpl Int* 25, 611-622.
360. Mengel, M., Sis, B., Haas, M., Colvin, R. B., Halloran, P. F., Racusen, L. C., Solez, K., Cendales, L., Demetris, A. J., Drachenberg, C. B., *et al.* (2012b). Banff 2011 Meeting Report: New Concepts in Antibody-Mediated Rejection. *Am J Transplant* 12, 563-570.
361. Mentzel, U., Vogt, H., Rossol, R., Geissler, R. G., Maurer, A., Ganser, A., Trommer, W. E., and Hoelzer, D. (1993). Analysis of lymphocyte subsets in patients with aplastic anemia before and during immunosuppressive therapy. *Ann Hematol* 66, 127-129.
362. Meraviglia, S., Caccamo, N., Guggino, G., Tolomeo, M., Siragusa, S., Stassi, G., and Dieli, F. (2010a). Optimizing tumor-reactive gammadelta T cells for antibody-based cancer immunotherapy. *Curr Mol Med* 10, 719-726.
363. Meraviglia, S., Eberl, M., Vermijlen, D., Todaro, M., Buccheri, S., Cicero, G., La Mendola, C., Guggino, G., D'Asaro, M., Orlando, V., *et al.* (2010b). In vivo manipulation of Vgamma9Vdelta2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clin Exp Immunol* 161, 290-297.
364. Messaoudi, I., Lemaoult, J., Guevara-Patino, J. A., Metzner, B. M., and Nikolich-Zugich, J. (2004). Age-related CD8 T cell clonal expansions constrict CD8 T cell repertoire and have the potential to impair immune defense. *J Exp Med* 200, 1347-1358.
365. Miao, H., Wei, B. R., Peehl, D. M., Li, Q., Alexandrou, T., Schelling, J. R., Rhim, J. S., Sedor, J. R., Burnett, E., and Wang, B. (2001). Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway. *Nat Cell Biol* 3, 527-530.
366. Michel, M. L., Pang, D. J., Haque, S. F., Potocnik, A. J., Pennington, D. J., and Hayday, A. C. (2012). Interleukin 7 (IL-7) selectively promotes mouse and human IL-17-producing gammadelta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 17549-17554.
367. Modlin, R. L., Pirmez, C., Hofman, F. M., Torigian, V., Uyemura, K., Rea, T. H., Bloom, B. R., and Brenner, M. B. (1989). Lymphocytes bearing antigen-specific gamma delta T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature* 339, 544-548.
368. Mohan, S., Palanisamy, A., Tsapepas, D., Tanriover, B., Crew, R. J., Dube, G., Ratner, L. E., Cohen, D. J., and Radhakrishnan, J. (2012). Donor-specific antibodies adversely affect kidney allograft outcomes. *J Am Soc Nephrol* 23, 2061-2071.
369. Montgomery, R. A., Lonze, B. E., King, K. E., Kraus, E. S., Kucirka, L. M., Locke, J. E., Warren, D. S., Simpkins, C. E., Dagher, N. N., Singer, A. L., *et al.* (2011). Desensitization in HLA-incompatible kidney recipients and survival. *N Engl J Med* 365, 318-326.
370. Morath, C., Beimler, J., Opelz, G., Scherer, S., Schmidt, J., Macher-Goeppinger, S., Klein, K., Sommerer, C., Schwenger, V., Zeier, M., and Susal, C. (2011). Living donor kidney transplantation in crossmatch-positive patients enabled by peritransplant immunoadsorption and anti-CD20 therapy. *Transpl Int* 25, 506-517.
371. Morita, C. T., Beckman, E. M., Bukowski, J. F., Tanaka, Y., Band, H., Bloom, B. R., Golan, D. E., and Brenner, M. B. (1995). Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity* 3, 495-507.
372. Mosch, B., Pietzsch, D., and Pietzsch, J. (2012). Irradiation affects cellular properties and Eph receptor expression in human melanoma cells. *Cell Adh Migr* 6, 113-125.
373. Mosch, B., Reissenweber, B., Neuber, C., and Pietzsch, J. (2010). Eph receptors and ephrin ligands: important players in angiogenesis and tumor angiogenesis. *J Oncol* 2010, 135285.
374. Munk, M. E., Soboslay, P. T., Arnoldi, J., Brattig, N., Schulz-Key, H., and Kaufmann, S. H. (1993). *Onchocerca volvulus* provides ligands for the stimulation of human gamma/delta T lymphocytes expressing V delta 1 chains. *J Infect Dis* 168, 1241-1247.
375. Muntasell, A., Magri, G., Pende, D., Angulo, A., and Lopez-Botet, M. (2010). Inhibition of NKG2D expression in NK cells by cytokines secreted in response to human cytomegalovirus infection. *Blood* 115, 5170-5179.

376. Munthe, E., Finne, E. F., and Aasheim, H. C. (2004). Expression and functional effects of Eph receptor tyrosine kinase A family members on Langerhans like dendritic cells. *BMC Immunol* 5, 9.
377. Nanno, M., Seki, H., Mathioudakis, G., Suzuki, R., Itoh, K., Ioannides, C. G., Suzuki, S., Chen, P. F., and Platsoucas, C. D. (1992). Gamma/delta T cell antigen receptors expressed on tumor-infiltrating lymphocytes from patients with solid tumors. *Eur J Immunol* 22, 679-687.
378. Nantz, M. P., Rowe, C. A., Nieves, C., Jr., and Percival, S. S. (2006). Immunity and antioxidant capacity in humans is enhanced by consumption of a dried, encapsulated fruit and vegetable juice concentrate. *J Nutr* 136, 2606-2610.
379. Narayan, K., Sylvia, K. E., Malhotra, N., Yin, C. C., Martens, G., Vallerskog, T., Kornfeld, H., Xiong, N., Cohen, N. R., Brenner, M. B., *et al.* (2012). Intrathymic programming of effector fates in three molecularly distinct gammadelta T cell subtypes. *Nat Immunol* 13, 511-518.
380. Nenci, A., Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., van Loo, G., Danese, S., Huth, M., Nikolaev, A., Neufert, C., Madison, B., *et al.* (2007). Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 446, 557-561.
381. Nett, P. C., Heisey, D. M., Fernandez, L. A., Sollinger, H. W., and Pirsch, J. D. (2004). Association of cytomegalovirus disease and acute rejection with graft loss in kidney transplantation. *Transplantation* 78, 1036-1041.
382. Newell, K. A., Asare, A., Kirk, A. D., Gisler, T. D., Bourcier, K., Suthanthiran, M., Burlingham, W. J., Marks, W. H., Sanz, I., Lechler, R. I., *et al.* (2010). Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 120, 1836-1847.
383. Nickel, P., Bold, G., Presber, F., Biti, D., Babel, N., Kreutzer, S., Pratschke, J., Schonemann, C., Kern, F., Volk, H. D., and Reinke, P. (2009). High levels of CMV-IE-1-specific memory T cells are associated with less alloimmunity and improved renal allograft function. *Transpl Immunol* 20, 238-242.
384. Ninomiya, T., Takimoto, H., Matsuzaki, G., Hamano, S., Yoshida, H., Yoshikai, Y., Kimura, G., and Nomoto, K. (2000). Vgamma1+ gammadelta T cells play protective roles at an early phase of murine cytomegalovirus infection through production of interferon-gamma. *Immunology* 99, 187-194.
385. Nishio-Lucar, A., Balogun, R. A., and Sanoff, S. (2013). Therapeutic apheresis in kidney transplantation: a review of renal transplant immunobiology and current interventions with apheresis medicine. *J Clin Apher* 28, 56-63.
386. Nogalski, M. T., Chan, G., Stevenson, E. V., Gray, S., and Yurochko, A. D. (2011). Human cytomegalovirus-regulated paxillin in monocytes links cellular pathogenic motility to the process of viral entry. *J Virol* 85, 1360-1369.
387. Nogalski, M. T., Chan, G. C., Stevenson, E. V., Collins-McMillen, D. K., and Yurochko, A. D. (2013). The HCMV gH/gL/UL128-131 Complex Triggers the Specific Cellular Activation Required for Efficient Viral Internalization into Target Monocytes. *PLoS Pathog* 9, e1003463.
388. Ntokou, I. S., Iniotaki, A. G., Kontou, E. N., Darema, M. N., Apostolaki, M. D., Kostakis, A. G., and Boletis, J. N. (2011). Long-term follow up for anti-HLA donor specific antibodies postrenal transplantation: high immunogenicity of HLA class II graft molecules. *Transpl Int* 24, 1084-1093.
389. Numazaki, K., and Chiba, S. (1997). Current aspects of diagnosis and treatment of cytomegalovirus infections in infants. *Clin Diagn Virol* 8, 169-181.
390. O'Brien, R. L., Fu, Y. X., Cranfill, R., Dallas, A., Ellis, C., Reardon, C., Lang, J., Carding, S. R., Kubo, R., and Born, W. (1992). Heat shock protein Hsp60-reactive gamma delta cells: a large, diversified T-lymphocyte subset with highly focused specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4348-4352.
391. O'Connor, B. P., Eun, S. Y., Ye, Z., Zozulya, A. L., Lich, J. D., Moore, C. B., Iocca, H. A., Roney, K. E., Holl, E. K., Wu, Q. P., *et al.* (2008). Semaphorin 6D regulates the late phase of CD4+ T cell primary immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13015-13020.
392. O'Grady, J. G., Alexander, G. J., Sutherland, S., Donaldson, P. T., Harvey, F., Portmann, B., Calne, R. Y., and Williams, R. (1988). Cytomegalovirus infection and donor/recipient HLA antigens: interdependent co-factors in pathogenesis of vanishing bile-duct syndrome after liver transplantation. *Lancet* 2, 302-305.
393. Oksenberg, J. R., Panzara, M. A., Begovich, A. B., Mitchell, D., Erlich, H. A., Murray, R. S., Shimonkevitz, R., Sherritt, M., Rothbard, J., Bernard, C. C., and *et al.* (1993). Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. *Nature* 362, 68-70.
394. Olive, C., Gatenby, P. A., and Serjeantson, S. W. (1992). Variable gene usage of T cell receptor gamma- and delta-chain transcripts expressed in synovia and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 87, 172-177.
395. Opelz, G., Daniel, V., Naujokat, C., Fickenscher, H., and Dohler, B. (2007). Effect of cytomegalovirus prophylaxis with immunoglobulin or with antiviral drugs on post-transplant non-Hodgkin lymphoma: a multicentre retrospective analysis. *Lancet Oncol* 8, 212-218.

396. Opelz, G., and Wujciak, T. (1994). The influence of HLA compatibility on graft survival after heart transplantation. The Collaborative Transplant Study. *N Engl J Med* *330*, 816-819.
397. Orsini, D. L., Res, P. C., Van Laar, J. M., Muller, L. M., Soprano, A. E., Kooy, Y. M., Tak, P. P., and Koning, F. (1993). A subset of V delta 1+ T cells proliferates in response to Epstein-Barr virus-transformed B cell lines in vitro. *Scand J Immunol* *38*, 335-340.
398. Otten, H. G., Verhaar, M. C., Borst, H. P., Hene, R. J., and van Zuilen, A. D. (2012). Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure. *Am J Transplant* *12*, 1618-1623.
399. Pabst, C., Schirutschke, H., Ehninger, G., Bornhauser, M., and Platzbecker, U. (2007). The graft content of donor T cells expressing gamma delta TCR+ and CD4+foxp3+ predicts the risk of acute graft versus host disease after transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells from unrelated donors. *Clin Cancer Res* *13*, 2916-2922.
400. Paludan, S. R., Bowie, A. G., Horan, K. A., and Fitzgerald, K. A. (2011). Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nat Rev Immunol* *11*, 143-154.
401. Pang, X. L., Fox, J. D., Fenton, J. M., Miller, G. G., Caliendo, A. M., and Preiksaitis, J. K. (2009). Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *Am J Transplant* *9*, 258-268.
402. Papazian, L., Thomas, P., Bregeon, F., Garbe, L., Zandotti, C., Saux, P., Gaillat, F., Drancourt, M., Auffray, J. P., and Gouin, F. (1998). Open-lung biopsy in patients with acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* *88*, 935-944.
403. Paraskeva, M., Bailey, M., Levvey, B. J., Griffiths, A. P., Kotsimbos, T. C., Williams, T. P., Snell, G., and Westall, G. (2011). Cytomegalovirus replication within the lung allograft is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant* *11*, 2190-2196.
404. Parker, C. M., Groh, V., Band, H., Porcelli, S. A., Morita, C., Fabbi, M., Glass, D., Strominger, J. L., and Brenner, M. B. (1990). Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J Exp Med* *171*, 1597-1612.
405. Pasquale, E. B. (2010). Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat Rev Cancer* *10*, 165-180.
406. Patel, R., and Terasaki, P. I. (1969). Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* *280*, 735-739.
407. Pawelec, G., Friccius, H., Boshell, M., Siegels-Hubenthal, P., Rehbein, A., Schlotz, E., Pohla, H., Schaudt, K., and Sansom, D. (1995). Human gamma delta T cells are resistant to induction of anergy but not to induction of cell death in vitro. *Cell Immunol* *162*, 8-15.
408. Pawson, T. (2007). Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins. *Curr Opin Cell Biol* *19*, 112-116.
409. Penfold, M. E., and Mocarski, E. S. (1997). Formation of cytomegalovirus DNA replication compartments defined by localization of viral proteins and DNA synthesis. *Virology* *239*, 46-61.
410. Peng, G., Wang, H. Y., Peng, W., Kiniwa, Y., Seo, K. H., and Wang, R. F. (2007). Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity* *27*, 334-348.
411. Peng, S. L., Madaio, M. P., Hayday, A. C., and Craft, J. (1996). Propagation and regulation of systemic autoimmunity by gammadelta T cells. *J Immunol* *157*, 5689-5698.
412. Petrakopoulou, P., Kubrich, M., Pehlivanli, S., Meiser, B., Reichart, B., von Scheidt, W., and Weis, M. (2004). Cytomegalovirus infection in heart transplant recipients is associated with impaired endothelial function. *Circulation* *110*, H207-212.
413. Pierce, G. E., Barth, R. F., Vessella, R. L., Cross, D. E., and Stewart, C. S. (1979). Specific and nonspecific cytotoxicity of leukocytes from human renal allograft recipients against donor fibroblasts. *Transplantation* *27*, 156-162.
414. Pitard, V., Roumanes, D., Lafarge, X., Couzi, L., Garrigue, I., Lafon, M. E., Merville, P., Moreau, J. F., and Dechanet-Merville, J. (2008). Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood* *112*, 1317-1324.
415. Pluschke, G., Ruegg, D., Hohlfeld, R., and Engel, A. G. (1992). Autoaggressive myocytotoxic T lymphocytes expressing an unusual gamma/delta T cell receptor. *J Exp Med* *176*, 1785-1789.
416. Poccia, F., Boullier, S., Lecoeur, H., Cochet, M., Poquet, Y., Colizzi, V., Fournie, J. J., and Gougeon, M. L. (1996). Peripheral V gamma 9/V delta 2 T cell deletion and anergy to nonpeptidic mycobacterial antigens in asymptomatic HIV-1-infected persons. *J Immunol* *157*, 449-461.
417. Poccia, F., Malkovsky, M., Pollak, A., Colizzi, V., Sireci, G., Salerno, A., and Dieli, F. (1999). In vivo gammadelta T cell priming to mycobacterial antigens by primary Mycobacterium tuberculosis infection and exposure to nonpeptidic ligands. *Mol Med* *5*, 471-476.

418. Poles, M. A., Barsoum, S., Yu, W., Yu, J., Sun, P., Daly, J., He, T., Mehandru, S., Talal, A., Markowitz, M., *et al.* (2003). Human immunodeficiency virus type 1 induces persistent changes in mucosal and blood gammadelta T cells despite suppressive therapy. *J Virol* 77, 10456-10467.
419. Polic, B., Hengel, H., Krmpotic, A., Trgovcich, J., Pavic, I., Luccaronin, P., Jonjic, S., and Koszinowski, U. H. (1998). Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J Exp Med* 188, 1047-1054.
420. Poljak, R. J., Amzel, L. M., Avey, H. P., Chen, B. L., Phizackerley, R. P., and Saul, F. (1973). Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2,8-A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 3305-3310.
421. Potena, L., Grigioni, F., Magnani, G., Lazzarotto, T., Musuraca, A. C., Ortolani, P., Coccolo, F., Fallani, F., Russo, A., and Branzi, A. (2009). Prophylaxis versus preemptive anti-cytomegalovirus approach for prevention of allograft vasculopathy in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 28, 461-467.
422. Potena, L., Holweg, C. T., Chin, C., Luikart, H., Weisshaar, D., Narasimhan, B., Fearon, W. F., Lewis, D. B., Cooke, J. P., Mocarski, E. S., and Valantine, H. A. (2006). Acute rejection and cardiac allograft vascular disease is reduced by suppression of subclinical cytomegalovirus infection. *Transplantation* 82, 398-405.
423. Pouteil-Noble, C., Ecochard, R., Landrison, G., Donia-Maged, A., Tardy, J. C., Bosshard, S., Colon, S., Betuel, H., Aymard, M., and Touraine, J. L. (1993). Cytomegalovirus infection--an etiological factor for rejection? A prospective study in 242 renal transplant patients. *Transplantation* 55, 851-857.
424. Puig-Pey, I., Bohne, F., Benitez, C., Lopez, M., Martinez-Llordella, M., Oppenheimer, F., Lozano, J. J., Gonzalez-Abraldes, J., Tisone, G., Rimola, A., and Sanchez-Fueyo, A. (2010). Characterization of gammadelta T cell subsets in organ transplantation. *Transpl Int* 23, 1045-1055.
425. Quinnan, G. V., and Manischewitz, J. E. (1979). The role of natural killer cells and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med* 150, 1549-1554.
426. Quinnan, G. V., Manischewitz, J. E., and Ennis, F. A. (1978). Cytotoxic T lymphocyte response to murine cytomegalovirus infection. *Nature* 273, 541-543.
427. Raasveld, M. H., Bloemena, E., Surachno, S., and ten Berge, R. J. (1992). T gamma/delta lymphocytes in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 7, 530-533.
428. Racusen, L. C., Solez, K., Colvin, R. B., Bonsib, S. M., Castro, M. C., Cavallo, T., Croker, B. P., Demetris, A. J., Drachenberg, C. B., Fogo, A. B., *et al.* (1999). The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55, 713-723.
429. Raju, T. S. (2008). Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr Opin Immunol* 20, 471-478.
430. Rathinam, V. A., Jiang, Z., Waggoner, S. N., Sharma, S., Cole, L. E., Waggoner, L., Vanaja, S. K., Monks, B. G., Ganesan, S., Latz, E., *et al.* (2010). The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 11, 395-402.
431. Read, M. A., Whitley, M. Z., Williams, A. J., and Collins, T. (1994). NF-kappa B and I kappa B alpha: an inducible regulatory system in endothelial activation. *J Exp Med* 179, 503-512.
432. Rebellato, L. M., Everly, M. J., Haisch, C. E., Ozawa, M., Briley, K. P., Parker, K., Catrou, P. G., Bolin, P., Kendrick, W. T., Kendrick, S. A., and Harland, R. C. (2011). A report of the epidemiology of de novo donor-specific anti-HLA antibodies (DSA) in "low-risk" renal transplant recipients. *Clin Transpl*, 337-340.
433. Reinke, P., Fietze, E., Ode-Hakim, S., Prosch, S., Lippert, J., Ewert, R., and Volk, H. D. (1994). Late-acute renal allograft rejection and symptomless cytomegalovirus infection. *Lancet* 344, 1737-1738.
434. Reischig, T., Hribova, P., Jindra, P., Hes, O., Bouda, M., Treska, V., and Viklicky, O. (2012). Long-term outcomes of pre-emptive valganciclovir compared with valacyclovir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 23, 1588-1597.
435. Reischig, T., Jindra, P., Hes, O., Bouda, M., Kormunda, S., and Treska, V. (2009). Effect of cytomegalovirus viremia on subclinical rejection or interstitial fibrosis and tubular atrophy in protocol biopsy at 3 months in renal allograft recipients managed by preemptive therapy or antiviral prophylaxis. *Transplantation* 87, 436-444.
436. Reischig, T., Jindra, P., Hes, O., Svecova, M., Klaboch, J., and Treska, V. (2008). Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Am J Transplant* 8, 69-77.
437. Rentenaar, R. J., Gamadia, L. E., van DerHoek, N., van Diepen, F. N., Boom, R., Weel, J. F., Wertheim-van Dillen, P. M., van Lier, R. A., and ten Berge, I. J. (2000). Development of virus-specific CD4(+) T cells during primary cytomegalovirus infection. *J Clin Invest* 105, 541-548.
438. Rey, J., Veuillen, C., Vey, N., Bouabdallah, R., and Olive, D. (2009). Natural killer and gammadelta T cells in haematological malignancies: enhancing the immune effectors. *Trends Mol Med* 15, 275-284.

439. Ribot, J. C., deBarros, A., Pang, D. J., Neves, J. F., Peperzak, V., Roberts, S. J., Girardi, M., Borst, J., Hayday, A. C., Pennington, D. J., and Silva-Santos, B. (2009). CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol* *10*, 427-436.
440. Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E., and Greenberg, P. D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* *257*, 238-241.
441. Riley, H. D., Jr. (1997). History of the cytomegalovirus. *South Med J* *90*, 184-190.
442. Roberts, N. A., White, A. J., Jenkinson, W. E., Turchinovich, G., Nakamura, K., Withers, D. R., McConnell, F. M., Desanti, G. E., Benezech, C., Parnell, S. M., *et al.* (2012). Rank signaling links the development of invariant gammadelta T cell progenitors and Aire(+) medullary epithelium. *Immunity* *36*, 427-437.
443. Roitt, I. M., Greaves, M. F., Torrigiani, G., Brostoff, J., and Playfair, J. H. (1969). The cellular basis of immunological responses. A synthesis of some current views. *Lancet* *2*, 367-371.
444. Rossini, G., Cerboni, C., Santoni, A., Landini, M. P., Landolfo, S., Gatti, D., Gribaudo, G., and Varani, S. (2013). Interplay between human cytomegalovirus and intrinsic/innate host responses: a complex bidirectional relationship. *Mediators Inflamm* *2012*, 607276.
445. Rossol, R., Dobmeyer, J. M., Dobmeyer, T. S., Klein, S. A., Rossol, S., Wesch, D., Hoelzer, D., Kabelitz, D., and Helm, E. B. (1998). Increase in Vdelta1+ gammadelta T cells in the peripheral blood and bone marrow as a selective feature of HIV-1 but not other virus infections. *Br J Haematol* *100*, 728-734.
446. Roux, A., Mourin, G., Larsen, M., Fastenackels, S., Urrutia, A., Gorochoy, G., Autran, B., Donner, C., Sidi, D., Sibony-Prat, J., *et al.* (2013). Differential Impact of Age and Cytomegalovirus Infection on the gammadelta T Cell Compartment. *J Immunol* *191*, 1300-1306.
447. Rowe, W. P., Hartley, J. W., Waterman, S., Turner, H. C., and Huebner, R. J. (1956). Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med* *92*, 418-424.
448. Russano, A. M., Bassotti, G., Agea, E., Bistoni, O., Mazzocchi, A., Morelli, A., Porcelli, S. A., and Spinuzzi, F. (2007). CD1-restricted recognition of exogenous and self-lipid antigens by duodenal gammadelta+ T lymphocytes. *J Immunol* *178*, 3620-3626.
449. Russell, P. S., Chase, C. M., Winn, H. J., and Colvin, R. B. (1994). Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. II. Importance of humoral immunity. *J Immunol* *152*, 5135-5141.
450. Rust, C. J., Verreck, F., Vietor, H., and Koning, F. (1990). Specific recognition of staphylococcal enterotoxin A by human T cells bearing receptors with the V gamma 9 region. *Nature* *346*, 572-574.
451. Saadi, S., and Platt, J. L. (1995). Transient perturbation of endothelial integrity induced by natural antibodies and complement. *J Exp Med* *181*, 21-31.
452. Sagedal, S., Hartmann, A., Nordal, K. P., Osnes, K., Leivestad, T., Foss, A., Degre, M., Fauchald, P., and Rollag, H. (2004). Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int* *66*, 329-337.
453. Sagedal, S., Nordal, K. P., Hartmann, A., Degre, M., Holter, E., Foss, A., Osnes, K., Leivestad, T., Fauchald, P., and Rollag, H. (2000). A prospective study of the natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal allograft recipients. *Transplantation* *70*, 1166-1174.
454. Sagedal, S., Nordal, K. P., Hartmann, A., Sund, S., Scott, H., Degre, M., Foss, A., Leivestad, T., Osnes, K., Fauchald, P., and Rollag, H. (2002). The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant* *2*, 850-856.
455. Sagoo, P., Perucha, E., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Stephens, D. A., Miqueu, P., Chapman, S., Craciun, L., Sergeant, R., Brouard, S., *et al.* (2010). Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* *120*, 1848-1861.
456. Saito, H., Kranz, D. M., Takagaki, Y., Hayday, A. C., Eisen, H. N., and Tonegawa, S. (1984). A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Nature* *312*, 36-40.
457. Sakurai, A., Doci, C. L., and Gutkind, J. S. (2012). Semaphorin signaling in angiogenesis, lymphangiogenesis and cancer. *Cell Res* *22*, 23-32.
458. Salaita, K., and Groves, J. T. (2010). Roles of the cytoskeleton in regulating EphA2 signals. *Commun Integr Biol* *3*, 454-457.
459. Sarwal, M., Chua, M. S., Kambham, N., Hsieh, S. C., Satterwhite, T., Masek, M., and Salvatierra, O., Jr. (2003). Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med* *349*, 125-138.
460. Satoskar, A. A., Pelletier, R., Adams, P., Nadasdy, G. M., Brodsky, S., Pesavento, T., Henry, M., and Nadasdy, T. (2010). De novo thrombotic microangiopathy in renal allograft biopsies-role of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* *10*, 1804-1811.
461. Sautenet, B., Blancho, G., Buchler, M., Morelon, E., Toupance, O., Barrou, B., Ducloux, D., de Ligny, B. H., Moulin, B., Le Gouge, A., and Lebranchu, Y. (2013). One Year Results of the Effects of Rituximab on Acute

- Humoral Rejection in Renal Transplantation: RITUX ERAH, a Multicenter Randomized Placebo Controlled Trial. *American Journal of Transplantation* *13*, 112-112.
462. Savransky, V., Molls, R. R., Burne-Taney, M., Chien, C. C., Racusen, L., and Rabb, H. (2006). Role of the T-cell receptor in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* *69*, 233-238.
  463. Sawamiphak, S., Seidel, S., Essmann, C. L., Wilkinson, G. A., Pitulescu, M. E., Acker, T., and Acker-Palmer, A. (2010). Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature* *465*, 487-491.
  464. Sberro-Soussan, R., Zuber, J., Suberbielle-Boissel, C., Candon, S., Martinez, F., Snanoudj, R., Rabant, M., Pallet, N., Nochy, D., Anglicheau, D., *et al.* (2010). Bortezomib as the sole post-renal transplantation desensitization agent does not decrease donor-specific anti-HLA antibodies. *Am J Transplant* *10*, 681-686.
  465. Scheper, W., van Dorp, S., Kersting, S., Pietersma, F., Lindemans, C., Hol, S., Heijhuurs, S., Sebestyen, Z., Grunder, C., Marcu-Malina, V., *et al.* (2013). gammadeltaT cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT cross-recognize CMV and leukemia. *Leukemia* *27*, 1328-1338.
  466. Schild, H., Mavaddat, N., Litzemberger, C., Ehrlich, E. W., Davis, M. M., Bluestone, J. A., Matis, L., Draper, R. K., and Chien, Y. H. (1994). The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. *Cell* *76*, 29-37.
  467. Schirmer, L., Rothhammer, V., Hemmer, B., and Korn, T. (2013). Enriched CD161<sup>high</sup> CCR6<sup>+</sup> gammadelta T cells in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *JAMA Neurol* *70*, 345-351.
  468. Schmidt, T., Ritter, M., Dirks, J., Gartner, B. C., Sester, U., and Sester, M. (2012). Cytomegalovirus-specific T-cell immunity to assign the infection status in individuals with passive immunity: a proof of principle. *J Clin Virol* *54*, 272-275.
  469. Sciammas, R., Johnson, R. M., Sperling, A. I., Brady, W., Linsley, P. S., Spear, P. G., Fitch, F. W., and Bluestone, J. A. (1994). Unique antigen recognition by a herpesvirus-specific TCR-gamma delta cell. *J Immunol* *152*, 5392-5397.
  470. Scotet, E., Martinez, L. O., Grant, E., Barbaras, R., Jenö, P., Guiraud, M., Monsarrat, B., Saulquin, X., Maillet, S., Esteve, J. P., *et al.* (2005). Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* *22*, 71-80.
  471. Seiradake, E., Harlos, K., Sutton, G., Aricescu, A. R., and Jones, E. Y. (2010). An extracellular steric seeding mechanism for Eph-ephrin signaling platform assembly. *Nat Struct Mol Biol* *17*, 398-402.
  472. Seiradake, E., Schaupp, A., Del Toro Ruiz, D., Kaufmann, R., Mitakidis, N., Harlos, K., Aricescu, A. R., Klein, R., and Jones, E. Y. (2013). Structurally encoded intraclass differences in EphA clusters drive distinct cell responses. *Nat Struct Mol Biol* *20*, 958-964.
  473. Sellares, J., de Freitas, D. G., Mengel, M., Reeve, J., Einecke, G., Sis, B., Hidalgo, L. G., Famulski, K., Matas, A., and Halloran, P. F. (2012). Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* *12*, 388-399.
  474. Sellares, J., Reeve, J., Loupy, A., Mengel, M., Sis, B., Skene, A., de Freitas, D. G., Kreepala, C., Hidalgo, L. G., Famulski, K. S., and Halloran, P. F. (2013). Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. *Am J Transplant* *13*, 971-983.
  475. Sester, M., Gartner, B. C., Sester, U., Girndt, M., Mueller-Lantzsch, N., and Kohler, H. (2003). Is the cytomegalovirus serologic status always accurate? A comparative analysis of humoral and cellular immunity. *Transplantation* *76*, 1229-1230.
  476. Sharfe, N., Nikolic, M., Cimpeon, L., Van De Kratts, A., Freywald, A., and Roifman, C. M. (2008). EphA and ephrin-A proteins regulate integrin-mediated T lymphocyte interactions. *Mol Immunol* *45*, 1208-1220.
  477. Sharp, L. L., Jameson, J. M., Cauvi, G., and Havran, W. L. (2005). Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1. *Nat Immunol* *6*, 73-79.
  478. Sheffler-Collins, S. I., and Dalva, M. B. (2012). EphBs: an integral link between synaptic function and synaptopathies. *Trends Neurosci* *35*, 293-304.
  479. Shi, C., Lee, W. S., He, Q., Zhang, D., Fletcher, D. L., Jr., Newell, J. B., and Haber, E. (1996). Immunologic basis of transplant-associated arteriosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 4051-4056.
  480. Shibata, K., Yamada, H., Hara, H., Kishihara, K., and Yoshikai, Y. (2007). Resident Vdelta1<sup>+</sup> gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17 production. *J Immunol* *178*, 4466-4472.
  481. Shimamura, M., Murphy-Ullrich, J. E., and Britt, W. J. (2010). Human cytomegalovirus induces TGF-beta1 activation in renal tubular epithelial cells after epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS Pathog* *6*, e1001170.
  482. Shimonkevitz, R., Colburn, C., Burnham, J. A., Murray, R. S., and Kotzin, B. L. (1993). Clonal expansions of activated gamma/delta T cells in recent-onset multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 923-927.
  483. Shin, S., El-Diwanly, R., Schaffert, S., Adams, E. J., Garcia, K. C., Pereira, P., and Chien, Y. H. (2005). Antigen recognition determinants of gammadelta T cell receptors. *Science* *308*, 252-255.

484. Silva-Santos, B., Pennington, D. J., and Hayday, A. C. (2005). Lymphotoxin-mediated regulation of gammadelta cell differentiation by alphabeta T cell progenitors. *Science* 307, 925-928.
485. Simanek, A. M., Dowd, J. B., Pawelec, G., Melzer, D., Dutta, A., and Aiello, A. E. (2011). Seropositivity to cytomegalovirus, inflammation, all-cause and cardiovascular disease-related mortality in the United States. *PLoS One* 6, e16103.
486. Sinzger, C., Digel, M., and Jahn, G. (2008). Cytomegalovirus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immunol* 325, 63-83.
487. Sis, B., Campbell, P. M., Mueller, T., Hunter, C., Cockfield, S. M., Cruz, J., Meng, C., Wishart, D., Solez, K., and Halloran, P. F. (2007). Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause. *Am J Transplant* 7, 1743-1752.
488. Sis, B., Einecke, G., Chang, J., Hidalgo, L. G., Mengel, M., Kaplan, B., and Halloran, P. F. (2010a). Cluster analysis of lesions in nonselected kidney transplant biopsies: microcirculation changes, tubulointerstitial inflammation and scarring. *Am J Transplant* 10, 421-430.
489. Sis, B., and Halloran, P. F. (2010). Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant* 15, 42-48.
490. Sis, B., Jhangri, G. S., Bunnag, S., Allanach, K., Kaplan, B., and Halloran, P. F. (2009). Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 9, 2312-2323.
491. Sis, B., Jhangri, G. S., Riopel, J., Chang, J., de Freitas, D. G., Hidalgo, L., Mengel, M., Matas, A., and Halloran, P. F. (2012). A new diagnostic algorithm for antibody-mediated microcirculation inflammation in kidney transplants. *Am J Transplant* 12, 1168-1179.
492. Sis, B., Mengel, M., Haas, M., Colvin, R. B., Halloran, P. F., Racusen, L. C., Solez, K., Baldwin, W. M., 3rd, Bracamonte, E. R., Broecker, V., *et al.* (2010b). Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 10, 464-471.
493. Smith, J. M., Corey, L., Bittner, R., Finn, L. S., Healey, P. J., Davis, C. L., and McDonald, R. A. (2010). Subclinical viremia increases risk for chronic allograft injury in pediatric renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 21, 1579-1586.
494. Smith, M. G. (1956). Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 92, 424-430.
495. Smith, M. S., Bentz, G. L., Alexander, J. S., and Yurochko, A. D. (2004). Human cytomegalovirus induces monocyte differentiation and migration as a strategy for dissemination and persistence. *J Virol* 78, 4444-4453.
496. Snyder, C. M., Cho, K. S., Bonnett, E. L., van Dommelen, S., Shellam, G. R., and Hill, A. B. (2008). Memory inflation during chronic viral infection is maintained by continuous production of short-lived, functional T cells. *Immunity* 29, 650-659.
497. Soderberg-Naucler, C., Fish, K. N., and Nelson, J. A. (1997a). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines. *J Clin Invest* 100, 3154-3163.
498. Soderberg-Naucler, C., Fish, K. N., and Nelson, J. A. (1997b). Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 91, 119-126.
499. Solez, K., Colvin, R. B., Racusen, L. C., Haas, M., Sis, B., Mengel, M., Halloran, P. F., Baldwin, W., Banfi, G., Collins, A. B., *et al.* (2008). Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 8, 753-760.
500. Solez, K., Colvin, R. B., Racusen, L. C., Sis, B., Halloran, P. F., Birk, P. E., Campbell, P. M., Cascalho, M., Collins, A. B., Demetris, A. J., *et al.* (2007). Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 7, 518-526.
501. Soroceanu, L., Akhavan, A., and Cobbs, C. S. (2008). Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature* 455, 391-395.
502. Spada, F. M., Grant, E. P., Peters, P. J., Sugita, M., Melian, A., Leslie, D. S., Lee, H. K., van Donselaar, E., Hanson, D. A., Krensky, A. M., *et al.* (2000). Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med* 191, 937-948.
503. Speir, E., Modali, R., Huang, E. S., Leon, M. B., Shawl, F., Finkel, T., and Epstein, S. E. (1994). Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 265, 391-394.
504. Spencer, C. T., Abate, G., Blazevic, A., and Hofst, D. F. (2008). Only a subset of phosphoantigen-responsive gamma9delta2 T cells mediate protective tuberculosis immunity. *J Immunol* 181, 4471-4484.
505. Spinner, M. L., Saab, G., Casabar, E., Bowman, L. J., Storch, G. A., and Brennan, D. C. (2010). Impact of Prophylactic Versus Preemptive Valganciclovir on Long-Term Renal Allograft Outcomes. *Transplantation*.

506. Stahl, S., Burkhart, J. M., Hinte, F., Tirosh, B., Mohr, H., Zahedi, R. P., Sickmann, A., Ruzsics, Z., Budt, M., and Brune, W. (2013). Cytomegalovirus Downregulates IRE1 to Repress the Unfolded Protein Response. *PLoS Pathog* 9, e1003544.
507. Stark, T. J., Arnold, J. D., Spector, D. H., and Yeo, G. W. (2012). High-resolution profiling and analysis of viral and host small RNAs during human cytomegalovirus infection. *J Virol* 86, 226-235.
508. Stegall, M. D., Diwan, T., Raghavaiah, S., Cornell, L. D., Burns, J., Dean, P. G., Cosio, F. G., Gandhi, M. J., Kremers, W., and Gloor, J. M. (2011). Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients. *Am J Transplant* 11, 2405-2413.
509. Stern-Ginossar, N., Elefant, N., Zimmermann, A., Wolf, D. G., Saleh, N., Biton, M., Horwitz, E., Prokocimer, Z., Prichard, M., Hahn, G., *et al.* (2007). Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* 317, 376-381.
510. Stern, M., Elsasser, H., Honger, G., Steiger, J., Schaub, S., and Hess, C. (2008). The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 8, 1312-1317.
511. Stern, M., Hadaya, K., Honger, G., Martin, P. Y., Steiger, J., Hess, C., and Villard, J. (2011). Telomeric rather than centromeric activating KIR genes protect from cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Am J Transplant* 11, 1302-1307.
512. Streblov, D. N., Kreklywich, C. N., Andoh, T., Moses, A. V., Dumortier, J., Smith, P. P., Defilippis, V., Fruh, K., Nelson, J. A., and Orloff, S. L. (2008). The role of angiogenic and wound repair factors during CMV-accelerated transplant vascular sclerosis in rat cardiac transplants. *Am J Transplant* 8, 277-287.
513. Streblov, D. N., Soderberg-Naucler, C., Vieira, J., Smith, P., Wakabayashi, E., Ruchti, F., Mattison, K., Altschuler, Y., and Nelson, J. A. (1999). The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell* 99, 511-520.
514. Strid, J., Roberts, S. J., Filler, R. B., Lewis, J. M., Kwong, B. Y., Schpero, W., Kaplan, D. H., Hayday, A. C., and Girardi, M. (2008). Acute upregulation of an NKG2D ligand promotes rapid reorganization of a local immune compartment with pleiotropic effects on carcinogenesis. *Nat Immunol* 9, 146-154.
515. Su, C., Jakobsen, I., Gu, X., and Nei, M. (1999). Diversity and evolution of T-cell receptor variable region genes in mammals and birds. *Immunogenetics* 50, 301-308.
516. Sun, J. C., Beilke, J. N., and Lanier, L. L. (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 457, 557-561.
517. Sutton, C. E., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Brereton, C. F., Lavelle, E. C., and Mills, K. H. (2009). Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31, 331-341.
518. Sutton, C. E., Mielke, L. A., and Mills, K. H. (2012). IL-17-producing gammadelta T cells and innate lymphoid cells. *Eur J Immunol* 42, 2221-2231.
519. Suzuki, K., Kumanogoh, A., and Kikutani, H. (2008). Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. *Nat Immunol* 9, 17-23.
520. Suzuki, K., Okuno, T., Yamamoto, M., Pasterkamp, R. J., Takegahara, N., Takamatsu, H., Kitao, T., Takagi, J., Rennert, P. D., Kolodkin, A. L., *et al.* (2007). Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin. *Nature* 446, 680-684.
521. Swamy, M., Jamora, C., Havran, W., and Hayday, A. (2010). Epithelial decision makers: in search of the 'epimmunome'. *Nat Immunol* 11, 656-665.
522. Sylwester, A. W., Mitchell, B. L., Edgar, J. B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P. R., Grabstein, K. H., Hosken, N. A., Kern, F., *et al.* (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 202, 673-685.
523. Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., *et al.* (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3516-3521.
524. Tait, B. D., Susal, C., Gebel, H. M., Nickerson, P. W., Zachary, A. A., Claas, F. H., Reed, E. F., Bray, R. A., Campbell, P., Chapman, J. R., *et al.* (2013). Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and Non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 95, 19-47.
525. Tam, S., King, D. P., and Beaman, B. L. (2001). Increase of gammadelta T lymphocytes in murine lungs occurs during recovery from pulmonary infection by *Nocardia asteroides*. *Infect Immun* 69, 6165-6171.
526. Tanaka, Y., Morita, C. T., Tanaka, Y., Nieves, E., Brenner, M. B., and Bloom, B. R. (1995). Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* 375, 155-158.
527. Tandon, M., Vemula, S. V., and Mittal, S. K. (2011). Emerging strategies for EphA2 receptor targeting for cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets* 15, 31-51.

528. Tedesco, F., Pausa, M., Nardon, E., Introna, M., Mantovani, A., and Dobrina, A. (1997). The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. *J Exp Med* *185*, 1619-1627.
529. Terasaki, P. I., Ozawa, M., and Castro, R. (2007). Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant* *7*, 408-415.
530. Thauinat, O., Field, A. C., Dai, J., Louedec, L., Patey, N., Bloch, M. F., Mandet, C., Belair, M. F., Bruneval, P., Meilhac, O., *et al.* (2005). Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 14723-14728.
531. Thauinat, O., Graff-Dubois, S., Fabien, N., Duthey, A., Attuil-Audenis, V., Nicoletti, A., Patey, N., and Morelon, E. (2012). A stepwise breakdown of B-cell tolerance occurs within renal allografts during chronic rejection. *Kidney Int* *81*, 207-219.
532. Thauinat, O., Kerjaschki, D., and Nicoletti, A. (2006). Is defective lymphatic drainage a trigger for lymphoid neogenesis? *Trends Immunol* *27*, 441-445.
533. Thauinat, O., Morelon, E., and Defrance, T. (2010a). Am<sup>B</sup>-valent: anti-CD20 antibodies unravel the dual role of B cells in immunopathogenesis. *Blood* *116*, 515-521.
534. Thauinat, O., Patey, N., Caligiuri, G., Gautreau, C., Mamani-Matsuda, M., Mekki, Y., Dieu-Nosjean, M. C., Eberl, G., Ecochard, R., Michel, J. B., *et al.* (2010b). Chronic rejection triggers the development of an aggressive intragraft immune response through recapitulation of lymphoid organogenesis. *J Immunol* *185*, 717-728.
535. Thauinat, O., Patey, N., Gautreau, C., Lechaton, S., Fremeaux-Bacchi, V., Dieu-Nosjean, M. C., Cassuto-Viguiet, E., Legendre, C., Delahousse, M., Lang, P., *et al.* (2008). B cell survival in intragraft tertiary lymphoid organs after rituximab therapy. *Transplantation* *85*, 1648-1653.
536. Thundyil, J., Manzanero, S., Pavlovski, D., Cully, T. R., Lok, K. Z., Widiapradja, A., Chunduri, P., Jo, D. G., Naruse, C., Asano, M., *et al.* (2013). Evidence that the EphA2 receptor exacerbates ischemic brain injury. *PLoS One* *8*, e53528.
537. Toulon, A., Breton, L., Taylor, K. R., Tenenhaus, M., Bhavsar, D., Lanigan, C., Rudolph, R., Jameson, J., and Havran, W. L. (2009). A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J Exp Med* *206*, 743-750.
538. Toupance, O., Bouedjoro-Camus, M. C., Carquin, J., Novella, J. L., Lavaud, S., Wynckel, A., Jolly, D., and Chanard, J. (2000). Cytomegalovirus-related disease and risk of acute rejection in renal transplant recipients: a cohort study with case-control analyses. *Transpl Int* *13*, 413-419.
539. Toyoda, M., Ge, S., Suviolahti, E., Pichurin, P., Shin, B., Pao, A., Vo, A., Deer, N., Aguiluz, A., Karasyov, A., and Jordan, S. C. (2012). IFN $\gamma$  production by NK cells from HLA-sensitized patients after in vitro exposure to allo-antigens. *Transpl Immunol* *26*, 107-112.
540. Toyoda, M., Pao, A., Vo, A., Lukovsky, M., Radha, R., Sado, T., Ge, S., Reinsmoen, N., Chai, N. N., Baden, L., *et al.* (2010). Intracellular IFN $\gamma$  production in CD3 negative cells exposed to allo-antigens is an indicator of prior sensitization. *Transpl Immunol* *22*, 121-127.
541. Trinidad, E. M., Ballesteros, M., Zuloaga, J., Zapata, A., and Alonso-Colmenar, L. M. (2009). An impaired transendothelial migration potential of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells can be linked to ephrin-A4 expression. *Blood* *114*, 5081-5090.
542. Tsuda, J., Li, W., Yamanishi, H., Yamamoto, H., Okuda, A., Kubo, S., Ma, Z., Terada, N., Tanaka, Y., and Okamura, H. (2011). Involvement of CD56brightCD11c<sup>+</sup> cells in IL-18-mediated expansion of human gammadelta T cells. *J Immunol* *186*, 2003-2012.
543. Tuddenham, L., and Pfeffer, S. (2011). Roles and regulation of microRNAs in cytomegalovirus infection. *Biochim Biophys Acta* *1809*, 613-622.
544. Turchinovich, G., and Hayday, A. C. (2011). Skint-1 identifies a common molecular mechanism for the development of interferon-gamma-secreting versus interleukin-17-secreting gammadelta T cells. *Immunity* *35*, 59-68.
545. Turner, J. E., Krebs, C., Tittel, A. P., Paust, H. J., Meyer-Schwesinger, C., Bennstein, S. B., Steinmetz, O. M., Prinz, I., Magnus, T., Korn, T., *et al.* (2012). IL-17A production by renal gammadelta T cells promotes kidney injury in crescentic GN. *J Am Soc Nephrol* *23*, 1486-1495.
546. Uehara, S., Chase, C. M., Kitchens, W. H., Rose, H. S., Colvin, R. B., Russell, P. S., and Madsen, J. C. (2005). NK cells can trigger allograft vasculopathy: the role of hybrid resistance in solid organ allografts. *J Immunol* *175*, 3424-3430.
547. Uyemura, K., Deans, R. J., Band, H., Ohmen, J., Panchamoorthy, G., Morita, C. T., Rea, T. H., and Modlin, R. L. (1991). Evidence for clonal selection of gamma/delta T cells in response to a human pathogen. *J Exp Med* *174*, 683-692.
548. Uyemura, K., Klotz, J., Pirmez, C., Ohmen, J., Wang, X. H., Ho, C., Hoffman, W. L., and Modlin, R. L. (1992). Microanatomic clonality of gamma delta T cells in human leishmaniasis lesions. *J Immunol* *148*, 1205-1211.

549. Vaessen, L. M., Ouwehand, A. J., Baan, C. C., Jutte, N. H., Balk, A. H., Claas, F. H., and Weimar, W. (1991). Phenotypic and functional analysis of T cell receptor gamma delta-bearing cells isolated from human heart allografts. *J Immunol* *147*, 846-850.
550. Valenzuela, N. M., Mulder, A., and Reed, E. F. (2013). HLA class I antibodies trigger increased adherence of monocytes to endothelial cells by eliciting an increase in endothelial P-selectin and, depending on subclass, by engaging Fc gamma Rs. *J Immunol* *190*, 6635-6650.
551. van de Berg, P. J., van Stijn, A., Ten Berge, I. J., and van Lier, R. A. (2008). A fingerprint left by cytomegalovirus infection in the human T cell compartment. *J Clin Virol* *41*, 213-217.
552. Van de Walle, I., Waegemans, E., De Medts, J., De Smet, G., De Smedt, M., Snauwaert, S., Vandekerckhove, B., Kerre, T., Leclercq, G., Plum, J., *et al.* (2013). Specific Notch receptor-ligand interactions control human TCR-alpha/beta/gammadelta development by inducing differential Notch signal strength. *J Exp Med* *210*, 683-697.
553. van der Beek, M. T., Berger, S. P., Vossen, A. C., van der Blij-de Brouwer, C. S., Press, R. R., de Fijter, J. W., Claas, E. C., and Kroes, A. C. (2010). Preemptive versus sequential prophylactic-preemptive treatment regimens for cytomegalovirus in renal transplantation: comparison of treatment failure and antiviral resistance. *Transplantation* *89*, 320-326.
554. Van Laethem, F., Sarafova, S. D., Park, J. H., Tai, X., Pobezinsky, L., Guintier, T. I., Adoro, S., Adams, A., Sharrow, S. O., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2007). Deletion of CD4 and CD8 coreceptors permits generation of alpha/beta T cells that recognize antigens independently of the MHC. *Immunity* *27*, 735-750.
555. Van Laethem, F., Tikhonova, A. N., Pobezinsky, L. A., Tai, X., Kimura, M. Y., Le Saout, C., Guintier, T. I., Adams, A., Sharrow, S. O., Bernhardt, G., *et al.* (2013). Lck Availability during Thymic Selection Determines the Recognition Specificity of the T Cell Repertoire. *Cell* *154*, 1326-1341.
556. van Leeuwen, E. M., Gamadia, L. E., Baars, P. A., Remmerswaal, E. B., ten Berge, I. J., and van Lier, R. A. (2002). Proliferation requirements of cytomegalovirus-specific, effector-type human CD8+ T cells. *J Immunol* *169*, 5838-5843.
557. Vantourout, P., and Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* *13*, 88-100.
558. Vavassori, S., Kumar, A., Wan, G. S., Ramanjaneyulu, G. S., Cavallari, M., El Daker, S., Beddoe, T., Theodossis, A., Williams, N. K., Gostick, E., *et al.* (2013). Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human gammadelta T cells. *Nat Immunol*.
559. Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A. M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J. C., and Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* *453*, 106-109.
560. Vermijlen, D., Brouwer, M., Donner, C., Liesnard, C., Tackoen, M., Van Rysselberge, M., Twite, N., Goldman, M., Marchant, A., and Willems, F. (2010). Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. *J Exp Med* *207*, 807-821.
561. Vermijlen, D., Ellis, P., Langford, C., Klein, A., Engel, R., Willmann, K., Jomaa, H., Hayday, A. C., and Eberl, M. (2007). Distinct cytokine-driven responses of activated blood gammadelta T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy. *J Immunol* *178*, 4304-4314.
562. Viey, E., Fromont, G., Escudier, B., Morel, Y., Da Rocha, S., Chouaib, S., and Caignard, A. (2005). Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J Immunol* *174*, 1338-1347.
563. Vihanto, M. M., Plock, J., Erni, D., Frey, B. M., Frey, F. J., and Huynh-Do, U. (2005). Hypoxia up-regulates expression of Eph receptors and ephrins in mouse skin. *Faseb J* *19*, 1689-1691.
564. Vincent, M. S., Roessner, K., Sellati, T., Huston, C. D., Sigal, L. H., Behar, S. M., Radolf, J. D., and Budd, R. C. (1998). Lyme arthritis synovial gamma delta T cells respond to *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and lipidated hexapeptides. *J Immunol* *161*, 5762-5771.
565. Vliegen, I., Duijvestijn, A., Grauls, G., Herngreen, S., Bruggeman, C., and Stassen, F. (2004). Cytomegalovirus infection aggravates atherosclerosis in apoE knockout mice by both local and systemic immune activation. *Microbes Infect* *6*, 17-24.
566. Vongwiwatana, A., Tansarong, A., Rayner, D. C., Melk, A., and Halloran, P. F. (2005). Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: the role of tubular cells in fibrogenesis. *Am J Transplant* *5*, 1367-1374.
567. Waggoner, S. N., Cornberg, M., Selin, L. K., and Welsh, R. M. (2011). Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. *Nature* *481*, 394-398.
568. Waldman, W. J., Knight, D. A., Adams, P. W., Orosz, C. G., and Sedmak, D. D. (1993). In vitro induction of endothelial HLA class II antigen expression by cytomegalovirus-activated CD4+ T cells. *Transplantation* *56*, 1504-1512.

569. Walker, J. K., Scholz, L. M., Scheetz, M. H., Gallon, L. G., Kaufman, D. B., Rachwalski, E. J., Abecassis, M. M., and Leventhal, J. R. (2007). Leukopenia complicates cytomegalovirus prevention after renal transplantation with alemtuzumab induction. *Transplantation* *83*, 874-882.
570. Walsh, R. C., Brailey, P., Girnita, A., Alloway, R. R., Shields, A. R., Wall, G. E., Sadaka, B. H., Cardi, M., Tevar, A., Govil, A., *et al.* (2012). Early and late acute antibody-mediated rejection differ immunologically and in response to proteasome inhibition. *Transplantation* *91*, 1218-1226.
571. Walter, E. A., Greenberg, P. D., Gilbert, M. J., Finch, R. J., Watanabe, K. S., Thomas, E. D., and Riddell, S. R. (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* *333*, 1038-1044.
572. Wang, H., Fang, Z., and Morita, C. T. (2010a). Vgamma2Vdelta2 T Cell Receptor recognition of prenyl pyrophosphates is dependent on all CDRs. *J Immunol* *184*, 6209-6222.
573. Wang, H., Henry, O., Distefano, M. D., Wang, Y. C., Raikkonen, J., Monkkonen, J., Tanaka, Y., and Morita, C. T. (2013). Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human Vgamma2Vdelta2 T cells. *J Immunol* *191*, 1029-1042.
574. Wang, X., Huang, D. Y., Huong, S. M., and Huang, E. S. (2005). Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat Med* *11*, 515-521.
575. Wang, X., Huong, S. M., Chiu, M. L., Raab-Traub, N., and Huang, E. S. (2003). Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* *424*, 456-461.
576. Wang, Y., Nakayama, M., Pitulescu, M. E., Schmidt, T. S., Bochenek, M. L., Sakakibara, A., Adams, S., Davy, A., Deutsch, U., Luthi, U., *et al.* (2010b). Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* *465*, 483-486.
577. Weclawiak, H., Kamar, N., Mengelle, C., Esposito, L., Mohamed, A. O., Laurence, L., David, R., Olivier, C., Marie-Beatrice, N., Cardeau-Desangles, I., *et al.* (2010). Pre-emptive intravenous ganciclovir versus valganciclovir prophylaxis for de novo cytomegalovirus-seropositive kidney-transplant recipients. *Transpl Int*.
578. Weller, T. H. (1971a). The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. I. *N Engl J Med* *285*, 203-214.
579. Weller, T. H. (1971b). The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. II. *N Engl J Med* *285*, 267-274.
580. Wells, F. B., Gahm, S. J., Hedrick, S. M., Bluestone, J. A., Dent, A., and Matis, L. A. (1991). Requirement for positive selection of gamma delta receptor-bearing T cells. *Science* *253*, 903-905.
581. Welsh, R. M., Brubaker, J. O., Vargas-Cortes, M., and O'Donnell, C. L. (1991). Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function. *J Exp Med* *173*, 1053-1063.
582. Wen, L., Pao, W., Wong, F. S., Peng, Q., Craft, J., Zheng, B., Kelsoe, G., Dianda, L., Owen, M. J., and Hayday, A. C. (1996). Germinal center formation, immunoglobulin class switching, and autoantibody production driven by "non alpha/beta" T cells. *J Exp Med* *183*, 2271-2282.
583. Wiebe, C., Gibson, I. W., Blydt-Hansen, T. D., Karpinski, M., Ho, J., Storsley, L. J., Goldberg, A., Birk, P. E., Rush, D. N., and Nickerson, P. W. (2012). Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant* *12*, 1157-1167.
584. Willcox, C. R., Pitard, V., Netzer, S., Couzi, L., Salim, M., Silberzahn, T., Moreau, J. F., Hayday, A. C., Willcox, B. E., and Dechanet-Merville, J. (2012). Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat Immunol* *13*, 872-879.
585. Willicombe, M., Brookes, P., Sergeant, R., Santos-Nunez, E., Steggar, C., Galliford, J., McLean, A., Cook, T. H., Cairns, T., Roufousse, C., and Taube, D. (2012). De novo DQ donor-specific antibodies are associated with a significant risk of antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Transplantation* *94*, 172-177.
586. Wingren, C., Crowley, M. P., Degano, M., Chien, Y., and Wilson, I. A. (2000). Crystal structure of a gammadelta T cell receptor ligand T22: a truncated MHC-like fold. *Science* *287*, 310-314.
587. Witherden, D. A., Verdino, P., Rieder, S. E., Garijo, O., Mills, R. E., Teyton, L., Fischer, W. H., Wilson, I. A., and Havran, W. L. (2010). The junctional adhesion molecule JAML is a costimulatory receptor for epithelial gammadelta T cell activation. *Science* *329*, 1205-1210.
588. Witherden, D. A., Watanabe, M., Garijo, O., Rieder, S. E., Sarkisyan, G., Cronin, S. J., Verdino, P., Wilson, I. A., Kumanogoh, A., Kikutani, H., *et al.* (2012). The CD100 receptor interacts with its plexin B2 ligand to regulate epidermal gammadelta T cell function. *Immunity* *37*, 314-325.
589. Witzke, O., Hauser, I. A., Bartels, M., Wolf, G., Wolters, H., and Nitschke, M. (2011). Valganciclovir Prophylaxis Versus Preemptive Therapy in Cytomegalovirus-Positive Renal Allograft Recipients: 1-Year Results of a Randomized Clinical Trial. *Transplantation* *93*, 61-68.
590. Witzke, O. a. t. V. S. G. (2011). CMV Valganciclovir Prophylaxis Versus Preemptive Therapy after Renal Transplantation : Two Year Results of a Randomized Clinical Trial. ATC Philadelphia 2011 *Abstract # LB05*.

591. Wohlfahrt, J. G., Karagiannidis, C., Kunzmann, S., Epstein, M. M., Kempf, W., Blaser, K., and Schmidt-Weber, C. B. (2004). Ephrin-A1 suppresses Th2 cell activation and provides a regulatory link to lung epithelial cells. *J Immunol* *172*, 843-850.
592. Wolfe, S. A., Latoni, J. D., and Tessier, P. L. (1999). Special report: lengthening the nose: thoughts on correction with a reexamination of some basic principles. *J Craniomaxillofac Trauma* *5*, 33-37.
593. Wootla, B., Nicoletti, A., Patey, N., Dimitrov, J. D., Legendre, C., Christophe, O. D., Friboulet, A., Kaveri, S. V., Lacroix-Desmazes, S., and Thauinat, O. (2008). Hydrolysis of coagulation factors by circulating IgG is associated with a reduced risk for chronic allograft nephropathy in renal transplanted patients. *J Immunol* *180*, 8455-8460.
594. Workalemahu, G., Foerster, M., Kroegel, C., and Braun, R. K. (2003). Human gamma delta-T lymphocytes express and synthesize connective tissue growth factor: effect of IL-15 and TGF-beta 1 and comparison with alpha beta-T lymphocytes. *J Immunol* *170*, 153-157.
595. Worthington, J. E., Martin, S., Al-Husseini, D. M., Dyer, P. A., and Johnson, R. W. (2003). Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* *75*, 1034-1040.
596. Wu, H., Wang, Y. M., Wang, Y., Hu, M., Zhang, G. Y., Knight, J. F., Harris, D. C., and Alexander, S. I. (2007). Depletion of gammadelta T cells exacerbates murine adriamycin nephropathy. *J Am Soc Nephrol* *18*, 1180-1189.
597. Wu, Y., Wu, W., Wong, W. M., Ward, E., Thrasher, A. J., Goldblatt, D., Osman, M., Digard, P., Canaday, D. H., and Gustafsson, K. (2009). Human gamma delta T cells: a lymphoid lineage cell capable of professional phagocytosis. *J Immunol* *183*, 5622-5629.
598. Xu, B., Pizarro, J. C., Holmes, M. A., McBeth, C., Groh, V., Spies, T., and Strong, R. K. (2011). Crystal structure of a gammadelta T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 2414-2419.
599. Xu, H., Zhang, X., Mannon, R. B., and Kirk, A. D. (2006). Platelet-derived or soluble CD154 induces vascularized allograft rejection independent of cell-bound CD154. *J Clin Invest* *116*, 769-774.
600. Yamakuchi, M., Kirkiles-Smith, N. C., Ferlito, M., Cameron, S. J., Bao, C., Fox-Talbot, K., Wasowska, B. A., Baldwin, W. M., 3rd, Pober, J. S., and Lowenstein, C. J. (2007). Antibody to human leukocyte antigen triggers endothelial exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 1301-1306.
601. Zafar, S. Y., Howell, D. N., and Gockerman, J. P. (2008). Malignancy after solid organ transplantation: an overview. *Oncologist* *13*, 769-778.
602. Zaph, C., Troy, A. E., Taylor, B. C., Berman-Booty, L. D., Guild, K. J., Du, Y., Yost, E. A., Gruber, A. D., May, M. J., Greten, F. R., *et al.* (2007). Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature* *446*, 552-556.
603. Zarkhin, V., Kambham, N., Li, L., Kwok, S., Hsieh, S. C., Salvatierra, O., and Sarwal, M. M. (2008). Characterization of intra-graft B cells during renal allograft rejection. *Kidney Int* *74*, 664-673.
604. Zeng, X., Wei, Y. L., Huang, J., Newell, E. W., Yu, H., Kidd, B. A., Kuhns, M. S., Waters, R. W., Davis, M. M., Weaver, C. T., and Chien, Y. H. (2012). gammadelta T cells recognize a microbial encoded B cell antigen to initiate a rapid antigen-specific interleukin-17 response. *Immunity* *37*, 524-534.
605. Zhang, G., Njauw, C. N., Park, J. M., Naruse, C., Asano, M., and Tsao, H. (2008). EphA2 is an essential mediator of UV radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* *68*, 1691-1696.
606. Zhang, L., Jin, N., Nakayama, M., O'Brien, R. L., Eisenbarth, G. S., and Born, W. K. (2010a). Gamma delta T cell receptors confer autonomous responsiveness to the insulin-peptide B:9-23. *J Autoimmun* *34*, 478-484.
607. Zhang, X., Rozengurt, E., and Reed, E. F. (2010b). HLA class I molecules partner with integrin beta4 to stimulate endothelial cell proliferation and migration. *Sci Signal* *3*, ra85.
608. Zhou, Y. F., Leon, M. B., Waclawiw, M. A., Popma, J. J., Yu, Z. X., Finkel, T., and Epstein, S. E. (1996). Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N Engl J Med* *335*, 624-630.
609. Ziegler, M. E., Jin, Y. P., Young, S. H., Rozengurt, E., and Reed, E. F. (2012). HLA class I-mediated stress fiber formation requires ERK1/2 activation in the absence of an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> in human aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* *303*, C872-882.
610. Zocchi, M. R., Ferrarini, M., Migone, N., and Casorati, G. (1994). T-cell receptor V delta gene usage by tumour reactive gamma delta T lymphocytes infiltrating human lung cancer. *Immunology* *81*, 234-239.

# IV. RESULTATS

---

## RESULTATS

- A. Article I : Effect of a CMV infection on the subsequent Banff phenotype. Highlighting the CMV-induced transplant vascular sclerosis in kidney allograft.
- B. Article II : Kidney intragraft Donor-Specific Antibodies as determinant of antibody-mediated lesions and poor graft outcome.
- C. Article III : Cytomegalovirus-responsive  $\gamma\delta$  T cells: A novel cell effector in antibody-mediated microcirculation lesions.
- D. Article IV : Cytomegalovirus and Tumor stress surveillance by human V $\delta$ 1  $\gamma\delta$ -TCR binding to Ephrin Receptor A2.
- E. Article V : Engagement of ephrins A1 and A4 on lymphocytes modulates T cell activation.

PS : Les manuscrits correspondant aux articles 1, 4, 5 sont des synthèses des résultats qui mériteront, comme vous allez le voir, outre un passage à l'anglais, un certain nombre de retouches et approfondissements avant une future soumission.

**ARTICLE I : Effect of a CMV infection on the subsequent Banff phenotype. Highlighting the CMV-induced transplant vascular sclerosis in kidney allograft.**

Accepté en **communication orale à l'European Society for Organ Transplantation** (Vienne 2013) : *Can Cytomegalovirus induce Transplant Vascular Sclerosis in Renal Allograft?*

Dans ce premier article, nous avons cherché à évaluer l'impact d'une infection à CMV sur l'histologie de l'allogreffe rénale. Nous avons profité d'un travail réalisé dans le cadre d'un Master Recherche (Anna Bouielh. Etude de l'expression au niveau du greffon rénal des ligands de lymphocytes T  $\gamma\delta$  doubles réactifs anti-CMV et anti-tumoral : EPCR et EphA2) pour reprendre une cohorte de 87 patients pour lesquels nous disposions d'une gradation histologique selon la dernière classification internationale.

La question posée était celle de l'impact d'une infection à CMV survenue avant la réalisation de biopsies rénales, sur le phénotype histologique tel qu'il est rapporté par la classification de Banff. Au regard des données de la littérature, l'hypothèse était celle d'une association entre le CMV et des lésions de rejet, de fibrose interstitielle et atrophie tubulaire (FIAT) ou de lésions vasculaires.

Dans cette cohorte de biopsies pratiquées sur indication (ce qui restreint l'angle d'attaque et les possibilités d'extrapolation par rapport à un design d'étude basé sur des biopsies protocolaires), nous trouvons une surreprésentation des lésions d'épaississement fibreux de l'intima (score cv), mais aucune différence sur la survenue des lésions de rejet à médiation cellulaire ou humorale, ni sur les lésions de FIAT. En ciblant les patients ayant reçu un greffon provenant d'un donneur âgé de moins de 60 ans (donc avec un risque diminué de la présence de lésions d'artériosclérose antérieures à la transplantation), nous montrons que seuls persistent l'âge du donneur et l'infection à CMV comme facteurs associés à ces lésions d'artériosclérose  $cv > 0$ . Ensembles, ces données suggèrent que les lésions d'artériosclérose, telles que reprises dans la classification Banff au travers du score cv, pourraient représenter au niveau rénal, la signature histologique de la sclérose vasculaire du transplant associée au CMV, rapportée dans plusieurs modèles expérimentaux et en transplantation cardiaque (coronaropathie du greffon).

## **Effect of a CMV infection on the subsequent Banff phenotype. Highlighting the CMV-induced transplant vascular sclerosis in kidney allograft**

Anna Bouielh<sup>1,2</sup>, Sebastien Lepreux<sup>1,2</sup>, Romain Marlin<sup>2,3</sup>, Lionel Couzi<sup>1,2</sup>, Julie Déchanet-Merville<sup>2,3</sup>, Pierre Merville<sup>1,2,3</sup>, Thomas Bachelet<sup>1,2,3</sup>.

1. CHU Bordeaux,
2. Université Bordeaux Segalen,
3. UMR-CNRS 5164,

### **INTRODUCTION**

Cytomegalovirus (CMV) is the most common opportunistic pathogen in solid organ transplant recipients and CMV infection still represents a major issue in this population. In addition to CMV disease that significantly increases morbidity and mortality in immunocompromised patients, CMV, *via* its indirect effects, is responsible for long-term threatening on allograft survival (1-4) : by increasing the rate of acute rejection episodes and promoting the development of chronic allograft injury. Nonetheless, on the one hand prevention strategies have refined the phenotype of CMV infection (less frequent, less severe and later occurrence if a prophylaxis is used), on the other hand, the generalization of Banff scoring system in clinical practice has enabled to homogenize the pathological analysis of kidney allograft (5). Historical reports of association between CMV infection and graft deterioration may thus be presently inaccurate. This is peculiarly relevant in the setting of kidney transplantation where the association of (i) CMV and acute rejection is still based on old studies of matched cohorts (6-11), or on the decrease of rejection occurrence when prophylaxis (especially valgancyclovir) is applied (12, 13), (ii) the whole picture of chronic allograft injury has been recently requalified and no stereotyped chronic histological damage has been formally attached to CMV infection on the opposite to other solid organ transplants (liver and vanishing bile duct syndrome (14, 15), heart and cardiac allograft vasculopathy (16-19), lungs and bronchiolitis obliterans syndrome (20, 21)). During the same time, experimental data have opened new ways to rethink the potential link between CMV and histological graft damage 1. By triggering an endothelial cell activation (22-27), CMV may promote (i) an angiogenic response and vascular changes (ii) recruitment of immune cells and stimulation of an allogenic response ; 2. By triggering alloantibodies synthesis (28-31) and tertiary lymphoid organs structures formation (32), CMV may promote antibody mediated lesions (microcirculation lesions and transplant glomerulopathy); 3. By triggering the secretion of profibrotic factors (TGF $\beta$ ) (33-35) directly into the graft, CMV may promote progressive interstitial fibrosis (IF) and tubular atrophy (TA) of the parenchyma.

The aim of the present work was thus to question the effect of a previous CMV infection on the subsequent pathological phenotype of renal allograft, according to the Banff classification. To that end, we retrospectively studied 87 kidney transplant recipients who underwent a graft biopsy for cause.

## **MATERIAL AND METHOD**

### **Patients**

This is a monocenter retrospective study of 87 kidney transplant recipients (KTR) who underwent needle core graft biopsy for cause (generally for unexplained increase in serum creatinine, proteinuria or circulating DSA) between May 2006 and January 2012. KTR were recruited for the purpose of another work which aimed at identifying the intragraft putative ligands of CMV responsive  $\gamma\delta$  T cells (not published), ruling out massive selection bias. The available data on demographics and graft conditions the day of the transplantation, immunosuppressive regimens, HLA donor specific sensitization, patients clinical and biological graft parameters (graft function was estimated by calculating eGFR using the MDRD formula (36)) for the day of the biopsy. The study was approved by the institutional review board and did not interfere with standard patient clinical management.

### **Histopathology**

Graft cortical biopsies were performed with a 16-gauge biopsy needle guided by ultrasound. Each biopsy was examined by light microscopy, as follows: the biopsy core was fixed, embedded in paraffin, sectioned at 2  $\mu$ m and stained with Masson's trichrome, hematoxylin-eosin and periodic acid Schiff. Histological analyses were performed by one pathologist (S.L.) and graded according to the updated semi-quantitative Banff classification, including the concept of suspicious ABMR (37). A second biopsy sample was collected and frozen sections were stained with anti-IgA, -IgG, -IgM, -C3 (Binding Site, Birmingham, UK) and -C4d (Quidel, San Diego, CA) antibodies. Samples with C4d staining at more than 50% of peritubular capillaries were considered as positive for C4d deposition. Neither implantation nor very early protocol biopsies were available according to the center practices.

### **Anti-HLA antibody testing**

Anti-HLA class I and II antibodies were detected and identified in the serum, with the LabScreen LS1A04 and LS2A01 single antigen flow bead (SAFB) assay (One Lambda Inc, Canoga Park, CA) on a Luminex 100<sup>®</sup> analyzer (Luminex, Austin, TX), according to the manufacturer's recommendations, using SAFB lots 6 and 8, respectively. Donor HLA typing (class I HLA-A, -B, -Cw and class II HLA-DR, -DR51/52/53, -DQ and -DP) was performed on cell aliquots stored frozen at the time of the transplant by using the high resolution reverse SSO-PCR assay (LabType, One Lambda Inc). The

positivity thresholds were set at a normalized MFI $\geq$ 500 using the baseline calculation mode (HLA Fusion software, One Lambda Inc).

### **CMV definitions and management**

CMV manifestations were defined, based on standardized criteria, as CMV infection (detection of at least one CMV DNAemia, which is defined by a positive CMV quantitative nucleic acid amplification testing (CMV-QNAT) and performed as described previously (38)) or CMV disease (39).

CMV prevention strategy (Prophylaxis or preemptive strategy) changed over time in our centre. When given, prophylaxis last only 3 months. All of the patients transplanted were monitored for CMV using a CMV-QNAT, once a week for the first 3 months, then once a month between months 3 and 6, and finally every two months up until one year, and then in front of clinical suspicion of CMV disease (fever and hospitalization). Intravenous (IV) ganciclovir (5 mg/kg b.i.d.) or oral valganciclovir (900 mg b.i.d.) treatments were initiated when the CMV-QNAT result reached 2000 copies/mL. IV ganciclovir was administered for 2–3 weeks and was always followed by valganciclovir treatment. The anti-CMV treatment was stopped after two consecutive negative CMV-QNAT results.

### **Statistical analysis**

Analyses were performed using conventional statistical methods. The Mac Nemar  $\chi^2$  test was used for qualitative variables; the Student's *t* test and the Mann–Whitney U test were used when appropriate. The variables potentially associated with the occurrence of cv lesions were subjected to univariate analysis. Risk factors with a *p*-value <0.05 in univariate analysis were included in a multivariable model. Analyses were performed with JMP 10 IN software (2012, SAS Institute Inc. Cary, NC).

## **RESULTS**

### **Patients**

Among the 87 KTR included in the study, 32 (37%) displayed a CMV infection before the biopsy at a mean time of 13.9 $\pm$ 34.7 months but with a median at 2.2 months [0.6-184] and 27 (85%) patients were diagnosed during the first year after transplantation. The baseline demographic and clinical characteristics at the time of transplant and biopsy are summarized in Table 1. KTR who experienced a CMV infection were transplanted in a higher viral risk CMV serostatus (donor seropositive/ recipient seronegative), were older and received a graft from older donors than KTR who remained free of CMV infection. Graft function at biopsy and graft outcome were not different between patients who experienced a CMV infection and patients who did not.

### **Histological lesions according to Banff classification**

Biopsy was performed for cause after a mean time of  $2.4 \pm 3.6$  years after transplantation and  $11.7 \pm 20$  months after CMV infection for CMV infected patients. Banff lesions were gathered in clusters as previously reported (40) : 44 (50%) with tubulointerstitial (TI) lesions ( $t+i>0$ ) but only 20 (23%) with complete acute cellular mediated rejection (ACMR), 23 (26%) with antibody mediated lesions (AML,  $ptc+g+cg>0$ ) including 6 (7%) with microcirculation inflammation ( $ptc+g>0$ ) but only five (6%) with complete C4d+DSA+ antibody mediated rejection, 77 (88%) with interstitial scarring lesions ( $ci+ct>0$  lesions, including 32 (37%) with  $ci+ct>2$ ), 47 (54%) with fibrous intimal thickening lesions ( $cv>0$  lesions) and 35 (40%) with hyaline arteriolar thickening lesions ( $ah>0$ ). Eighteen (21%) patients exhibited a DSA at the time of biopsy, including 5 (7%) de novo DSA (Figure 1).

### **Histological features of biopsies with a previous CMV infection**

Occurrence of ACMR,  $t+i>0$ ,  $ptc+g>0$ , AML ( $ptc+g+cg>0$ ), IFTA ( $ci+ct>2$ ) and  $ah>0$  lesions were not different between CMV-infected or CMV-free KTR : respectively 8 (25%) vs 12 (22%),  $p=0.7$  for ACMR, 20 (62%) vs 24 (44%),  $p=0.1$  for  $t+i>0$  lesions ; 1 (3%) vs 5 (9%),  $p=0.3$  for  $ptc+g>0$  lesions, 7 (22%) vs 16 (29%),  $p=0.5$  for AML, 12(38%) vs 20(37%),  $p=0.9$  for IFTA and 9 (36%) vs 26 (48%),  $p=0.8$  for  $ah>0$  lesions. Conversely,  $cv>0$  lesions were overrepresented in CMV-infected patients in comparison to CMV-free patients : 22 (69%) vs 25 (45%),  $p=0.03$ , respectively (Table 1). However, this result has to be tempered by the older age of the CMV-infected patients and their respective donor, which has been reported to be strongly associated with fibrous intimal thickening. In addition, no implantation biopsy, which could have testified of the presence of  $cv>0$  lesions before of the transplantation, was available according to the center practices.

To overcome this confusing factor, we focused on KTR with a donor age inferior to 60 years old, starting from the fact that young donor were less likely to present  $cv>0$  lesions. In this subpopulation (N=56), donor and recipient ages were not significantly different between CMV infected (N=18) and CMV-free (N=38) KTR (Table 5). Nevertheless, a CMV infection before the biopsy was still associated with  $cv>0$  lesions : 13 (72%) vs 14 (39%),  $p=0.01$  for CMV infected and CMV-free KTR, respectively (Figure 2A). We also ruled out the impact of CMV donor status on  $cv$  scoring (Figure 2B), suggesting that  $cv>0$  lesions are not dependent of a subclinical persistence of intra-graft CMV. Finally, only  $cv>0$  lesions were found to be associated with a CMV infection prior the biopsy, whereas no overrepresentation of acute rejection nor AML or IFTA lesions was found (Table 2).

### **Factors associated with arteriosclerosis in KTR with a donor age <60 years old**

Previously reported risk factors susceptible to be associated with  $cv>0$  lesions (donor and recipient age, expanded criteria donor, ischemia time, blood pressure and DSA) were collected and depicted in Table 3 for KTR with a donor age <60 years old, exhibiting  $cv>0$  or not. Using univariate analysis of  $cv>0$  lesions occurrence, we observed that age of the recipient (OR=1.7 per decade,  $p=0.01$ ), age of

the donor (OR=2.0 per decade,  $p=0.002$ ) and CMV infection (OR=4.4,  $p=0.01$ ) were associated with increased risk of  $cv>0$  lesions. Using multivariate analysis, we found that the parameters independently associated with  $cv>0$  lesions were age of donor (OR=1.9 per decade,  $p=0.03$ ) and CMV infection (OR=4.2,  $p=0.03$ ).

## DISCUSSION

CMV infection and low level inflammation have been shown to interact to yield significant impact on all cause and cardiovascular disease related mortality in the general population (41). Solid organ transplantation implies a continuous allogenic stimulation, which may decouple this deleterious effect. Vascular damages could be the cornerstone of CMV pathogeny (42, 43). Here, we report for the first time an association between CMV infection prior renal biopsy and arteriosclerosis in a cohort of KTR who underwent a biopsy for cause, suggesting that  $cv>0$  lesions could be one of the pictures of CMV induced transplant vascular sclerosis in renal allograft. On the opposite, we did not confirm any association with acute rejection (neither cellular nor humoral) and with IFTA lesions in our study, suggesting that the histologic signature of CMV may have evolved at the modern era of CMV diagnosis and management.

In KTR, CMV infection impacts graft survival (1, 2) and the slope of kidney damage (3). Even a slight or late CMV DNAemia is associated with chronic allograft injury (44). Failing kidney transplants are enriched in CMV DNAemia with intra renal expression levels associated with graft survival (45).

As previously suggested, our first hypothesis was that CMV infection triggers fibrogenesis. CMV DNAemia has been associated with precocious IFTA lesions in a study including 118 KTR with protocol biopsies at three months (46). Supporting this data, CMV infected renal tubular epithelial cells can undergo epithelial to mesenchymal transition after exposure to TGF-beta1, similar to uninfected renal epithelial cells, moreover CMV infection may potentiate renal fibrosis by inducing active TGF-beta1 (33, 34). However, distribution of IFTA lesions was not different between CMV-infected or CMV-free patients. One can argue that IFTA lesions are not specific and that our biopsies were performed for cause, explaining the high percentage of chronic allograft damage within the graft and the impossibility to discriminate CMV-induced pathological IFTA lesions.

Moreover, we did not find any association with direct alloimmune mediated lesions. This result is concordant with the studies of the last ten years which did not find this connection between CMV infection and acute rejection anymore. In addition, CMV specific immune response also mobilizes a great number of CD8+ T cells from the memory pool, but these cells do not seem to have allogenic

crossreactivity properties (47). One can postulate that current CMV management strategies prevent massive CMV infection which would have boosted the alloimmune response.

Nevertheless, our pioneer study showed that the occurrence of a CMV infection before performing a renal allograft biopsy for cause, is associated with fibrous vascular thickening (cv>0 lesions) in nearly 70% of KTR, even if CMV infection occurred long before the biopsy. Arteriosclerosis has been recognized as a major histological sign of vascular aging, which could have been accelerated through a lifelong succession of disparate vascular assaults. Alternatively, arteriosclerosis on implantation biopsies is often considered as the graft burden of a former history of cardiovascular disease. To overcome these bias, we focused on young donors, choosing the age threshold (60 years old) given in the definition of expanded criteria donor (48). In this derivative cohort, donor and recipient age was not different between CMV-infected and CMV-free KTR. Independent risk factors associated with occurrence of cv>0 lesions were only age of the donor (OR=1.9 per decade, p=0.03) and CMV infection (OR=4.2, p=0.03). DSA has recently been shown to dramatically accelerate post-transplant progression of arteriosclerosis. We did not confirm in this study this impact of DSA (49), probably in relation with the small size of our cohort (18 KTR DSA+ with only 4 out of the 32 with CMV infection).

Arteriosclerosis and fibrous intimal thickening is a chronic proliferative response to injury of the endothelial interface of the middle size vasculature. No such association were seen with chronic arteriopathy (ah>0 lesions). This pathological response has been found in other setting (50) and is one the main features of chronic allograft damage. The first studies assessing the association between CMV infection and chronic allograft damage were conducted in heart transplantation. In 1989, Grattan et al reported that the rate of rejection episodes, cardiac allograft vasculopathy (CAV) diagnosed as coronar thickening by angiography, and graft loss were significantly higher in the CMV-infected group compared to CMV-naïve patients (16). Since then, numerous studies have provided strong evidence for an accelerating role of CMV persisting viremia in CAV in heart transplant recipients (18, 51). The concept of CMV-induced transplant vascular sclerosis (TVS) has thus emerged and represents an interesting physiopathological entity since it seems to be a major but improvable cause for accelerated graft deterioration. These clinical findings were enriched by results from animal models, where CMV antigen expression was found in the endothelium of capillaries, arterioles and smooth muscle cells of large arteries in CMV-infected rat renal allografts with increased chronic rejection (52). Other experimental models have demonstrated the importance of CMV interaction with the endothelial interface through (i) the induction of an angiogenic response (24, 25), (ii) the amplification of the alloimmune response : CMV secretome (27) triggers vascular changes susceptible to lead to dysregulation of functional endothelial properties (such as NO synthase (53)).

In kidney transplantation, the CMV induced TVS and its translation in Banff score have not been reported until now. Helanterä and colleagues underlined the potential role of CMV in vascular changes through the analysis of biopsy specimens coming from 52 kidney transplant recipients with or without recent history of CMV disease. They described that persistent CMV DNA detected *in situ* in the graft in 6-month protocol biopsies, even without detectable viremia, was associated with poor outcome and increased arteriosclerotic changes, especially vascular intimal thickening, in comparison with CMV-negative sample (34, 54, 55). This is concordant with the hypothesis of chronic local CMV infection of endothelial cells with transient reactivation as a trigger of proliferative response. However, this association was only found in kidney transplant recipients who had experienced an acute rejection.

Finally, the major limit of the study is its retrospective design and the inclusion of a small sample of selected KTR. Despite this restraint, we register difference in Banff's items representation. The fact that our biopsies were performed for cause implies that we did not catch the natural history of CMV-induced lesions. Contrariwise, we directly observed the impact of CMV on biopsies with histological damages which directed the biopsy indication.

In conclusion, our data suggest that in KTR with a biopsy for cause, (i) IFTA lesions and rejection according to Banff's classification were not influenced by a CMV infection before the graft, (ii) the well-described CMV induced TVS could be apprehended with the cv Banff score. We present a proof of concept that CMV can also trigger specific kidney chronic allograft damage, in relation to endothelial injury and angiogenic proliferative response. Taken together, our data suggest that persistent CMV should be considered as an important partner of chronic allograft injury, accessible to a specific treatment. Prospective studies are thus mandatory to confirm this CMV induced TVS and assess its reversibility.

## Figures Legends

**Figure 1.** Distribution of the lesions according to Banff's classification.

**Figure 2.** Distribution of the  $cv>0$  lesions according to a CMV infection before the biopsy (A) and the serostatus of the donor (B). Data are presented as mean, with analysis by the Mac Nemar  $\chi^2$

## REFERENCES

1. Sagedal S, Hartmann A, Nordal KP, et al. Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int* 2004; 66 (1): 329.
2. Humar A, Gillingham KJ, Payne WD, Dunn DL, Sutherland DE, Matas AJ. Association between cytomegalovirus disease and chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68 (12): 1879.
3. Kliem V, Fricke L, Wollbrink T, Burg M, Radermacher J, Rohde F. Improvement in long-term renal graft survival due to CMV prophylaxis with oral ganciclovir: results of a randomized clinical trial. *Am J Transplant* 2008; 8 (5): 975.
4. Manuel O, Kralidis G, Mueller NJ, et al. Impact of Antiviral Preventive Strategies on the Incidence and Outcomes of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients. *Am J Transplant* 2013.
5. Mengel M, Sis B, Haas M, et al. Banff 2011 Meeting Report: New Concepts in Antibody-Mediated Rejection. *Am J Transplant* 2012; 12 (3): 563.
6. Pouteil-Noble C, Ecochard R, Landrison G, et al. Cytomegalovirus infection--an etiological factor for rejection? A prospective study in 242 renal transplant patients. *Transplantation* 1993; 55 (4): 851.
7. Reinke P, Fietze E, Ode-Hakim S, et al. Late-acute renal allograft rejection and symptomless cytomegalovirus infection. *Lancet* 1994; 344 (8939-8940): 1737.
8. Toupance O, Bouedjoro-Camus MC, Carquin J, et al. Cytomegalovirus-related disease and risk of acute rejection in renal transplant recipients: a cohort study with case-control analyses. *Transpl Int* 2000; 13 (6): 413.
9. Dickenmann MJ, Cathomas G, Steiger J, Mihatsch MJ, Thiel G, Tamm M. Cytomegalovirus infection and graft rejection in renal transplantation. *Transplantation* 2001; 71 (6): 764.
10. Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, et al. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2002; 2 (9): 850.
11. Nett PC, Heisey DM, Fernandez LA, Sollinger HW, Pirsch JD. Association of cytomegalovirus disease and acute rejection with graft loss in kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78 (7): 1036.
12. Lowance D, Neumayer HH, Legendre CM, et al. Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. International Valacyclovir Cytomegalovirus Prophylaxis Transplantation Study Group. *N Engl J Med* 1999; 340 (19): 1462.
13. Reischig T, Jindra P, Hes O, Svecova M, Klaboch J, Treska V. Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8 (1): 69.
14. O'Grady JG, Alexander GJ, Sutherland S, et al. Cytomegalovirus infection and donor/recipient HLA antigens: interdependent co-factors in pathogenesis of vanishing bile-duct syndrome after liver transplantation. *Lancet* 1988; 2 (8606): 302.
15. Evans PC, Soim A, Wreghitt TG, Taylor CJ, Wight DG, Alexander GJ. An association between cytomegalovirus infection and chronic rejection after liver transplantation. *Transplantation* 2000; 69 (1): 30.
16. Grattan MT, Moreno-Cabral CE, Starnes VA, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE. Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *Jama* 1989; 261 (24): 3561.
17. Loebe M, Schuler S, Zais O, Warnecke H, Fleck E, Hetzer R. Role of cytomegalovirus infection in the development of coronary artery disease in the transplanted heart. *J Heart Transplant* 1990; 9 (6): 707.
18. Koskinen PK, Kallio EA, Tikkanen JM, Sihvola RK, Hayry PJ, Lemstrom KB. Cytomegalovirus infection and cardiac allograft vasculopathy. *Transpl Infect Dis* 1999; 1 (2): 115.
19. Petrakopoulou P, Kubrich M, Pehlivanli S, et al. Cytomegalovirus infection in heart transplant recipients is associated with impaired endothelial function. *Circulation* 2004; 110 (11 Suppl 1): II207.

20. Keenan RJ, Lega ME, Dummer JS, et al. Cytomegalovirus serologic status and postoperative infection correlated with risk of developing chronic rejection after pulmonary transplantation. *Transplantation* 1991; 51 (2): 433.
21. Paraskeva M, Bailey M, Levvey BJ, et al. Cytomegalovirus replication within the lung allograft is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant* 2011; 11 (10): 2190.
22. Speir E, Modali R, Huang ES, et al. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 1994; 265 (5170): 391.
23. Zhou YF, Leon MB, Waclawiw MA, et al. Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N Engl J Med* 1996; 335 (9): 624.
24. Streblow DN, Soderberg-Naucler C, Vieira J, et al. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell* 1999; 99 (5): 511.
25. Bentz GL, Yurochko AD. Human CMV infection of endothelial cells induces an angiogenic response through viral binding to EGF receptor and beta1 and beta3 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105 (14): 5531.
26. Caposio P, Orloff SL, Streblow DN. The role of cytomegalovirus in angiogenesis. *Virus Res* 2011; 157 (2): 204.
27. Botto S, Streblow DN, DeFilippis V, et al. IL-6 in human cytomegalovirus secretome promotes angiogenesis and survival of endothelial cells through the stimulation of survivin. *Blood* 2011; 117 (1): 352.
28. Toyoda M, Petrosian A, Jordan SC. Immunological characterization of anti-endothelial cell antibodies induced by cytomegalovirus infection. *Transplantation* 1999; 68 (9): 1311.
29. Costa C, Touscoz GA, Bergallo M, et al. Non-organ-specific and anti-endothelial antibodies in relation to CMV infection and acute rejection in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2010; 24 (4): 488.
30. Varani S, Muratori L, De Ruvo N, et al. Autoantibody appearance in cytomegalovirus-infected liver transplant recipients: correlation with antigenemia. *J Med Virol* 2002; 66 (1): 56.
31. Locke JE, Zachary AA, Warren DS, et al. Proinflammatory events are associated with significant increases in breadth and strength of HLA-specific antibody. *Am J Transplant* 2009; 9 (9): 2136.
32. Orloff SL, Hwee YK, Kreklywich C, et al. Cytomegalovirus latency promotes cardiac lymphoid neogenesis and accelerated allograft rejection in CMV naive recipients. *Am J Transplant* 2011; 11 (1): 45.
33. Shimamura M, Murphy-Ullrich JE, Britt WJ. Human cytomegalovirus induces TGF-beta1 activation in renal tubular epithelial cells after epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS Pathog* 2010; 6 (11): e1001170.
34. Helantera I, Loginov R, Koskinen P, Tornroth T, Gronhagen-Riska C, Lautenschlager I. Persistent cytomegalovirus infection is associated with increased expression of TGF-beta1, PDGF-AA and ICAM-1 and arterial intimal thickening in kidney allografts. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20 (4): 790.
35. Reischig T, Hribova P, Jindra P, et al. Long-term outcomes of pre-emptive valganciclovir compared with valacyclovir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23 (9): 1588.
36. Klahr S. The modification of diet in renal disease study. *N Engl J Med* 1989; 320 (13): 864.
37. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 8 (4): 753.
38. Garrigue I, Doussau A, Asselineau J, et al. Prediction of cytomegalovirus (CMV) plasma load from evaluation of CMV whole-blood load in samples from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (2): 493.
39. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-Organ Transplantation. *Transplantation* 2013.
40. Sis B, Einecke G, Chang J, et al. Cluster analysis of lesions in nonselected kidney transplant biopsies: microcirculation changes, tubulointerstitial inflammation and scarring. *Am J Transplant* 2010; 10 (2): 421.

41. Simanek AM, Dowd JB, Pawelec G, Melzer D, Dutta A, Aiello AE. Seropositivity to cytomegalovirus, inflammation, all-cause and cardiovascular disease-related mortality in the United States. *PLoS One* 2011; 6 (2): e16103.
42. Cheng J, Ke Q, Jin Z, et al. Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure. *PLoS Pathog* 2009; 5 (5): e1000427.
43. Li S, Zhu J, Zhang W, et al. Signature microRNA expression profile of essential hypertension and its novel link to human cytomegalovirus infection. *Circulation* 2011; 124 (2): 175.
44. Smith JM, Corey L, Bittner R, et al. Subclinical viremia increases risk for chronic allograft injury in pediatric renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21 (9): 1579.
45. Dzabic M, Rahbar A, Yaiw KC, et al. Intra-graft cytomegalovirus protein expression is associated with reduced renal allograft survival. *Clin Infect Dis* 2011; 53 (10): 969.
46. Reischig T, Jindra P, Hes O, Bouda M, Kormunda S, Treska V. Effect of cytomegalovirus viremia on subclinical rejection or interstitial fibrosis and tubular atrophy in protocol biopsy at 3 months in renal allograft recipients managed by preemptive therapy or antiviral prophylaxis. *Transplantation* 2009; 87 (3): 436.
47. Nickel P, Bold G, Presber F, et al. High levels of CMV-IE-1-specific memory T cells are associated with less alloimmunity and improved renal allograft function. *Transpl Immunol* 2009; 20 (4): 238.
48. Rao PS, Ojo A. The alphabet soup of kidney transplantation: SCD, DCD, ECD--fundamentals for the practicing nephrologist. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4 (11): 1827.
49. Hill GS, Nochy D, Bruneval P, et al. Donor-specific antibodies accelerate arteriosclerosis after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22 (5): 975.
50. Jindra PT, Jin YP, Rozengurt E, Reed EF. HLA class I antibody-mediated endothelial cell proliferation via the mTOR pathway. *J Immunol* 2008; 180 (4): 2357.
51. Potena L, Grigioni F, Magnani G, et al. Prophylaxis versus preemptive anti-cytomegalovirus approach for prevention of allograft vasculopathy in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2009; 28 (5): 461.
52. Streblow DN, Kreklywich CN, Andoh T, et al. The role of angiogenic and wound repair factors during CMV-accelerated transplant vascular sclerosis in rat cardiac transplants. *Am J Transplant* 2008; 8 (2): 277.
53. Koh KP, Wang Y, Yi T, et al. T cell-mediated vascular dysfunction of human allografts results from IFN-gamma dysregulation of NO synthase. *J Clin Invest* 2004; 114 (6): 846.
54. Helantera I, Koskinen P, Tornroth T, Loginov R, Gronhagen-Riska C, Lautenschlager I. The impact of cytomegalovirus infections and acute rejection episodes on the development of vascular changes in 6-month protocol biopsy specimens of cadaveric kidney allograft recipients. *Transplantation* 2003; 75 (11): 1858.
55. Helantera I, Koskinen P, Finne P, et al. Persistent cytomegalovirus infection in kidney allografts is associated with inferior graft function and survival. *Transpl Int* 2006; 19 (11): 893.

TABLE

**Table 1: Demographic and clinical characteristics of the patient cohort according to the existence of CMV infection before the biopsy**

	<b>CMV N=32</b>	<b>No CMV N=55</b>	<b>p</b>
Sex ratio (M/F)	1	1.7	0.2
Time since D0	775±243	962±184	0.5
Recipient age (years)	52.1±15	46.4±14,5	0.04
Donor age (years)	54.2±15.7	48.3±15.6	0.06
Graft ranking	1.2	1.1	0.9
HLA sensitization at D0	7 (22%)	16 (29%)	0.2
CMV serostatus D+R-, D+R+, D-R-, D-R+	9/14/0/9	7/13/23/12	0.0004
Ischemia time	16.6±5.8	16.9±8.8	0.6
Induction (ATG/Anti IL2R/0)	6/25/1	17/37/1	0.3
DSA at biopsy	4 (14%)	14 (26%)	0.2
SBP (mmHg)	133 ± 14	134 ± 14	0.6
DBP (mmHg)	81 ± 10	80 ± 11	0.7
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	34.6±12.9	37.8±20.7	0.8
Graft survival	23 (71%)	39 (71%)	0.9
Patient survival	28 (88%)	51 (93%)	0.3
Acute rejection	8 (25%)	16 (29%)	0.4
IFTA (ci+ct > 2)	12 (38%)	20 (37%)	0,9
AML (ptc+g+cg > 0)	7 (22%)	16 (29%)	0,5
Arteriosclerosis (cv>0)	22 (69%)	25 (45%)	0.03
Arteriopathy (ah>0)	9 (36%)	26 (48%)	0.2

D0 day of the transplantation, ATG thymoglobulin, Anti IL2R anti interleukin 2 receptor, D serostatus donor, R serostatus recipient, DSA Donor Specific Alloantibodies, SBP Systolic blood pressure, DBP Diastolic blood pressure, eGFR estimated graft filtration rate, IFTA interstitial fibrosis tubular atrophy, AML antibody mediated lesions.

**Table 2: Characteristics of the patient cohort for KTR with donor age < 60 years old, according to the existence of CMV infection before the biopsy**

	<b>CMV N=18</b>	<b>No CMV N=38</b>	<b>P</b>
Sex ratio (M/F)	0.9	1.7	0.2
Time since D0	811±204	756±142	0.8
Recipient age (years)	45.4±15	41.8±13	0.3
Donor age (years)	45.9±16	41.8±12	0.1
Ischemia time	16.6±5.8	16.9±8.8	0.6
DSA at biopsy	2 (13%)	11 (29%)	0.2
SBP (mmHg)	133±15	136±15	0.6
DBP (mmHg)	81±9	83±10	0.7
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	35.6±14	41.1±22	0.3
Graft survival	14 (78%)	28 (74%)	0.7
	18		
Patient survival	(100%)	37 (97%)	0.9
Acute rejection	5 (28%)	10 (26%)	0.6
IFTA (ci+ct > 2)	9 (50%)	13 (34%)	0.2
AML (ptc+g+cg > 0)	4 (22%)	13 (34%)	0.2
Arteriosclerosis (cv>0)	13 (72%)	14 (37%)	0.03
Arteriopathy (ah>0)	5 (36%)	20 (54%)	0.2

D0 day of the transplantation, DSA Donor Specific Alloantibodies, SBP Systolic blood pressure, DBP Diastolic blood pressure, eGFR estimated graft filtration rate, IFTA interstitial fibrosis tubular atrophy, AML antibody mediated lesions.

**Table 3: Factors associated with the occurrence of cv>0 lesions for KTR with donor age <60 years old.**

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	OR	CI 95%	p	OR	CI 95%	p
Recipient age*	1.7	[1.1-2.9]	0.01	1.1	[0.6-2.0]	0.8
Donor age*	2.0	[1.3-3.6]	0.002	1.9	[1.2-3.7]	0.03
Ischemia Time	1.0		0.7			
Systolic BP	1.0	[0.9-1.1]	0.2			
Diastolic BP	1.0		0.9			
BP >130/80mmHg	1.8	[0.6-5.6]	0.3			
CMV infection	4.4	[1.4-16.4]	0.01	4.2	[1.1-18.9]	0.03
DSA	0.6	[0.2-2.2]	0.5			
Acute rejection	0.5	[0.2-1.8]	0.2			
IFTA (ci+ct > 2)	0.9	[0.3-2.6]	0.8			
AML (ptc+g+cg>0)	0.9	[0.3-2.9]	0.9			
Arteriopathy (ah>0)	1.7	[0.6-5.4]	0.3			

DSA Donor Specific Alloantibodies, SBP Systolic blood pressure, DBP Diastolic blood pressure. \* per decade.

Figure 1.

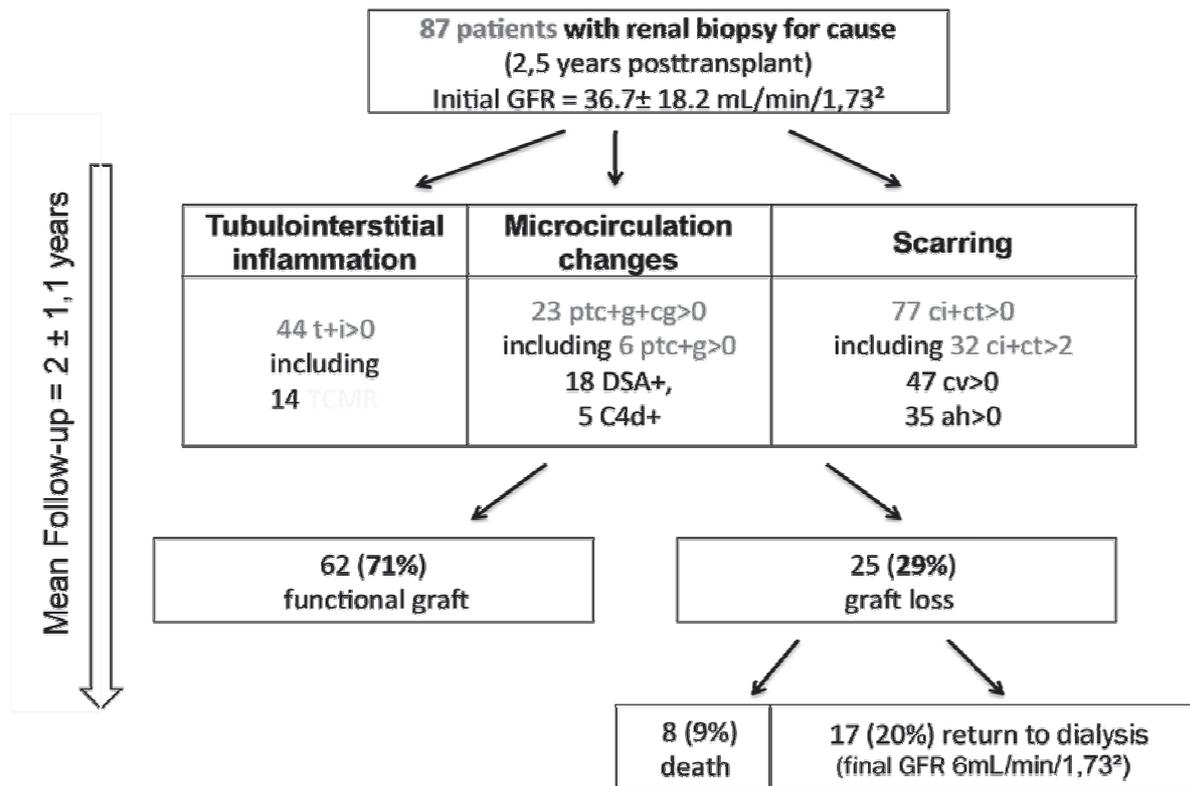
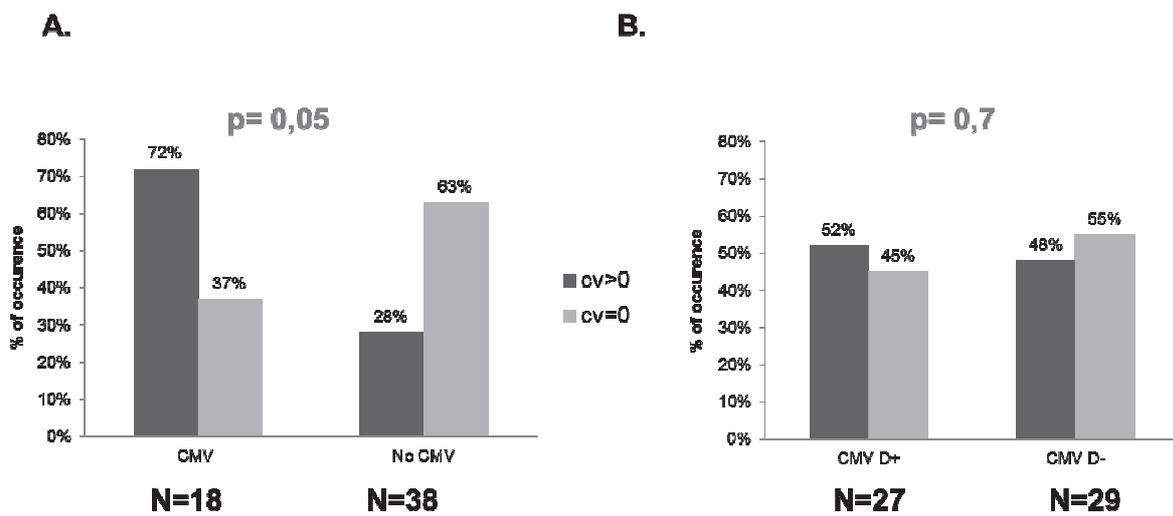


Figure 2.



## **ARTICLE II: Kidney intragraft Donor-Specific Antibodies as determinant of antibody-mediated lesions and poor graft outcome.**

Accepté et publié **Am J Transplant. 2013 Sep 18.** : cf annexe

Dans ce second article, nous avons complété la relecture critique des conséquences histologiques du deuxième facteur de détérioration du transplant sur lequel nous nous sommes focalisés : les DSA.

En pratique clinique, le diagnostic de rejet à médiation humorale repose sur 3 niveaux de preuve : la mise en évidence de 1) DSA dans le sang circulant, 2) de lésions histologiques de la microcirculation (capillarite péri-tubulaire, et glomérulite) et 3) « d'une preuve immunopathologique » de l'activation d'anticorps au sein du greffon. Actuellement, cette preuve immunopathologique fait appel à la recherche de dépôts de C4d au niveau des capillaires péri-tubulaires, (produit de dégradation du C4b se liant de façon covalente à l'endothélium): il s'agit d'un test spécifique mais insuffisamment sensible. Nous avons cherché à développer un test alternatif se basant sur l'application des tests ultrasensibles d'identification sur billes à résolution allélique LUMINEX des anticorps anti HLA aujourd'hui disponibles. Ce test a été consisté à détecter ces anticorps sur les éluats de transplants rénaux : 51 greffons rénaux conservés en congélation ont ainsi été traités par écrasement puis plusieurs répétitions de centrifugation/lavage avant l'ajout d'un tampon acide (solution glycine de pH=2.1) afin d'obtenir les « éluats ». Dans cette cohorte de patients, pour la plupart immunisés anti HLA (N=46) avec une majorité de DSA circulants (N=37), nous montrons que:

- a) cette détection est possible et tous les anticorps anti HLA retrouvés dans le greffon sont des DSA.
- b) Aucun DSA dans le greffon n'est identifié sans que l'on retrouve également un DSA dans le sang circulant.
- c) La quantité/affinité des DSA circulants (ou intensité moyenne de fluorescence MFI) est le meilleur paramètre associé avec la survenue de DSA dans le greffon.
- d) La présence de DSA dans le greffon est associée à un mauvais pronostic du greffon à court terme.

**Kidney intragraft Donor-Specific Antibodies as determinant of antibody-mediated lesions and poor graft outcome**

T. Bachelet<sup>a,b,c</sup>, L. Couzi<sup>a,b,c</sup>, S. Lepreux<sup>a,c</sup>, M. Legeret<sup>a</sup>, G. Pariscoat<sup>a</sup>, G. Guidicelli<sup>a</sup>, P. Merville<sup>a,b,c</sup> and J.-L. Taupin<sup>a,b,c</sup> \*

<sup>a</sup>CHU Bordeaux, Bordeaux, France; <sup>b</sup>UMR 5164, CNRS, Bordeaux, France; <sup>c</sup>Université Bordeaux Segalen, Bordeaux, France.

\*Corresponding author: Jean-Luc Taupin, [jean-luc.taupin@chu-bordeaux.fr](mailto:jean-luc.taupin@chu-bordeaux.fr)

**Running Title: Intragraft DSA detection and AML**

**Key words:** anti-HLA antibodies, donor-specific antibodies, antibody-mediated lesions, graft elution, kidney transplantation

**Abbreviations:** AAMR, acute antibody-mediated rejection; ABMR, Antibody-Mediated Rejection; ACMR, Acute Cell-Mediated Rejection; AML, Antibody-Mediated Lesions; CAMR, Chronic Antibody-Mediated Rejection; cg, Glomerulopathy; DSA, Donor Specific Antibodies; g, Glomerulitis; gDSA, Intragraft DSA; IFTA, Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy; isDSA, Immunodominant Serum DSA; KTR, Kidney Transplant Recipients; ptc, Peritubular Capillaritis; SAFB, Single Antigen Flow Bead; sDSA, Serum DAS;  $\sum$ sDSA-MFI, Sum of the mean fluorescence intensity of the different circulating DSA.

## Abstract

Allograft pathology, antibody-tissue interaction as demonstrated by C4d deposition, and serological evidence of donor-specific antibodies (DSA) are the cardinal diagnostic features of antibody-mediated lesions (AML) in kidney transplantation. However, discrepancy between histological and serological findings is common, and more reliable diagnostic tools are called for. Here we asked whether the *in situ* detection of DSA could serve as marker for AML. To that end, we applied the anti-HLA single antigen flow bead assay to eluates from 51 needle core graft biopsies performed for cause. Intragraft antibody profiles were correlated to serum DSA (sDSA), histological data and transplant outcome. The prevalence and the mean number of intragraft DSA (gDSA) were lower than that of sDSA (15/51 gDSA+ versus 37/51 sDSA+ patients; 1.64 gDSA versus 2.24 sDSA per patient). DSA were detected in all anti-HLA antibody-positive biopsies (15/15). The presence of gDSA was significantly associated with (1) microcirculation lesions taken individually (g, cg) and analyzed in functional clusters (ptc+g+cg>0, cg+mm>0), (2) C4d positivity and (3) a worse short-term transplant outcome (p=0.05). These associations were not found for patients presenting only sDSA. Taken together, these results indicate that gDSA is a severity marker of antibody-mediated pathogenic process.

## Introduction

In recent years, the humoral anti-HLA response has been increasingly recognized as contributing to the majority of kidney graft failures (1). As specified in the Banff classification (2, 3), the definition of antibody-mediated rejection (ABMR) relies on three cardinal features: (i) allograft pathology, (ii) antibody-tissue interaction as evidenced by peritubular C4d deposition and (iii) serologic anti-HLA donor-specific antibodies (DSA) (4). Recently the diagnostic criteria of antibody-mediated lesions (AML) or injuries have been refined and extended to renal microcirculation deterioration (3, 5), transplant glomerulopathy (6), *de novo* transplant microangiopathy (7) and accelerated arteriosclerosis (8). In this setting, peritubular capillary C4d deposition was demonstrated to be a specific but not a sensitive marker for all of these lesions, leading to the misclassification of nearly 50% of ABMR (9, 10).

During this same time, the use of multiplex solid phase assays for the detection and identification of anti-HLA antibodies spread widely due to their high sensitivity and specificity (11). These assays, especially the single antigen flow bead (SAFB) assay, have provided unprecedented possibilities for the characterization of anti-HLA allosensitization at the epitope level. However, the interpretation of circulating serum DSA (sDSA) by such approaches remains a matter of intense debate, as this huge improvement in technical performance is not necessarily associated with a support in clinical decision-making (12, 13). This is particularly true for determining the clinical significance of low levels of anti-HLA antibodies. On the one hand, a growing literature suggests that very low sDSA levels are detrimental to graft function or survival, either for preformed or *de novo* sDSA (14-18). On the other hand, it has been demonstrated that sDSA at a low concentration may promote *in vitro* cell survival by activating the PI3K/Akt cascade and up-regulating expression of anti-apoptotic proteins in endothelial cells (19).

An alternative to sDSA detection would be to directly look for DSA into the transplant. This approach, which was attempted for the first time almost 40 years ago (20, 21), has been mainly applied to surgically-removed kidney grafts using complement-dependent cytotoxicity, the only available assay at the time. Recently, the more sensitive ELISA and flow cytometry FlowPRA® assays and, ultimately, the SAFB techniques have convincingly confirmed the presence of anti-HLA DSA in explanted kidney transplants (22-24). However, until now, very little work has been done on the small tissue samples represented by needle core biopsies of functioning transplants. In a limited number of patients, Martin et al have indeed detected the presence of plasma cells, C4d and intragraft DSA (gDSA) on serial biopsies from kidney transplant recipients with chronic graft dysfunction (25, 26). However, no correlation with graft outcome was performed, due to the small number of patients and/or the insufficient resolution of the assay used, which was not able to identify in all cases the antigenic specificities recognized by the anti-HLA alloantibodies detected.

Based on these data, we assessed the putative interest of needle core graft biopsy to evidence the presence of gDSA, using the SAFB assay. The goals of our study were to describe (i) the incidence of gDSA, (ii) the association between gDSA and histological lesions and (iii) the impact of gDSA on graft outcome.

## **Materials and Methods**

### **Patients**

This is a retrospective study of 51 KTR who underwent needle core graft biopsy for cause (generally for unexplained increase in serum creatinine, proteinuria or circulating sDSA) between December 2004 and August 2010, and had blood samples drawn the same day as the biopsy. The available data on HLA sensitization status, graft conditions and immunosuppressive regimen on the day of the biopsy as well as those on graft functional status at 15 months post-biopsy were collected. Graft function was estimated by calculating eGFR using the MDRD formula. The study was approved by the institutional review board and did not interfere with standard patient clinical management.

### **Histopathology**

Graft cortical biopsies were performed with a 16-gauge biopsy needle guided by ultrasound. Each biopsy was examined by light microscopy, as follows: the biopsy core was fixed, embedded in paraffin, sectioned at 2  $\mu$ m and stained with Masson's trichrome, hematoxylin-eosin and periodic acid Schiff. Histological analyses were performed by one pathologist (S.L.) and graded according to the updated semi-quantitative Banff classification, including the concept of suspicious ABMR (27). A second biopsy sample was collected and frozen sections were stained with anti-IgA, -IgG, -IgM, -C3 (Binding Site, Birmingham, UK) and -C4d (Quidel, San Diego, CA) antibodies. Samples with C4d staining at more than 50% of peritubular capillaries were considered as positive for C4d deposition. One patient was excluded from the histological analysis because the biopsy did not allow a clear diagnosis according to the Banff criteria, despite a C4d-positive staining. The Banff cv and ah score could not be evaluated in four patients and the C4d staining was not available in one patient.

### **Biopsy elution**

Graft biopsies were processed as previously described (23), using the Acid Elution kit (Elukit II, Gamma Biologicals Inc., Houston, TX). Briefly, the remnant of the non-fixed frozen biopsy core used for the immunofluorescence analysis, was thawed at room temperature, minced, resuspended in 1.5 mL of PBS and centrifuged at 3000 rpm for 2 min. This washing procedure was performed three times to remove the recipient's biological fluids. After the last centrifugation step, the pellet was resuspended in 0.1 mL of PBS and centrifuged again. The supernatant was collected for further

antibody analysis (negative control testifying for the efficacy of the washing steps in removing the recipient's blood and extracellular fluids), while the cell pellet was resuspended in 0.1 mL of acid elution buffer (glycine solution at pH=2.1), incubated for 10 min at room temperature and centrifuged at 6000 rpm for 2 min. The eluate was harvested and neutralized to pH=6.5 using 0.1 mL of buffering solution [tris(hydroxymethyl)-aminomethane solution at pH=8.5] and stored at -80°C until analysis. The supernatant harvested after the last washing step was tested when the biopsy eluate was found positive. This control was performed to confirm the specific action of the elution process on the graft-bound antibody. All were found negative (results not shown). The same person (G.P.) performed all the experiments. In experiments not shown, we demonstrated that the acid buffer+neutralizing solution mix did not trigger denaturation of the HLA antigens on the class I and class II SAFB. We also demonstrated using serum samples from patients included in this study, that acid treatment then neutralization, did not lead to the denaturation of anti-HLA antibodies, which would have prevented their detection in the biopsy eluates with the SAFB assays. Therefore, the differences that we observed for DSA between serum and biopsy eluates could not be attributed to denaturing effects towards anti-HLA antibodies or antigens, caused by the elution procedure.

### **Anti-HLA antibody testing**

Anti-HLA class I and II antibodies were detected and identified in the serum and the biopsy eluates, with the LabScreen LS1A04 and LS2A01 single antigen flow bead (SAFB) assay (One Lambda Inc, Canoga Park, CA) on a Luminex 100<sup>®</sup> analyzer (Luminex, Austin, TX), according to the manufacturer's recommendations, using SAFB lots 6 and 8, respectively. The same person (G.P.) performed all the experiments. Donor HLA typing (class I HLA-A, -B, -Cw and class II HLA-DR, -DR51/52/53, -DQ and -DP) was performed on cell aliquots stored frozen at the time of the transplant by using the high resolution reverse SSO-PCR assay (LabType, One Lambda Inc). The positivity thresholds were set at a normalized MFI $\geq$ 500 using the baseline calculation mode (HLA Fusion software, One Lambda Inc), for the serum, and at a normalized MFI $\geq$ 100 for the biopsy. The latter value was determined from two kinds of preliminary experiments. First, we used biopsy eluates from 3 surgically removed kidneys from non-transplanted patients and the acid+neutralizing solution as a negative control matrix. Second, we relied on the MFI value provided by the HLA-negative control bead of the SAFB assay performed for each serum/eluate pair, which was found 5-fold lower for the biopsy eluate than for the serum, in class I and in class II. Given the cut-off set at 500 for the serum, a positivity threshold at 100 for the biopsy was therefore retained, which also corresponded to a mean+5sd value as defined by the first approach. Such a stringent cut-off favoured specificity of antibody detection in biopsy eluates (results not shown). Results are expressed either as the sum of the sDSA-MFI ( $\sum$ sDSA-MFI) or as the immunodominant sDSA-MFI (isDSA-MFI).

## Statistical analysis

Analyses were performed using conventional statistical methods. The Mac Nemar  $\chi^2$  test was used for qualitative variables; the Student's *t* test and the Mann–Whitney U test were used when appropriate. The variables potentially associated with the occurrence of gDSA were subjected to univariate analysis. Kaplan–Meier analysis was used to construct graft survival curves. Comparisons were made using the log–rank test. Analyses were performed with JMP 10 IN software (SAS Institute Inc. Cary, NC).

## Results

### Study Population

The study included 51 kidney transplant recipients (KTR) who underwent a graft biopsy between December 2004 and August 2010, for whom a non-fixed frozen biopsy core and a serum sample collected the same day were available. All graft biopsies were performed for cause and categorized according to the Banff criteria into acute antibody-mediated rejections (AAMR, n=12), suspicious for AAMR (n=4), chronic antibody-mediated rejections (CAMR, n=8), suspicious for CAMR (n=8), acute cell-mediated rejections without capillaritis (ACMR, n=9), interstitial fibrosis and tubular atrophy lesions (IFTA, n=6), normal profiles (n=3) and unclassified (n=1, see materials and methods section). The mean time since kidney transplantation was  $3.4 \pm 4.8$  years and 26 out the 51 patients (51%) had an early biopsy (<12 months after transplantation). In accordance with inclusion criteria, at biopsy, mean patient age was  $47.4 \pm 14.6$  years, 72% were male, and renal graft function was already impaired, as illustrated by a mean creatinemia of 295  $\mu\text{M}$ , related to a mean MDRD-based estimated GFR (eGFR) of 27.6 mL/min/1.73m<sup>2</sup> and a mean proteinuria of 0.7 g/L. The baseline demographic and clinical characteristics at the time of transplant and biopsy are summarized in Table 1.

### Characterization of sDSA and gDSA

In the serum, 46 patients (90%) exhibited anti-HLA class I and/or II antibodies. Among these, 40 patients (78%) exhibited class I antibodies and 41 patients (80%) class II antibodies. At least one sDSA was present in 68% (27/40) and 71% (29/41) of the patients positive for anti-HLA class I and/or II antibodies, respectively. The mean  $\pm$  sd number of sDSA per patient was  $2.24 \pm 1.5$ , and the locus distribution of the HLA specificities targeted by the sDSA was as follows: 12, 14, 18, 10, 5, 16 and 9 cases for A, B, Cw, DR, DR 51/52/53, DQ and DP antigens, respectively (Table 2 and Supplemental Figure 1).

In the biopsy, 15 patients (29%) exhibited at least one anti-HLA antibody. Seven patients (14%) exhibited class I antibodies and 13 (25%) had class II antibodies. The intragraft anti-HLA antibodies were always DSA (7/7 and 13/13 in class I and class II, respectively). The mean  $\pm$  sd number of gDSA per patient was lower than in the serum ( $1.64 \pm 0.9$ ,  $p=0.01$ ; Table 2) but showed a similar distribution of HLA specificities ( $p=0.93$ ; Supplemental Figure 1). There was a strong association between the presence of sDSA and gDSA, considering class I ( $p=0.007$ ), class II ( $p=0.003$ ) and class I and/or II sensitization ( $p=0.005$ ) (Supplemental Table 1). While 40.5% of sDSA+ patients had gDSA, gDSA was never detected in sDSA- patients (Supplemental Table 1). However, in two cases, the anti-HLA class II gDSA antigenic specificity (HLA DQ9 and HLA DP3) was different from the one identified for the sDSA (Table 2, in bold). The mean fluorescence intensity (MFI) strength ( $\pm$  sd) of DSA was significantly higher in the serum of gDSA+ than gDSA- patients [sum of sDSA-MFI ( $\sum$ sDSA-MFI) of  $13464 \pm 11852$  versus  $3270 \pm 7527$ ,  $p<0.0001$  and immunodominant sDSA-MFI (isDSA-MFI) of  $7369 \pm 4932$  versus  $2158 \pm 3694$ ,  $p<0.0001$ ] (Figure 1A and 1B).

### **gDSA and Banff histological analysis**

In our cohort, gDSA were mostly found in biopsies exhibiting AML, whereas they could not be found in any biopsies either normal or with IFTA lesions and were absent from 89% of biopsies with ACMR (Table 3). The Banff histological items were investigated in 50 patients both individually (i, t, ptc, g, ci, ct, cg, mm, cv, ah, and v) and in functional clusters according to the recent report from the Edmonton group (with ptc+g+cg referring to microcirculation lesions, ptc+g to microcirculation inflammation, cg+mm to microcirculation deterioration, i+t to tubulointerstitial inflammation and ci+ct to tubulointerstitial scarring, considered severe when  $>2$ ) (1, 28-30). To analyze the performance of gDSA, and because of the absence of sDSA-gDSA+ patients in our cohort, we focused on the comparison of the sDSA+gDSA+ patients ( $n=15$ ) with the sDSA+gDSA- ( $n=21$ ) patients (Figure 2).

The sDSA+gDSA+ biopsies exhibited AML more frequently than the sDSA+gDSA- biopsies, as evidenced for the g and cg items taken individually [g $>0$  in 33% of sDSA+gDSA+ ( $n=5$ ) versus 6% of sDSA+gDSA- patients ( $n=1$ ),  $p=0.02$ ; cg $>0$  in 60% of sDSA+gDSA+ ( $n=9$ ) versus 17% of sDSA+gDSA- patients ( $n=3$ ),  $p=0.01$ ], although the ptc item did not reach significance [ptc $>0$  in 53% of sDSA+gDSA+ ( $n=8$ ) versus 26% of sDSA+gDSA- patients ( $n=6$ ),  $p=0.1$ ] (Figure 2A). Of note, vascular lesions were also overrepresented in sDSA+gDSA+ patients either for cv and v [cv $>0$  in 67% of sDSA+gDSA+ ( $n=10$ ) versus 29% of sDSA+gDSA- patients ( $n=6$ ),  $p=0.03$ ; v $>0$  in 20% of sDSA+gDSA+ ( $n=3$ ) versus 0 in sDSA+gDSA-,  $p=0.03$ ]. Cluster analysis (Figure 2B) showed similar results for ptc+g+cg $>0$ , [in 93% of sDSA+gDSA+ ( $n=14$ ) versus 38% of sDSA+gDSA- patients ( $n=8$ ),  $p=0.001$ ] and for cg+mm $>0$  [in 75% of sDSA+gDSA+ ( $n=10$ ) versus 19% of sDSA+gDSA- patients ( $n=4$ ),  $p=0.004$ ] with ptc+g $>0$  very close to statistical significance [60% of sDSA+gDSA+ ( $n=9$ ) versus 29% of sDSA+gDSA- patients ( $n=6$ ),  $p=0.06$ ]. On the contrary, no association was found

for  $i+t>0$  [in 53% of sDSA+gDSA+ (n=8) versus 62% of sDSA+/gDSA- patients (n=13),  $p=0.6$ ], nor for  $ci+ct>2$  [in 40% of sDSA+gDSA+ (n=6) versus 29% of sDSA+/gDSA- patients (n=6),  $p=0.5$ ].

When considering the Banff criteria as quantitative variables, the cg item occurred individually significantly more frequently in sDSA+gDSA+ than in sDSA+gDSA- patients (mean  $\pm$  sd  $1.0 \pm 1.1$  versus  $0.4 \pm 1.1$ ,  $p=0.04$ ) (Figure 2C). When analyzed as clusters (Figure 2D),  $ptc+g+cg$  ( $2.3 \pm 1.4$  versus  $0.8 \pm 1.5$ ,  $p=0.003$ ) and  $cg+mm$  scores ( $1.3 \pm 1.4$  versus  $0.8 \pm 1.7$ ,  $p=0.04$ ) were significantly higher in sDSA+gDSA+ than in sDSA+gDSA- patients, respectively. The  $ptc+g$  score was very close to significance ( $1.3 \pm 1.3$  versus  $0.4 \pm 0.8$ ,  $p=0.06$ ).

The presence of C4d deposits in peritubular capillaries (n=26 among the 50 interpretable biopsies) was significantly associated with gDSA ( $p=0.01$ ) but not with sDSA ( $p=0.3$ ), with 80% (n=12) of gDSA+ biopsies displaying C4d deposition (Figures 2A and 2B).

No significant association was observed when comparing sDSA+ with sDSA- patients for any of the individual Banff criteria considered as qualitative or as quantitative variables. In accordance with previously published results (10, 29, 30), a qualitative cluster analysis showed that  $ptc+g+cg>0$  lesions occurred more frequently in sDSA+ than in sDSA- patients [61% (n=24) versus 29% (n=4), respectively;  $p=0.04$ ], and no significant difference was noticed for any of the other clusters or Banff scores (results not shown).

### **Risk factors associated with the presence of gDSA**

In univariate analysis,  $g>0$  (OR=8.25,  $p=0.02$ ),  $cg>0$  (OR=7.25,  $p=0.004$ ), C4d+ (OR=6.0,  $p=0.01$ ) and  $\sum$ sDSA-MFI (OR=1.06 for each increase of 500 MFI units,  $p=0.01$ ) were found to be the only factors significantly associated with the presence of gDSA, whereas  $ptc>0$  (OR=3.3,  $p=0.06$ ) and proteinuria (OR=1.96 for each 1 g/L increase,  $p=0.06$ ) showed borderline significance (Table 4). In a multivariate analysis including  $ptc$ ,  $g$ ,  $cg$ , C4d,  $\sum$ sDSA-MFI and proteinuria, we found that the only parameter still independently associated with gDSA was  $\sum$ sDSA-MFI (OR=1.05 for each increase of 500 MFI units,  $p=0.02$ ; Table 4).

The presence of a gDSA was statistically significantly associated ( $p=0.02$ ) with a  $\sum$ sDSA-MFI above 3820, which is the median value for our sDSA+ patients. Of note, we found similar results when considering an MFI for the isDSA above the median value of 3110 ( $p=0.02$ ). Positive and negative predictive values, sensitivity and specificity were 61%, 79%, 73% and 68%, respectively, for both.

### **gDSA and short-term transplant outcome**

The median time of follow-up after biopsy was 15.3 months. No significant difference in graft function was detected between sDSA+gDSA+, sDSA+gDSA- and No DSA patients on the day of the biopsy (mean  $\pm$  sd): creatininemia of  $376 \pm 346$ ,  $254 \pm 247$ , and  $272 \pm 97$   $\mu$ mol/L respectively,  $p=0.1$

(result not shown) and eGFR of  $24.5 \pm 17$ ,  $32 \pm 15$  and  $24 \pm 9$  mL/min/1.73m<sup>2</sup> respectively,  $p=0.2$  (Figure 3A). No difference was detected 15 months later, although there was a trend towards a worse outcome for the sDSA+gDSA+ patients: creatininemia of  $466 \pm 450$ ,  $293 \pm 302$  and  $272 \pm 190$   $\mu\text{mol/L}$  ( $p=0.2$ ), and eGFR of  $24.1 \pm 20$ ,  $33.4 \pm 22$  and  $33.2 \pm 22$  mL/min/1.73m<sup>2</sup> ( $p=0.3$ ) (Figure 3A). Nevertheless, 30 months after the biopsy, 15 of the 51 patients had progressed to End Stage Renal Disease (ESRD). Graft survival was lower in the sDSA+gDSA+ ( $n=15$ ) than in the sDSA+gDSA- patient group ( $n=22$ ) (53% versus 77%,  $p=0.1$ ). This difference was yet not significant, in all likelihood because of the small number of patients and or a too limited duration of follow up. The presence of gDSA in comparison with the gDSA- group (sDSA+gDSA- and No DSA) was associated with a worse short-term outcome since the death-censored graft survival was 53% in the gDSA+ versus 78% in the gDSA- patients' groups ( $p=0.05$ ) (Figure 3B).

## Discussion

Our study indicates that gDSA can be easily detected and identified in eluates from needle core biopsies using the SAFB assay. In this cohort of sensitized KTR, (i) no gDSA was detected in the absence of sDSA, (ii) the antibody-positive biopsies always contained at least one DSA and (iii) sDSA MFI strength was the best parameter associated to the occurrence of gDSA. Interestingly, we found that gDSA, but not sDSA, was strongly correlated with AML, and was also associated with a poor transplant outcome. Taken together, our results suggest that gDSA could represent a valuable biomarker of severe antibody-mediated pathogenic processes. However, our study has several limitations: it is a single-centre, retrospective and non-randomized study on a limited cohort of 51 patients. The kidney graft function deterioration was often at an advanced stage at the time of the biopsy and as a consequence the results shown here cannot be used to estimate the role of gDSA in the early phase of ABMR. Still, to our knowledge, this study is the first to get into the prospect of clinical application, as we focused on eluates extracted from needle core biopsies sampled before graft failure and used the powerful SAFB technology. As biopsy processing takes less than one hour, the whole procedure can easily be performed within a working day. One criticism would be to state that gDSA are in fact sDSA that have not been removed correctly during the washing procedure. However, we can argue first, that the supernatant of the last washing step can be used as a negative control to demonstrate that all antibodies not bound to tissue cells have been removed, and second, that no non-DSA were found in the eluates, unless they displayed cross-reactivity with a donor antigen [results not shown, and reference (31) for a reported case]. Therefore, the exclusive presence of DSA in eluates reflected the reliability of this approach. Interestingly, for two patients we were able to detect two gDSA which were directed against donor HLA antigens not targeted by the sDSA that were detected.

Both of these patients were undergoing an acute rejection episode. These DSA were not evidenced in the serum before the biopsy. For one patient only, the DSA became detectable in the serum after the biopsy (DQ9, at 5 weeks). Biopsy elution could thus increase the sensitivity of DSA detection in these patients.

Our study shows that the prevalence of gDSA remained lower than that of sDSA, a feature that may have several explanations. First, professional phagocytes such as tissue macrophages could contribute through their Fc-gamma receptors, to the clearance of the gDSA involved in immune complexes with the alloantigen. Second, the sensitivity of the assay may be insufficient given the smallness of the tissue sample (25). Third, a single needle core biopsy specimen is most probably not representative of a whole kidney. Lastly, the SAFB assay MFI cut-off value for the biopsy eluate was set to favor specificity of antibody detection, but this could have occurred to the detriment of sensitivity, and thus will need to be refined with larger cohorts, keeping in mind that the SAFB assay was released as a qualitative assay, and suffers from insufficient intra- and inter-laboratory reproducibility that impedes its use as a quantitative test, as recalled recently (32). In experiments not shown, we ruled out the possibility that the acid elution procedure could have irreversibly altered the antigen-binding capacity of some antibodies, thereby preventing them from further binding to the relevant SAFB. Therefore, taken together, our results suggest that the SAFB identification of anti-HLA alloantibodies directly into the graft tissue was technically feasible, but did not perform better than in the serum, although this could have been expected from the commonly accepted hypothesis that the graft could act as a “sponge trap” for circulating antibodies.

In this cohort, anti-HLA antibodies specific for HLA-Cw, -DP or -DR51/52/53 antigens were frequently identified, both as sDSA and more importantly as gDSA. These findings are in favor of a pathogenic role for allosensitization against these antigens, as is being increasingly reported for HLA-Cw (33) and -DP (34). Of note, these HLA antigens are not integrated in most of the organ allocation algorithms and similarly, are not considered in a vast majority of published reports analyzing the role of circulating DSA in organ transplant outcome (15, 30, 35).

In our cohort, the risk factors traditionally associated with HLA sensitization were not associated with the occurrence of gDSA. In contrast, markers of AML (i.e. g, cg, C4d and  $\sum$ sDSA-MFI) were, in univariate analysis. In multivariate analysis, only the MFI of sDSA was still associated with gDSA. Such a correlation has not yet been demonstrated for *de novo* post-transplant sDSA, although high MFI sDSA have been associated with poor outcome (15). In this perspective, the detection of gDSA could help stratifying the immunological risk.

We confirm the results recently reported by the Edmonton group (30), according to which microcirculation lesions analyzed as functional clusters ( $ptc+g+cg>0$ ) were associated with the presence of sDSA. We demonstrate here that the detection of gDSA in sDSA+ recipients is also

associated with C4d staining, and with microcirculation lesions analyzed as functional clusters ( $\text{ptc}+\text{g}+\text{cg}>0$  and  $\text{cg}+\text{mm}>0$ ). So far, only a statistical association between sDSA and microcirculation lesions had been demonstrated. With the present work, the detection of DSA in biopsy eluates, i.e. directly into a functioning transplant, represents a new argument of causality for their pathogenesis in AML.

To further investigate the clinical relevance of gDSA, we analyzed patient outcome after the graft biopsy. The KTR included in this study displayed a high immunological risk, as most were HLA-sensitized and displayed circulating sDSA. At the time of the biopsy, their graft function was already altered, as illustrated by their mean creatininemia and eGFR, and there was also a trend to a worse creatininemia and eGFR for the sDSA+gDSA+ patients when compared to the sDSA+gDSA-. Taken together, these results suggest that gDSA indicates an active pathogenic process which can not be predicted by detecting solely a sDSA. Then, the presence of gDSA appears as an interesting biomarker to identify KTR at risk of poor graft outcome.

In conclusion, this study highlights the interest of analyzing the presence or absence of DSA in eluates from needle core biopsies. Based on these results, we believe that gDSA could help quantifying the severity of an active antibody-mediated pathogenic process, and as such could be used as a surrogate endpoint in future studies to guide therapeutic intervention and monitoring.

### **Acknowledgments**

We thank Catherine Rio for her help as a nurse coordinator. We also acknowledge the technicians from the Laboratory of Immunology and Immunogenetics at Bordeaux University Hospital for their significant contribution to this study. There was no study sponsor.

### **Disclosures**

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*

## Figure Legends:

**Figure 1. DSA MFI levels.** MFI levels of  $\Sigma$ sDSA (panel A) and isDSA (panel B) for sDSA+gDSA+ and sDSA+gDSA- patients. Data are expressed as median (horizontal line in the box), first/third quartile range (boundaries of the box) and full-range distribution (whisker line) for the whole population. Differences between sDSA+gDSA+ and sDSA+gDSA- patients were evaluated using the Mann-Whitney U test.

**Figure 2. Histological analysis of gDSA among sDSA.** The Banff histologic items are considered either individually (i, t, g, ptc, ci, ct, cg, mm, cv, ah, and v) (panels A and C) or in functional clusters [ptc+g+cg referring to microcirculation lesions, ptc+g to microcirculation inflammation, cg+mm to microcirculation deterioration, i+t to tubulointerstitial inflammation and ci+ct to tubulointerstitial scarring, considered severe when >2) (panels B and D), either as qualitative (panels A and B) or quantitative (panels C and D) variables. Data are presented as mean, with analysis by the Mac Nemar  $\chi^2$  test and Mann–Whitney U test. The asterisks depict a  $p < 0.05$ .

**Figure 3. Graft function outcome according to the presence or absence of gDSA or sDSA at the time of the biopsy and at distance post-biopsy.** Graft function was estimated by the MDRD-based eGFR (panel A) and the death-censored graft survival (panel B). When comparing the gDSA+ patients to all the gDSA- patients (sDSA+gDSA- and No DSA) patients, the p was significant ( $p = 0.05$ ).

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of the article.

**Supplementary Figure S1.** Locus distribution of the HLA antigenic specificities targeted by the DSA detected into the graft eluate (A) or in the serum (B). The locus distribution of the HLA specificities targeted by the DSA was not different between serum samples and biopsy eluates for the A, B, C, DR, DR51/52/53, DQ and DP loci ( $p=0.93$ ).

**Supplementary Table S1.** Distribution of the patients according to the presence or absence of anti-HLA Class I and/or Class II DSA in the serum or in the graft.

## REFERENCES

1. Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Campbell PM, Hidalgo LG et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 2009;9(11):2520-2531.
2. Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC et al. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 2010;10(3):464-471.
3. Mengel M, Sis B, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC et al. Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2012;12(3):563-570.
4. Archdeacon P, Chan M, Neuland C, Velidedeoglu E, Meyer J, Tracy L et al. Summary of FDA antibody-mediated rejection workshop. *Am J Transplant* 2011;11(5):896-906.
5. Cosio FG, Lager DJ, Lorenz EC, Amer H, Gloor JM, Stegall MD. Significance and implications of capillaritis during acute rejection of kidney allografts. *Transplantation* 2010;89(9):1088-1094.
6. Issa N, Cosio FG, Gloor JM, Sethi S, Dean PG, Moore SB et al. Transplant glomerulopathy: risk and prognosis related to anti-human leukocyte antigen class II antibody levels. *Transplantation* 2008;86(5):681-685.
7. Satoskar AA, Pelletier R, Adams P, Nadasdy GM, Brodsky S, Pesavento T et al. De novo thrombotic microangiopathy in renal allograft biopsies-role of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2010;10(8):1804-1811.
8. Hill GS, Nochy D, Bruneval P, Duong van Huyen JP, Glotz D, Suberbielle C et al. Donor-specific antibodies accelerate arteriosclerosis after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(5):975-983.
9. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 2009;9(10):2312-2323.
10. Loupy A, Hill GS, Suberbielle C, Charron D, Anglicheau D, Zuber J et al. Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). *Am J Transplant* 2011;11(1):56-65.
11. Bray RA, Gebel HM. Strategies for human leukocyte antigen antibody detection. *Curr Opin Organ Transplant* 2009;14(4):392-397.
12. Vlad G, Ho EK, Vasilescu ER, Colovai AI, Stokes MB, Markowitz GS et al. Relevance of different antibody detection methods for the prediction of antibody-mediated rejection and deceased-donor kidney allograft survival. *Hum Immunol* 2009;70(8):589-594.
13. Couzi L, Araujo C, Guidicelli G, Bachelet T, Moreau K, Morel D et al. Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. *Transplantation* 2011;91(5):527-535.
14. Cooper JE, Gralla J, Chan L, Wiseman AC. Clinical significance of post kidney transplant de novo DSA in otherwise stable grafts. *Clin Transpl* 2011:359-364.
15. Gloor JM, Winters JL, Cornell LD, Fix LA, DeGoey SR, Knauer RM et al. Baseline donor-specific antibody levels and outcomes in positive crossmatch kidney transplantation. *Am J Transplant* 2010;10(3):582-589.
16. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation* 2009;87(10):1505-1513.
17. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(8):1398-1406.
18. Ntokou IS, Iniotaki AG, Kontou EN, Darema MN, Apostolaki MD, Kostakis AG et al. Long-term follow up for anti-HLA donor specific antibodies postrenal transplantation: high immunogenicity of HLA class II graft molecules. *Transpl Int* 2011;24(11):1084-1093.
19. Jindra PT, Zhang X, Mulder A, Claas F, Veale J, Jin YP et al. Anti-HLA antibodies can induce endothelial cell survival or proliferation depending on their concentration. *Transplantation* 2006;82(1 Suppl):S33-35.

20. Jeannet M, Lambert PH. Immunological studies on eluates from human kidney grafts. *Clin Immunol Immunopathol* 1975;4(4):478-488.
21. Metzgar RS, Seigler HF, Ward FE, Rowlands DT, Jr. Immunological studies on eluates from human renal allografts. *Transplantation* 1972;13(2):131-137.
22. Heinemann FM, Roth I, Rebmann V, Arnold ML, Witzke O, Wilde B et al. Immunoglobulin isotype-specific characterization of anti-human leukocyte antigen antibodies eluted from explanted renal allografts. *Hum Immunol* 2007;68(6):500-506.
23. Martin L, Guignier F, Mousson C, Rageot D, Justirabo E, Rifle G. Detection of donor-specific anti-HLA antibodies with flow cytometry in eluates and sera from renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2003;76(2):395-400.
24. Zou Y, Heinemann FM, Grosse-Wilde H, Sireci G, Wang Z, Lavingia B et al. Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. *Hum Immunol* 2006;67(3):230-237.
25. Martin L, Guignier F, Bocrie O, D'Athis P, Rageot D, Rifle G et al. Detection of anti-HLA antibodies with flow cytometry in needle core biopsies of renal transplants recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2005;79(10):1459-1461.
26. Martin L, Charon-Barra C, Bocrie O, Guignier F, D'Athis P, Dautin G et al. Detection of plasma cells, C4d deposits and donor-specific antibodies on sequential graft biopsies of renal transplant recipients with chronic dysfunction. *Transpl Immunol* 2010;22(3-4):110-114.
27. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008;8(4):753-760.
28. Einecke G, Reeve J, Sis B, Mengel M, Hidalgo L, Famulski KS et al. A molecular classifier for predicting future graft loss in late kidney transplant biopsies. *J Clin Invest* 2010;120(6):1862-1872.
29. Sis B, Einecke G, Chang J, Hidalgo LG, Mengel M, Kaplan B et al. Cluster analysis of lesions in nonselected kidney transplant biopsies: microcirculation changes, tubulointerstitial inflammation and scarring. *Am J Transplant* 2010;10(2):421-430.
30. Sis B, Jhangri GS, Riopel J, Chang J, de Freitas DG, Hidalgo L et al. A new diagnostic algorithm for antibody-mediated microcirculation inflammation in kidney transplants. *Am J Transplant* 2012;12(5):1168-1179.
31. Bachelet T, Couzi L, Guidicelli G, Moreau K, Morel D, Merville P et al. Anti-Cw donor-specific alloantibodies can lead to positive flow cytometry crossmatch and irreversible acute antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2011;11(7):1543-1544.
32. Tait BD, Susal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FH et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and Non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 2013;95(1):19-47.
33. Duquesnoy RJ, Marrari M. Detection of antibodies against HLA-C epitopes in patients with rejected kidney transplants. *Transpl Immunol* 2011;24(3):164-171.
34. Jolly EC, Key T, Rasheed H, Morgan H, Butler A, Pritchard N et al. Preformed Donor HLA-DP-Specific Antibodies Mediate Acute and Chronic Antibody-Mediated Rejection Following Renal Transplantation. *Am J Transplant* 2012;12(10):2845-2848.
35. Lefaucheur C, Antoine C, Suberbielle C, Glotz D. Mastering the risk of HLA antibodies in kidney transplantation: an algorithm based on pretransplant single-antigen flow bead techniques. *Am J Transplant* 2011;11(8):1592-1598.

**Table 1.** Demographic and clinical characteristics of the patient cohort

	N=51
Sex (M/W)	37/14
<u>At Kidney Transplantation</u>	
<b>Induction immunosuppressive treatment</b>	
Thymoglobulin/Anti-Interleukin 2 Receptor/None	21/24/6
Intravenous Immunoglobulins	14
<b>Donor</b>	
Age (years $\pm$ SD)	45.5 $\pm$ 16.2
Expanded Criteria Donor	16 (31.4%)
<b>Risk factors for HLA sensitization</b>	
Previous kidney transplantation	15 (29.4%)
Transplant removal	6 (11.8%)
Blood transfusion	24 (47.1%)
Pregnancy	10
<u>At Biopsy</u>	
Age (years $\pm$ SD)	47.4 $\pm$ 14.6
Time since transplantation (years $\pm$ SD)	3.4 $\pm$ 4.8
<b>Maintenance immunosuppressive treatment</b>	
Cyclosporine A/Tacrolimus/None	12/36/0
Mycophenolate Mofetil/Azathioprine/None	42/5/0
Steroids	32
<b>Graft function</b>	
Proteinuria (g/L)	0.7 $\pm$ 0.9
Creatininemia ( $\mu$ mol/L)	295 $\pm$ 250
MDRD-based eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	27.6 $\pm$ 14

**Table 2.** By-patient distribution of anti-HLA antibodies and HLA antigenic specificities of DSA in the graft eluate and in the serum

Patient	Intra-graft anti-HLA Ab	Biopsy: gDSA					Serum anti-HLA Ab	Serum: sDSA						
		Class I HLA Ag		Class II HLA Ag				Class I HLA Ag			Class II HLA Ag			
1-5	No	0	0	0	0	0	No	0	0	0	0	0	0	0
6-14	No	0	0	0	0	0	Yes	0	0	0	0	0	0	0
15	No	0	0	0	0	0	Yes	0	0	0	0	DQ5	0	0
16	No	0	0	0	0	0	Yes	0	0	0	0	DQ7	0	0
17	No	0	0	0	0	0	Yes	A1	0	0	0	0	0	0
18	No	0	0	0	0	0	Yes	C15	0	0	0	0	0	0
19	No	0	0	0	0	0	Yes	A68	0	0	0	0	0	0
20	No	0	0	0	0	0	Yes	C5	0	0	0	0	0	0
21	No	0	0	0	0	0	Yes	A1	0	0	0	0	0	0
22	No	0	0	0	0	0	Yes	0	0	0	0	DQ7	0	0
23	No	0	0	0	0	0	Yes	0	0	0	0	DQ5	0	0
24	No	0	0	0	0	0	Yes	C7	0	0	0	0	0	0
25	No	0	0	0	0	0	Yes	C12	0	0	0	DP14	0	0
26	No	0	0	0	0	0	Yes	A26	B35	0	0	0	0	0
27	No	0	0	0	0	0	Yes	C6	0	0	0	DP4	0	0
28	No	0	0	0	0	0	Yes	0	0	0	0	DR7	DP4	0
29	No	0	0	0	0	0	Yes	B56	0	0	0	DQ4	0	0
30	No	0	0	0	0	0	Yes	B51	0	0	0	DQ9	0	0
31	No	0	0	0	0	0	Yes	C12	B38	0	0	DP4	0	0
32	No	0	0	0	0	0	Yes	A24	0	0	0	DR16	DQ8	0
33	No	0	0	0	0	0	Yes	B49	0	0	0	DR15	DR51	0
34	No	0	0	0	0	0	Yes	C12	B38	0	0	DR13	0	0
35	No	0	0	0	0	0	Yes	C5	B44	C7	0	DR11	0	0
36	No	0	0	0	0	0	Yes	C8	0	0	0	DR53	DQ2	DR7
37	Yes	0	0	DQ6	0	0	Yes	0	0	0	0	DQ6	0	0
38	Yes	0	0	<b>DP3</b>	0	0	Yes	0	0	0	0	DQ8	0	0
39	Yes	0	0	DQ9	0	0	Yes	0	0	0	0	DQ9	0	0
40	Yes	0	0	DP14	0	0	Yes	0	0	0	0	DP14	0	0
41	Yes	0	0	<b>DQ9</b>	0	0	Yes	A29	0	0	0	0	0	0
42	Yes	A2	0	0	0	0	Yes	A2	0	0	0	DR51	0	0
43	Yes	0	0	DQ7	0	0	Yes	B45	A29	0	0	DQ7	0	0
44	Yes	0	0	DR53	0	0	Yes	0	0	0	0	DR7	DR53	DQ5
45	Yes	0	0	DQ7	0	0	Yes	C5	B27	0	0	DQ7	0	0
46	Yes	A23	0	DQ8	0	0	Yes	A23	0	0	0	DQ8	0	0
47	Yes	A68	0	DP3	0	0	Yes	A68	0	0	0	DP3	0	0
48	Yes	0	B38	DR13	0	0	Yes	C12	B38	A26	B49	DR13	0	0
49	Yes	C17	C6	0	0	0	Yes	C17	C6	B57	B41	DP2	DP4	0
50	Yes	A1	B13	DP4	0	0	Yes	A1	B13	C6	C16	DP4	DR7	0
51	Yes	C6	0	DR53	DR4	DQ8	Yes	C6	C10	0	0	DR53	DR4	DQ8

DSA donor specific antibodies, gDSA intra-graft DSA, sDSA serum DSA.

DSA are listed by decreasing MFI value for class I and class II separately.

Two gDSA from two different patients and biopsies with AAMR were directed against donor HLA antigens not targeted by the sDSA (HLA DP3 and HLA DQ9, in bold).

**Table 3.** Distribution of gDSA and/or sDSA according to patients' histologically-defined Banff categories

Banff Classification	AAMR	Suspicious for AAMR	CAMR	Suspicious for CAMR	ACMR	IFTA	Normal	p	Total
Number of patients	12	4	8	8	9	6	3		
Class I and/or II sDSA+*	12 (100)	0 (0)	8 (100)	7 (88)	7 (78)	0 (0)	2 (66)	<0.001	36
Class I and/or II gDSA+*	7 (58)	0 (0)	5 (63)	2 (25)	1 (11)	0 (0)	0 (0)	0.01	15

\*number (and percentage) of patients of the corresponding Banff category with the indicated DSA. AAMR, acute antibody-mediated rejection: C4d+, presence of circulating anti-donor antibodies, morphologic evidence of acute tissue injury; Suspicious for AAMR, suspicious for acute antibody-mediated rejection: C4d (in the presence of antibody) or alloantibody (C4d+) not evidenced despite the presence of morphologic evidence of acute tissue injury; CAMR, chronic antibody-mediated rejection: C4d+, presence of circulating anti-donor antibodies, morphologic evidence of chronic tissue injury, such as glomerular double contours and/or peritubular capillary basement membrane multi-layering and/or interstitial fibrosis/tubular atrophy and/or fibrous intimal thickening in arteries; Suspicious for CAMR, suspicious for chronic antibody-mediated rejection: C4d (in the presence of antibody) or alloantibody (C4d+) not evidenced despite morphologic evidence of chronic tissue injury; ACMR, acute cell-mediated rejection: interstitial infiltration ( $i \geq 1$ ) and tubulitis ( $t \geq 1$ ) without any signs of capillaritis ( $ptc+g=0$ ); IFTA, interstitial fibrosis and tubular atrophy: interstitial fibrosis ( $ci \geq 1$ ) and tubular atrophy ( $ct \geq 1$ ), no evidence of any specific etiology; Normal: none of the previous lesions.

**Table 4.** Factors associated with the occurrence of gDSA

	OR	CI 95%	p
<b><u>Univariate Analysis</u></b>			
<b>Sex</b>	0.67	[0.18-2.48]	0.54
<b><u>At Graft Biopsy</u></b>			
<b>Age*</b>	1.00	[0.96-1.05]	0.93
<b>Time since transplantation*</b>	1.00	[0.99-1.01]	0.56
<b>Maintenance immunosuppressive treatment</b>			
Cyclosporine A versus Tacrolimus	2.20	[0.4-11.8]	0.36
Mycophenolate Mofetil versus Azathioprine	0.24	[0.04-1.61]	0.14
Steroids versus no steroids	1.27	[0.4-4.5]	0.71
<b>Histologic data</b>			
i>0	1.10	[0.3-3.7]	0.90
t>0	0.70	[0.2-2.7]	0.60
ptc>0	3.30	[0.9-11.7]	0.06
g>0	8.25	[1.4-49.2]	0.02
ci>0	0.84	[0.1-5.2]	0.85
ct>0	1.00	[0.2-4.5]	0.99
cg>0	7.25	[1.9-28.1]	0.004
mm>0	0.74	[0.3-2.1]	0.99
cv>0	2.43	[0.7-8.8]	0.17
ah>0	1.67	[0.5-5.7]	0.40
v>0	8.00	[0.8-84.6]	0.08
C4d+	6.00	[1.4-25.2]	0.01
<b>Serum DSA</b>			
sDSA			0.96
ΣsDSA-MFI°	1.059	[1.01-1.1]	0.01
<b>Graft function</b>			
Creatinine ^	1.10	[0.99-1.11]	0.17
MDRD-based eGFR˘	0.98	[0.94-1.02]	0.32
Proteinuria˘	1.96	[0.97-3.9]	0.06
<b><u>At Kidney Transplantation</u></b>			
<b>Induction immunosuppressive treatment</b>			
Thymoglobulin/Anti-Interleukin 2 Receptor/None	1.50	[0.43-5.2]	0.53
IVIg versus no IVIg	2.33	[0.64-8.54]	0.20
<b>Risk factors for HLA sensitization</b>			
Previous kidney transplantation	1.73	[0.5-6.1]	0.39
Transplantectomy	7.00	[0.7-70.8]	0.10
Blood transfusion	3.00	[0.8-10.7]	0.90
Pregnancy	2.00	[0.1-26.7]	0.60
<b>Expanded Criteria Donor</b>	1.01	[0.3-3.8]	0.99

---

**Multivariate Analysis**

<b>Proteinuria<sup>~</sup></b>	1.15	[0.4-3.2]	0.78
<b>ΣsDSA-MFI<sup>°</sup></b>	1.05	[1.006-1.092]	0.02
<b>ptc&gt;0</b>	1.15	[0.1-11.9]	0.9
<b>g&gt;0</b>	4.7	[0.3-74.5]	0.27
<b>cg&gt;0</b>	6.9	[0.7-71.7]	0.1
<b>C4d+</b>	1.5	[0.1-21.5]	0.76

\*for each additional year, °for each additional 500 MFI units, ^for each additional μmol/L, ~for each additional mL/min/1.73m<sup>2</sup>, ~for each additional g/L.

IVIg intravenous immunoglobulins.

Figure 1.

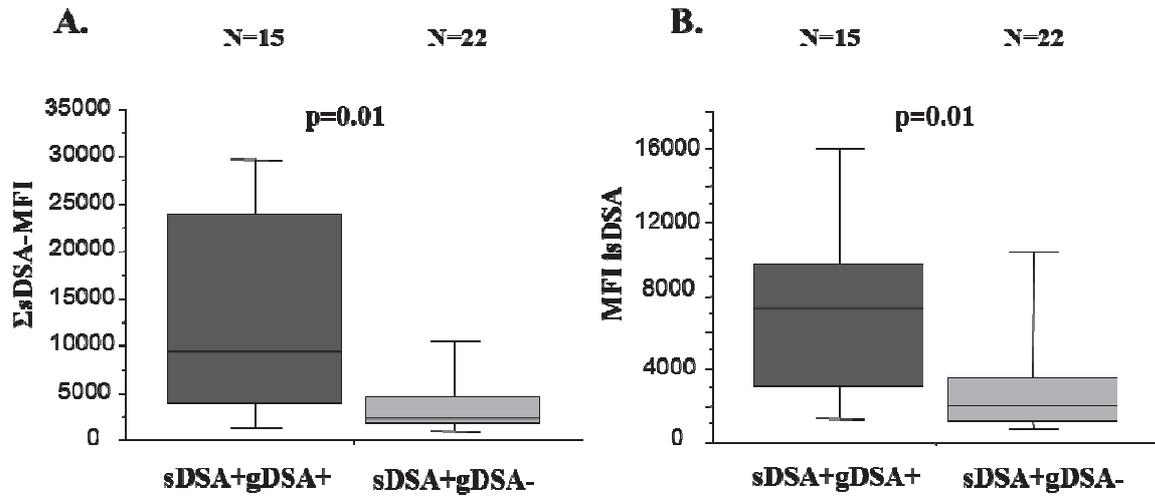


Figure 2.

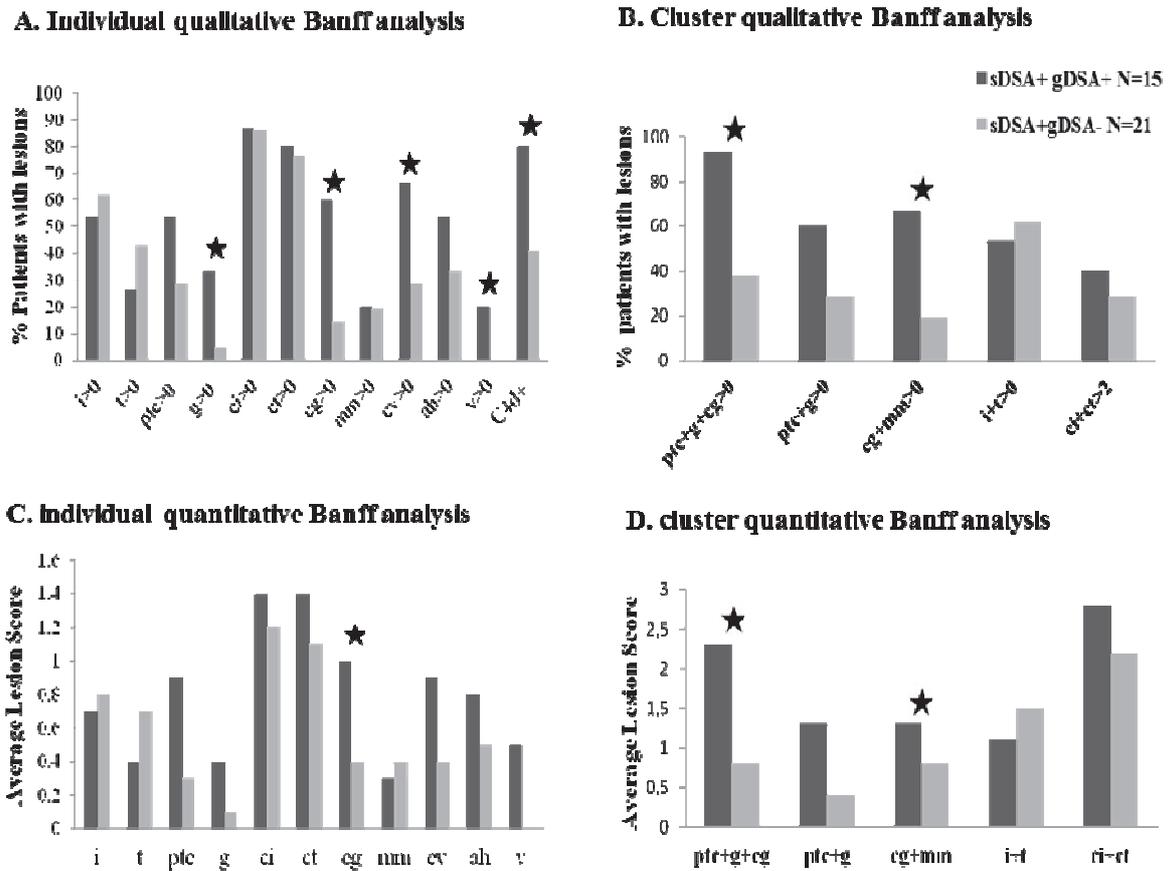
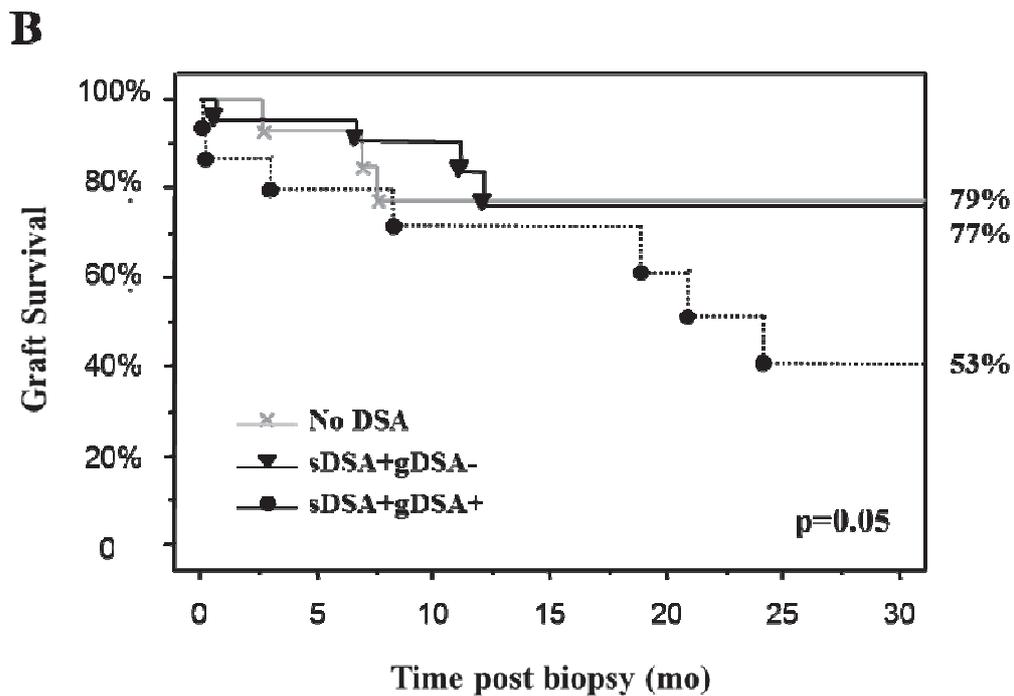
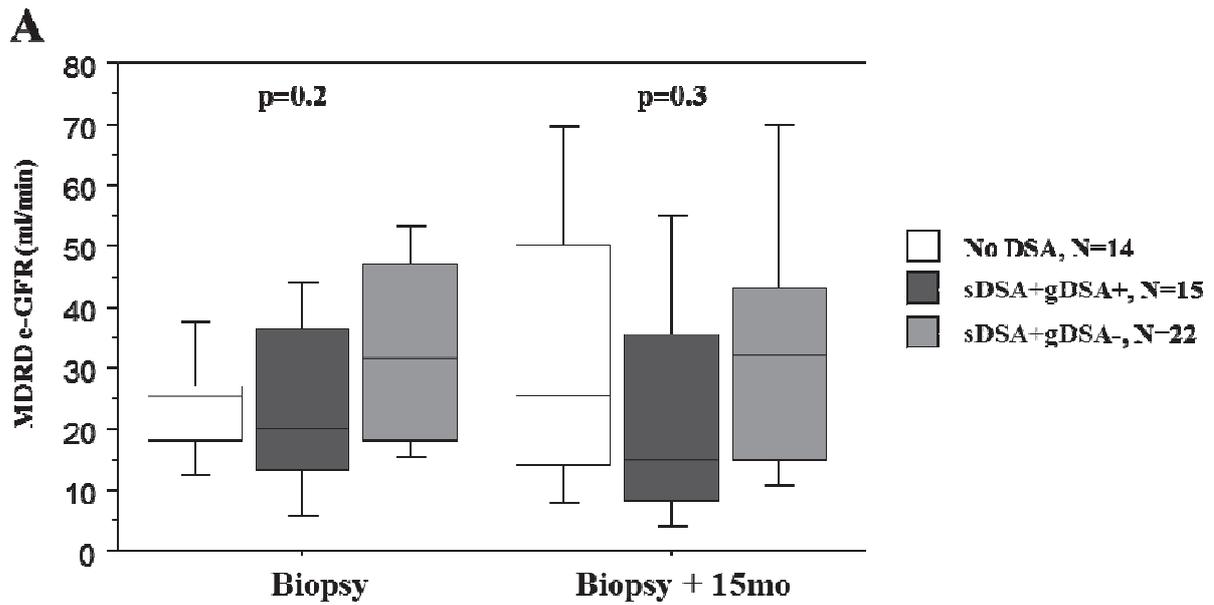
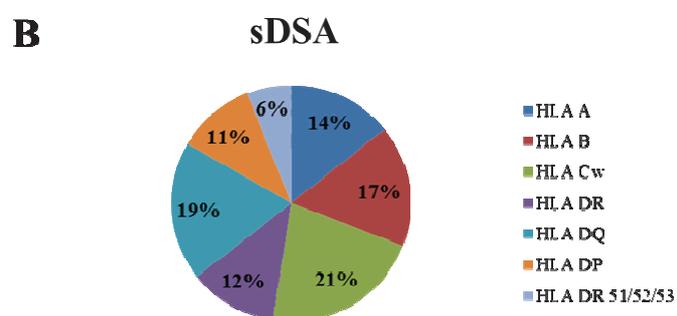
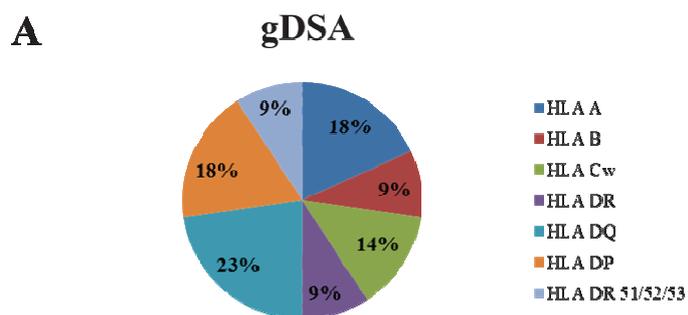


Figure 3.



Number at risk	D0	M6	M12	M18	M24	M30
sDSA+gDSA+	15	12	8	7	4	2
sDSA+gDSA-	22	21	14	9	6	5
No DSA	14	13	11	6	6	2

Supplemental figure S1.



$\chi^2$  p=0.93

Supplemental table S1.

<b>Anti-IIIA Class I Ab</b>	<b>gDSA+</b>	<b>gDSA-</b>	<b><math>\chi^2</math>, p=0.007</b>
sDSA+	7	20	27
sDSA-	0	24	24
	7	44	51
<b>Anti-IIIA Class II Ab</b>	<b>gDSA+</b>	<b>gDSA-</b>	<b><math>\chi^2</math>, p=0.003</b>
sDSA+	12	17	29
sDSA-	1	21	22
	13	38	51
<b>Anti-IIIA Class I or Class II Ab</b>	<b>gDSA+</b>	<b>gDSA-</b>	<b><math>\chi^2</math>, p=0.005</b>
sDSA+	15	22	37
sDSA-	0	14	14
	15	36	51

### **ARTICLE III : Cytomegalovirus-responsive $\gamma\delta$ T cells: A novel cell effector in antibody-mediated microcirculation lesions**

Soumis en octobre au *Journal of American Society of Nephrology* : Review.

Dans ce troisième article, nous poursuivons l'étude des DSA et l'analyse de mécanismes physiopathologiques indépendants du complément susceptibles de générer de nouveaux degrés de preuves immunopathologiques de la réponse humorale allogénique.

En effet, au niveau de l'allogreffe rénale, l'interface lésionnelle, cible des DSA, se situe au niveau de l'endothélium de la microcirculation. D'un point de vue immunologique, les lésions médiées par les DSA reposent sur 3 types de mécanismes 1) une lyse directe des cellules cibles, 2) une lyse dépendante du complément (activation classique par le fragment constant Fc des DSA) et 3) une lyse dépendante de cellules cytotoxiques (ADCC) au premier rang desquelles on trouve les cellules Natural Killer NK. Après avoir suggéré l'intérêt d'aller chercher les DSA par des tests d'identification en SAFB au sein des greffons rénaux, nous montrons ici que le CMV induit l'expansion de cellules T  $\gamma\delta$  *a priori* non alloréactives intrinsèquement mais qui peuvent participer à la réponse allogénique humorale en s'activant après engagement du fragment Fc des DSA sur le récepteur au fragment Fc des immunoglobulines G (Fc $\gamma$ RIIIA ou CD16) par un mécanisme d'ADCC.

Nous apportons différents types d'arguments qui invitent à considérer les cellules T  $\gamma\delta$  répondant au CMV comme un nouveau partenaire des lésions à médiation humorale : *in vivo* à partir de l'analyse en cytométrie en flux des cellules du sang circulant de patients transplantés rénaux, *ex vivo* à partir de l'analyse de biopsies de greffons présentant différents types de rejets, *in vitro* à partir de la génération d'une lignée de lymphocytes T  $\gamma\delta$  CD16+ réactifs contre le CMV et fonctionnels à partir de l'analyse d'une cohorte de patients immunisés ou non contre le donneur.

Ainsi, en plus des lésions d'artériosclérose précédemment décrite, le CMV pourrait favoriser, dans certaines situations où se met en place une forte réponse cellulaire T  $\gamma\delta$ , des lésions de la microcirculation par un mécanisme impliquant les DSA, et indépendant du complément (donc non appréhendé par la mise en évidence de dépôts de C4d au niveau des capillaires péri-tubulaires).

**Cytomegalovirus-responsive  $\gamma\delta$  T cells: A novel cell effector in antibody-mediated  
microcirculation lesions**

Thomas Bachelet,<sup>1,2,3</sup> Lionel Couzi,<sup>1,2,3</sup> Vincent Pitard,<sup>1,2</sup> Xavier Sicard,<sup>1,2</sup> Claire Rigotherier,<sup>3</sup> Sébastien  
Lepreux,<sup>4</sup> Jean-François Moreau,<sup>1,2,5</sup> Jean-Luc Taupin,<sup>1,2,5</sup> Pierre Merville,<sup>1,2,3</sup>  
and Julie Déchanet-Merville<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Univ. Bordeaux, CIRID, F-33000 Bordeaux, France; <sup>2</sup> CNRS, UMR 5164, F-33000 Bordeaux, France; <sup>3</sup> CHU de Bordeaux, Service de Néphrologie, Transplantation, Dialyse, F-33000 Bordeaux, France; <sup>4</sup> CHU de Bordeaux, Département d'Anatomie Pathologique, F-33000 Bordeaux, France; <sup>5</sup> CHU de Bordeaux, Laboratoire d'Immunologie et d'Immuno-génétique, F-33000 Bordeaux, France.

**Running title:**  $\gamma\delta$  T cells in Ab-mediated rejection

**Word counts:** Abstract: 207 (250 max); Text: 2976 (3000 max)

**Corresponding author:**

Julie Déchanet-Merville

UMR CNRS 5164, Université Bordeaux Ségalen, 146 rue Leo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex,  
France

**Tel:** 33-5 57 57 14 71,

**Fax:** 33-5-57-57-14-72,

**E-mail:** [julie.dechanet@u-bordeaux2.fr](mailto:julie.dechanet@u-bordeaux2.fr)

## Abstract

Human cytomegalovirus (CMV) infection has been associated with adverse renal allograft outcome and with a large  $\gamma\delta$  T-cell response, but whether both mechanisms are connected is unknown. We have previously shown that the majority of expanded circulating CMV-responsive  $\gamma\delta$  T cells express the Fc $\gamma$ -receptor CD16, making  $\gamma\delta$  T cells potential candidates to participate in allograft lesions mediated by donor-specific antibodies (DSA) through antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC). Here, we show that: (i) CMV-specific CD16<sup>pos</sup>  $\gamma\delta$  T cells are able to perform ADCC against stromal cells coated with DSA *in vitro*; (ii) graft-infiltrating  $\gamma\delta$  T cells are in close contact with endothelial cells in patients who experienced CMV infection, but not in patients who did not, and were more frequent within peritubular capillaries and glomeruli from antibody-mediated acute rejections than from T-cell-mediated acute rejections; (iii) an inverse correlation between a persistently increased percentage of circulating CMV-induced  $\gamma\delta$  T cells and the one-year e-GFR exists only in kidney recipients with DSA. Collectively, these data support the conclusion that CMV-induced  $\gamma\delta$  T cells are a new player and a potentially useful clinical biomarker in antibody-mediated lesions of kidney transplants. Moreover, these findings offer a new physiopathological link between CMV infection and allograft dysfunction in recipients with DSA.

## INTRODUCTION

In kidney transplant recipients (KTRs), the importance of the recipient's humoral response against the allograft has been recognized to play a key role in immunological injuries contributing to graft deterioration<sup>1-6</sup>. From an immunological point of view, donor specific antibody (DSA)-mediated lesions are considered to rely on complement-fixing DSA-mediated lysis, direct DSA-mediated apoptosis, and/or antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) by NK cells. Until recently, complement was the most recognized way of leading to graft endothelial cell injury. Indeed, deposition of C4d, a breakdown product of complement component C4, in peritubular capillaries still represents the only specific tool providing the “immunopathological evidence” of DSA interaction with graft tissue<sup>7-11</sup>. However, it does not encompass all DSA-mediated lesions<sup>12</sup>.

Several groups reappraised the multiplicity of mechanisms leading to antibody-mediated rejections (AMR)<sup>13</sup>. Glomerulitis and peritubular capillaritis are defined by an accumulation of polymorphonuclear cells, macrophages, and lymphocytes around capillaries. These infiltrates are associated with DSA and indicate a poor prognosis<sup>14-16</sup>. Among those, NK cells have recently been shown to be involved in DSA-mediated lesions of kidney microcirculation<sup>17,18</sup>, suggesting that ADCC could play a role in DSA-mediated lesions through DSA interaction with the low-affinity Fc receptor for IgG (FcγRIIIA-CD16) expressed on NK cells. Signaling through CD16 is instrumental for ADCC as it leads to cytolytic granule content release and subsequent death of target cells.

Beside NK cells, and unlike conventional  $\alpha\beta$  T cells,  $\gamma\delta$  T cells can also express CD16 at high levels, enabling them to efficiently mediate ADCC<sup>19</sup>. In human transplantation,  $\gamma\delta$  T lymphocytes have been strongly linked to CMV infection, itself associated with rejection<sup>20-22</sup>. A specific and persistent expansion of a  $\gamma\delta$  T cell subset normally located in the epithelia (called V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T cells and mainly composed of V $\delta$ 1 and V $\delta$ 3 T cells) is observed in peripheral blood during CMV infection in all solid-organ transplantations<sup>23-26</sup>. From our experience, CMV is the only clinical cause of V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T-cell expansion in KTR. This tight association between CMV infection and  $\gamma\delta$  T-cell expansion has been confirmed in many other pathophysiological contexts<sup>27-31</sup>. *In vitro*, clones of V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T cells display TCR-dependent cytotoxicity against both CMV-infected cells and carcinoma cells<sup>32</sup>. Accordingly, their expansion in kidney transplant recipients correlates with both reduced cancer-risk<sup>33</sup> and resolution of CMV infection suggestive of their antiviral function<sup>34</sup>.

Interestingly, we recently observed that the vast majority (around 80%) of V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T cells from CMV-infected individuals expressed CD16, whereas CMV-specific CD8+  $\alpha\beta$  T cells or V $\delta$ 2<sup>pos</sup> T cells did not<sup>35</sup>. CMV infection deeply reshapes the CD16+ lymphocyte compartment composition in CMV+ transplant recipients who exhibits an equal amount of CD16+ NK cells and CD16+  $\gamma\delta$  T cells at the periphery<sup>35</sup>. The latter are able to produce high levels of IFN $\gamma$  when recognizing IgG-opsonized CMV particles. This cooperation between  $\gamma\delta$  T cells and the humoral response could represent an interesting control mechanism of CMV reactivation in chronically infected tissues and of CMV spread in blood<sup>35</sup>.

Collectively these results raise the possibility that, in the context of transplantation and in the presence of DSA, reorganization of the CD16+ lymphocyte compartment following CMV infection could have deleterious effect on the graft. The aim of the present study was to evaluate whether CMV-induced CD16+  $\gamma\delta$  T cells were able to mediate ADCC against graft endothelial cells in the presence of DSA, a process that could participate in the association between CMV and DSA-mediated rejection.

## RESULTS

### Model of KTR DSA binding to endothelial and fibroblastic cells

In order to assess the potential allocytotoxic effect of CMV-induced  $\gamma\delta$  T cells in the presence of DSA, we used allogeneic stromal cell lines recognized by DSA. To this purpose, we assessed the ability of sera from eight KTR with DSA (sensitized KTR, S3 to S10) and from two non-sensitized KTR (S1 and S2) to bind three allogeneic HLA-typed “stromal” cells lines: an endothelial cell line (IVEC), primary foreskin fibroblasts (FSF), and MRC5. Cell-line-specific HLA antibodies (CLSA) levels in the sera were first evaluated using the HLA class I SAB assay (Table 1). As expected, control sera S1 and S2 did not contain CLSA. Sera S3, S4, S7, and S8 contained high levels of CLSA. Though containing DSA, sera S5, S6, S9, and S10 contained low levels of CLSA. The capacity of CLSA to bind to the allogeneic cells was next confirmed by flow cytometry (Figure 1A). The most important stainings were obtained when the three cell lines were incubated with the sera S3, S4, S7, and S8 that contained the highest levels of CLSA (Figure 1B). Accordingly, a strong correlation was observed between the CLSA MFI analyzed by SAB and the MFI of cell line staining analyzed by flow cytometry ( $p < 0.0001$ ,  $r^2 = 0.74$ ) (Figure 1C). These results suggested that the stromal cell binding activity of patient’s sera is mostly mediated by CLSA and that this assay is a reliable *in vitro* model to investigate DSA-dependent ADCC.

### $\gamma\delta$ T-cell-mediated ADCC against endothelial and fibroblastic cells

We then tested CMV-induced CD16<sup>pos</sup>  $\gamma\delta$  T-cell capacity to mediate ADCC against endothelial and fibroblastic cell lines coated with CLSA. To this end, a CD16<sup>pos</sup>  $\gamma\delta$  T-cell line was generated from a CMV-infected donor. FSF, IVEC, and MRC5 cell lines, pre-incubated with sera containing (S3, S4, S7, and S8) or not (S1 and S2) CLSA, were co-cultured with CD16<sup>pos</sup>  $\gamma\delta$  T cells in a 4-hour chromium release assay. CD16<sup>pos</sup>  $\gamma\delta$  T-cell line was able to kill the three allogeneic cell lines in the presence of CLSA-positive serum (Figure 2). Killing in the absence of serum or in the presence of a CLSA-negative serum was equal or close to background, ruling out a direct allogeneic cytotoxicity of  $\gamma\delta$  T cells. Likewise, there was no direct cytotoxicity of CLSA on target cells in the absence of  $\gamma\delta$  T cells (data not shown). Finally, the percentage of chromium release at a 30:1 effector:target ratio by  $\gamma\delta$  T cells closely correlated with the IgG-binding MFI analyzed by flow cytometry ( $p=0.01$ ,  $r^2=0.44$ , cumulated correlation for the three cell lines) (Figure 2B). Collectively, these data demonstrated the capacity of CD16<sup>pos</sup>  $\gamma\delta$  T cells to mediate DSA-dependent ADCC against endothelial and fibroblastic cells.

### **CLSA-dependent ADCC by $\gamma\delta$ T cells relies on CD16 and perforin**

We next investigated the mechanisms by which  $\gamma\delta$  T cells mediate CLSA-dependent ADCC. First, we demonstrated that CD16 was required as  $\gamma\delta$  T-cell-mediated ADCC was prevented when using either a blocking anti-CD16 mAb or a CD16-negative  $\gamma\delta$  T-cell line (Figure 3A for FSF pre-incubated with serum S8). Similar results were obtained using MRC5 and IVEC and using other CLSA-positive sera (data not shown). Second, we tested whether productive ADCC required the release of cytolytic granules. CD16<sup>pos</sup>  $\gamma\delta$  T cells were shown to express high levels of granzyme B and perforin (Figure 3B). Concanamycin A, an inhibitor of cytotoxic granule content release, abrogated ADCC by CD16<sup>pos</sup>  $\gamma\delta$  T-cell line in a dose-dependent manner (Figure 3C). In conclusion, the DSA-dependent  $\gamma\delta$  T-cell ADCC relies on CD16, the triggering of which elicited cytotoxic granule content release, similar to NK cell-mediated ADCC.

### **$\gamma\delta$ T cells are present in AMR microcirculation lesions of CMV-infected patients**

Peritubular capillaritis and glomerulitis are early signs of the microcirculation lesions characterizing AMR <sup>36</sup>. In order to know whether  $\gamma\delta$  T cells could be involved in this process, we examined their potential colocalization with these organic lesions. Sections of kidney graft diagnosed with acute AMR (n=10) were stained with an anti-CD31 mAb (to localize the endothelial cells) and an anti- $\gamma\delta$  TCR mAb. Interestingly,  $\gamma\delta$  T cells were found in close contact with endothelial cells in peritubular capillaritis and glomerulitis lesions associated with acute AMR (Figure 4A and Supplemental Figure

1). This association was specific, as it was not found for peritubular capillaries or glomeruli of allograft presenting with acute T-cell-mediated rejection (acute TCMR, n=13). Furthermore, when we distinguished CMV-experienced patients (R+ or R- with post-graft CMV primary infection) from CMV-naive patients (R- patients without post-graft CMV infection),  $\gamma\delta$  T cells were more frequent in peritubular capillaries and glomeruli of AMR (mean: 34.8/mm<sup>3</sup> and 2.6/mm<sup>3</sup>, respectively) than in those of TCMR (3.8/mm<sup>3</sup>, and 0.1/mm<sup>3</sup>, respectively) only in CMV-experienced patients (Figure 4B and Supplemental Figure 1). In CMV-naive patients, the rate of  $\gamma\delta$  T cells in peritubular capillaries and glomeruli was low in both TCMR and AMR (Figure 4B).  $\gamma\delta$  T cells could also be found in the interstitium but were more frequent during TCMR than during AMR, whatever the CMV status of the patient. Together, these results suggest that CMV-induced  $\gamma\delta$  T cells localize into the AMR microcirculation lesions where they may mediate graft rejection through ADCC.

### **Correlation of $\gamma\delta$ T-cell levels with estimated glomerular filtration rate (e-GFR) at 12 months post-transplant in patients with DSA**

If the assumption that CMV-induced  $\gamma\delta$  T cells are involved in AMR is true, their expansion in patients with DSA should be associated with renal dysfunction. In a recent study, we observed that among sensitized KTRs, those who had the highest risk for graft rejection and the lowest 12 months post-transplantation e-GFR, were the patients who had anti-HLA DSA the day of the graft<sup>37</sup>. We tested a potential link between circulating  $\gamma\delta$  T cells at 12 months post-transplant and DSA-mediated rejection in this cohort of 21 KTRs with DSA. As a control group, we used 162 KTRs without DSA, whose characteristics are summarized in Table 2. Among the 21 consecutive sensitized KTRs, baseline donors' and recipients' characteristics as well as DSA MFI levels were not significantly different between those with rejection and those without rejection (Table 3). Notably, 19 out of these 21 patients had experienced CMV infection before or after the transplantation. No statistical differences of the percentage of total  $\gamma\delta$  or V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T cells were observed between patients with TCMR, AMR, or without rejection (Figure 5A). However, the circulating  $\gamma\delta$  T cells, and especially that of V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T cells, were strongly and inversely correlated with the 12 months post-transplant e-GFR (p=0.003, r<sup>2</sup>=0.44 and p=0.004, r<sup>2</sup>=0.43, respectively) (Figure 5B). Conversely, in the control group of 162 non-sensitized KTRs, no correlation between  $\gamma\delta$  or V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T cells and post-transplant e-GFR (r<sup>2</sup>=0.0001, p=0.2 and r<sup>2</sup>=0.0009, p=0.7, respectively, Figure 5C) was observed, even when focusing on the 98 CMV-experienced patients (r<sup>2</sup>=0.02, p=0.2, data not shown). In summary, high percentages of CMV-induced V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T cells were associated with a poor e-GFR only in KTRs with DSA, suggesting cooperation between CMV,  $\gamma\delta$  T cells, and DSA to induce graft dysfunction.

## DISCUSSION

Allogeneic reaction is considered the result of direct or indirect recognition of foreign MHC molecules by alloreactive T lymphocytes. Therefore,  $\gamma\delta$  T cells are usually viewed as non-alloreactive because they do not recognize peptides bound to MHC molecules. However,  $\gamma\delta$  T cells express a broad range of activatory molecules that allow them to respond to stressed cells and that could potentially participate in a different type of reactivity against allografts. These molecules include, for example, the  $\gamma\delta$  TCR itself that can recognize self-stress Ags<sup>38-40</sup>, or NKG2D that binds stress-induced MHC-like ligands (MIC and ULBP)<sup>41</sup>. Here, we describe the implication of CD16 in the alloreactive potential of  $\gamma\delta$  T cells responding to CMV infection.

We first present a model of anti-HLA alloantibody-dependent cell cytotoxicity, using sera from patients sensitized to HLA-A/B antigens expressed by “model” stromal cell lines. Using this model, we demonstrated that CMV-induced  $\gamma\delta$  T cells can make DSA dose-dependent ADCC. The lytic capacity of  $\gamma\delta$  T cells was strictly dependent on patients’ sera presence in the assay, excluding direct recognition of putative stromal cell line stress antigens by  $\gamma\delta$  T cell activatory receptors (TCR, NKG2D, etc.). Of note, slight IVEC lysis can be observed with sera from non-sensitized KTRs (15% at a 30:1 effector:target ratio), suggesting the presence of antibodies to other antigens specifically expressed on IVEC. Antibodies to endothelial cell antigens other than HLA antigens have been previously detected in KTRs, particularly in relation to CMV infection<sup>42-45</sup>. However, since no binding of IgG from non-sensitized sera was found by flow cytometry on IVEC, lysis of these cells with this serum suggests the presence of unknown factors other than IgG able to induce  $\gamma\delta$  T-cell cytolytic potential. This assay could therefore be interesting to identify new factors involved in endothelial cell damage.  $\gamma\delta$  T cell ADCC relies on the release of perforin and granzyme from the cytotoxic vacuole, but other molecules such as granulysin cannot be excluded<sup>46</sup>. Conversely, death receptor pathways do not seem to play any role in  $V\delta 2^{neg}$   $\gamma\delta$  T-cell ADCC since neither Fas-L nor TRAIL expression was found on  $V\delta 2^{neg}$   $\gamma\delta$  CD16+ T cells (data not shown). Thus,  $V\delta 2^{neg}$   $\gamma\delta$  T cells use the same cytotoxic arsenal when activated via CD16 to mediate ADCC as when they are activated via the TCR to kill CMV-infected or tumor cells (previously shown in<sup>32</sup>).

*In situ* visualization of  $\gamma\delta$  T cells within allografts has not been reported before. Tissue staining of  $\gamma\delta$  T cells is challenging because of their low number and because specific mAbs are not suitable for paraffin-embedded tissue staining. Nevertheless, using frozen-tissue immunofluorescence staining, we could visualize  $\gamma\delta$  T cells in kidney grafts undergoing acute rejection. In combination with endothelial cell staining through CD31, we could precisely define  $\gamma\delta$  T-cell localization within the graft. They were observed in close contact with peritubular capillaritis and glomerulitis associated with acute AMR in CMV-experienced patients. This localization is consistent with  $\gamma\delta$  T-cell involvement in

antibody-mediated microcirculation injuries such as that reported for NK cells<sup>17</sup> and macrophages<sup>47-49</sup>. The fact that higher numbers of  $\gamma\delta$  T cells can be found in these areas in grafts from CMV-experienced patients when compared to graft of CMV-naive patients suggests that only CMV-induced  $\gamma\delta$  T cells contribute to DSA-mediated microcirculation injuries, in agreement with their expansion and CD16 overexpression in response to CMV. Due to the limited choice in antibodies against CD16 and  $\gamma\delta$  TCR suitable for tissue immunofluorescence double-staining, CD16 expression by  $\gamma\delta$  T cells in the graft remains to be established. Staining of CD16 alone was positive but might also be attributed to NK cells or polymorphonuclear cells (data not shown). However, as higher  $\gamma\delta$  T-cell numbers were found in peritubular capillaries and glomeruli in acute AMR when compared to acute TCMR, we can postulate that DSA and their likely binding to CD16 were required for this specific localization. In addition, there was no difference between CMV-experienced and CMV-naive patients in  $\gamma\delta$  T-cell number within the lymphocyte infiltrate of interstitium during TCMR, suggesting that CMV-mediated  $\gamma\delta$  T-cell blood expansion is not the only reason for their migration into the graft.

This suspected  $\gamma\delta$  T-cell role in acute AMR is supported by the association of decreased graft function in DSA-positive patients with a high percentage of circulating CMV-induced  $\gamma\delta$  T cells. This is in marked contrast with CMV-specific CD8  $\alpha\beta$  T cells that have been shown to associate with less alloreactivity and improved graft function<sup>50</sup>, consistent with their absence of CD16 expression<sup>35</sup>.  $\gamma\delta$  T-cell ADCC could represent a new physiopathological contribution to the well-known but poorly understood association between CMV infection and the increased occurrence of rejection<sup>20,51</sup>, poor long-term graft function<sup>21,52-54</sup>, and low graft survival<sup>55,56</sup>. Hence, both CMV and DSA are required to see a correlation between circulating  $\gamma\delta$  T cells and graft function deterioration, consistent with a model where CMV infection evokes activation and expansion of CD16<sup>pos</sup>  $\gamma\delta$  T cells in undetermined anatomical sites, and DSA triggers their ADCC function within graft microcirculation. This implication of  $\gamma\delta$  T cells in graft rejection seemingly contrasts with the previously reported V $\delta$ 1 T-cell expansion in the peripheral blood and grafts of operationally tolerant liver transplant recipients<sup>57-59</sup>. However, Sanchez-Fueyo et al. recently revised their interpretation of V $\delta$ 1 expansions confirming that they relate to CMV infection and are not restricted to tolerant liver recipients<sup>24</sup>.

Even though the Banff diagnostic criteria of antibody-mediated rejection requires positive C4d peritubular capillary staining, it is now well accepted that C4d does not explain all antibody-mediated lesions<sup>12,60</sup>. Complement-independent pathways have been proposed and their characterization could help define novel markers of DSA-mediated microcirculation damage. NK cells are suspected to play a role because NK-cell transcripts or transcripts induced by IFN $\gamma$  suspected to be produced by NK cells are increased in AMR biopsies<sup>18,61</sup>. Moreover, peripheral blood NK cells from HLA-sensitized patients produce IFN $\gamma$  in a CD16-dependent manner when exposed *in vitro* to allogeneic cells plus alloantibodies<sup>62</sup>. CMV-responsive  $\gamma\delta$  T cells share many features with NK cells such as common

expression of activating (e.g., NKP80, NKG2D, CD16,) and inhibiting (e.g., CD158, CD85j) receptors<sup>26,31</sup>, expression of specific cytotoxic molecules such as granulysin (unpublished data), and production of IFN $\gamma$ <sup>32,35</sup>. Transcripts for some of these molecules have been found in kidney biopsies from patients with DSA and have been attributed to NK cells<sup>17</sup>. We know from previous studies that engagement of CD16 can also induce IFN $\gamma$  production by  $\gamma\delta$  T cells<sup>35</sup>, and that this production is dependent on a Th1 cytokinic environment. Transplant glomerulopathies were associated with a predominantly Th1 and cytotoxic profile, which could provide this context<sup>63</sup>. It is conceivable that both NK cells and  $\gamma\delta$  T cells could contribute to AMR through ADCC.

In conclusion, CMV elicits the emergence of an unconventional T-cell subpopulation that does not have intrinsic alloreactivity but has the potential to be activated by alloantibodies through CD16. These  $\gamma\delta$  T cells are able to control CMV and to limit tumor occurrence but also appear as new players in complement-independent AMR. Since they are found selectively in peritubular capillaries in acute AMR their detection could be used as a clinical marker to help diagnosis, particularly in C4d-negative humoral rejection. More easily, CD16<sup>pos</sup> V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T-cell expansion in peripheral blood can also be monitored and considered as a poor prognostic factor in DSA-positive patients.

## METHODS

This study was approved by the Institutional Review Board of the Bordeaux Hospital.

### Cell lines and HLA-typing

Foreskin fibroblasts (FSF) were prepared in the laboratory with the help of Catherine Pain (INSERM U1035, Bordeaux) by a classical tissue-dissociation procedure. Fetal lung fibroblasts (MRC5) were purchased from Eurobio. Immortalized venous endothelial cells (IVEC) were obtained from human umbilical vein endothelial cells immortalized with SV40 virus and kindly provided by the Pasteur Institute<sup>64</sup>. DNA HLA Class I typing of cell lines was performed using the routine LabType<sup>®</sup> SSO HR assay (One Lambda, Canoga Park, CA) following the manufacturer's instructions. Results of HLA-typing were for FSF: A\*24,\*29; B\*35,\*51, for MRC5: A\*02,\*29; B\*07,\*44, and for IVEC: A\*02,\*30; B\*07,\*44.

### **Characterization of Anti-HLA antibodies in patient sera**

Sera from sensitized KTRs were tested for HLA Class I antibodies using the single antigen bead (SAB) assay (LabScreen<sup>®</sup> single antigen LS1A04 and LS2A01, One Lambda) on a Luminex<sup>®</sup> platform (Luminex BV). Manufacturer's instructions were followed. For any given antigen, the mean fluorescence intensity (MFI) was the average of all beads harboring the different alleles of the same antigen (Table 1). For any given serum, we calculated the global MFI of the antibodies specific for the HLA-A and HLA-B expressed by each cell line used in the *in vitro* assay (cell line specific antibodies (CLSA)).

### **Analysis of DSA binding to cell lines by flow cytometry**

Ten microliters of sera from sensitized KTRs made up to 50 $\mu$ L with PBS was incubated with the fibroblastic or endothelial cell lines at 4°C for 20 minutes. A secondary FITC-conjugated goat anti-human anti-Fc IgG (Immunotech, 1/200) was added for 15 minutes. Cells were then washed and analyzed with the FACScanto Cytometer (BD Biosciences). A pool of immunized sera (Pool S+) covering all HLA specificities was used as a positive control.

### **Generation of polyclonal $\gamma\delta$ T-cell lines**

A long-term CD16<sup>pos</sup> V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T-cell line was selected on the basis of persistent expression of CD16 in culture as follows: V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T cells from PBMCs of a CMV-seropositive blood donor were sorted on a FACSAria (BD Biosciences) using a combination of anti-CD3, anti-V $\delta$ 2, and anti-TCR $\gamma\delta$ . The sorted V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T cells were expanded in culture in RPMI medium supplemented with 10% human serum, 1000 U/mL rIL2 (Chiron), 1  $\mu$ g/mL leuco-agglutinin (Sigma-Aldrich), and irradiated allogeneic PBMCs (35 Gy). After 1 month in culture, the V $\delta$ 2<sup>neg</sup> T-cell line was phenotyped for CD16 expression. CD16<sup>neg</sup> and CD16<sup>pos</sup> cells were sorted by flow cytometry, expanded as previously described, and then used in the experiments.

### **Phenotyping of $\gamma\delta$ T cells by flow cytometry**

MAbs directed against the following molecules were purchased from Beckman-Coulter: TCR-C $\delta$ , TCR-V $\delta$ 2, and CD16. mAbs directed against CD3, perforin, and granzyme B were from BD Biosciences. Staining was performed on  $\gamma\delta$  T-cell lines as previously described<sup>23</sup> and analyzed on a FACScanto cytometer (BD Biosciences) with the use of the FACSDiva software, version 6.1.2 (BD

Biosciences). At least 10,000 T lymphocytes were analyzed for 6-color staining. Permeabilization and fixation of cells for intracellular staining were performed as described elsewhere<sup>31</sup>.

### **Cell cytotoxicity assays**

Cytolytic activity of  $\gamma\delta$  T cells was measured by a standard <sup>51</sup>Chrome release assay<sup>32</sup>. Target cells (FSF, MRC5, IVEC) were labeled with <sup>51</sup>Cr (1.85 MBq/10<sup>6</sup> cells) for 1 h at 37°C, washed, and incubated with selected sera for 20 minutes. After washes, 3,000 cells/well were incubated in triplicate with  $\gamma\delta$  T cells at the indicated effector:target ratio. After 4 hours at 37°C, <sup>51</sup>Cr released in the supernatant was measured. The percentage of specific lysis was calculated as [(experimental release – spontaneous release)/(maximum release – spontaneous release)] x100. The spontaneous <sup>51</sup>Cr release from target cells in medium alone was always <15% of the control maximal <sup>51</sup>Cr release obtained with 1% Triton X-100. In some experiments,  $\gamma\delta$  T effector cells were pre-incubated in plates at 37°C for 2.5 h in 50  $\mu$ L of culture medium with different concentrations of concanamycin A (CMA, Sigma Aldrich-Calbiochem), which is known to prevent cytotoxic granule content release through a pH increase of the vacuoles<sup>65</sup>.

### ***In situ* immunofluorescence studies**

Renal tissues were from selected graft biopsy fragments exhibiting different type of acute rejections (acute antibody-mediated rejection (acute AMR), and acute T-cell mediated rejection (acute TCMR)). Kidney biopsies were distinguished according to the status of the kidney transplant recipients related to the CMV: those coming from patients who had never experienced CMV infection (seronegative on the day of the graft and no infection after transplantation) and those from patients who had been in contact with CMV prior to (R+) or after transplantation (R- with CMV primoinfection). All kidney biopsies were graded according to the last Banff criteria meeting report<sup>4</sup>. Immunofluorescence was performed on frozen graft-biopsy fragments using rabbit anti-CD31 mAb (clone ab28364, 1/75, Abcam) to stain endothelial cells, and mouse pan- $\gamma\delta$  mAb (clone IMMU510, 1/50, Beckman-Coulter). Differential revelation was performed using Alexa-488-coupled anti-rabbit Ab (green staining), and Alexa-533-coupled anti-mouse (red staining), both from Invitrogen. Nuclei were stained with 0.5  $\mu$ g/mL DAPI (blue staining). Staining analysis was done on an inverted Leica DMI 6000 microscope (Leica Microsystems,) equipped with a Quantum camera (Roper Scientific Evry France). The objective used was a HCX PL Fluotar 40x dry 0.75 NA. Cumulated images of the entire cortex of the biopsy (defined as the region inside the renal capsule and outside the medulla) were obtained and analyzed by Image J, MetaMorph software. Cellular infiltrate (expressed in number of stained cells per

mm<sup>2</sup>) was assessed in high-power fields on the entire cortical region of biopsies by observers blinded to the origin of the slides. Cells were considered to be part of the capillaritis using Banff's criteria <sup>9</sup>.

## **Patients**

Twenty-one sensitized KTRs transplanted with anti-HLA DSA (determined by both the SAB assay and the flow cytometric crossmatch) were analyzed retrospectively for this study in order to appraise the potential association between  $\gamma\delta$  T cells and the incidence of biopsy-proven acute rejection and 1-year estimated-GFR (calculated using the modification of the diet in renal disease (MDRD) formula <sup>66</sup>). A control group of patients without DSA was selected in our cohort. From 1998 to 2002, we retrospectively identified 162 consecutive non-sensitized KTR patients transplanted with a negative flow cytometric crossmatch, who had not developed DSA at 1-year post-transplant. For the purpose of the study, d0 and year one sera were retested for Class I and Class II antibodies using SAB assays (LabScreen<sup>®</sup> single antigen LS2A01 for class II, One Lambda).  $\gamma\delta$  T-cell subsets are measured routinely in our center in all transplant recipients.

## **Statistical analysis.**

Graphs of linear regression were performed using the Statview software (Abacus concepts, Berkeley). Cellular infiltrates are expressed as means, range. The statistical differences between groups of AAMR and ACMR were tested with the unpaired Mann-Whitney test.

## **Acknowledgments**

We thank the Bordeaux Imaging Center for microscopy analysis, the SFR TransBioMed Flow Cytometry facility for phenotyping analysis and cell sorting, the technicians from the Laboratory of Immunology and Immunogenetics at Bordeaux University Hospital for their expert assistance, Catherine Rio for clinical data collection, the nurses of the Department of Nephrology for patient care, the Etablissement Français du Sang Aquitaine Limousin for providing blood samples, and M. Capone and C. Behr for thoughtful discussions. This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20110421287) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-12-BSV3-0024-02). TB was supported by CNRS and CHU Bordeaux.

**Disclosures.** None.

## References

1. Colvin, RB & Smith, RN: Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol*, 5: 807-17, 2005.
2. Lee, PC, Zhu, L, Terasaki, PI & Everly, MJ: HLA-specific antibodies developed in the first year posttransplant are predictive of chronic rejection and renal graft loss. *Transplantation*, 88: 568-74, 2009.
3. Einecke, G, Sis, B, Reeve, J, Mengel, M, Campbell, PM, Hidalgo, LG, Kaplan, B & Halloran, PF: Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant*, 9: 2520-31, 2009.
4. Mengel, M, Sis, B, Haas, M, Colvin, RB, Halloran, PF, Racusen, LC, Solez, K, Cendales, L, Demetris, AJ, Drachenberg, CB, Farver, CF, Rodriguez, ER, Wallace, WD & Glotz, D: Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*, 12: 563-70, 2012.
5. Loupy, A, Hill, GS & Jordan, SC: The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat Rev Nephrol*, 8: 348-57, 2012.
6. Bentall, A, Cornell, LD, Gloor, JM, Park, WD, Gandhi, MJ, Winters, JL, Chedid, MF, Dean, PG & Stegall, MD: Five-year outcomes in living donor kidney transplants with a positive crossmatch. *Am J Transplant*, 13: 76-85, 2013.
7. Feucht, HE, Schneeberger, H, Hillebrand, G, Burkhardt, K, Weiss, M, Riethmuller, G, Land, W & Albert, E: Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int*, 43: 1333-8, 1993.
8. Racusen, LC, Colvin, RB, Solez, K, Mihatsch, MJ, Halloran, PF, Campbell, PM, Cecka, MJ, Cosyns, JP, Demetris, AJ, Fishbein, MC, Fogo, A, Furness, P, Gibson, IW, Glotz, D, Hayry, P, Hunsickern, L, Kashgarian, M, Kerman, R, Magil, AJ, Montgomery, R, Morozumi, K, Nicleleit, V, Randhawa, P, Regele, H, Seron, D, Seshan, S, Sund, S & Trpkov, K: Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant*, 3: 708-14, 2003.
9. Solez, K, Colvin, RB, Racusen, LC, Haas, M, Sis, B, Mengel, M, Halloran, PF, Baldwin, W, Banfi, G, Collins, AB, Cosio, F, David, DS, Drachenberg, C, Einecke, G, Fogo, AB, Gibson, IW, Glotz, D, Iskandar, SS, Kraus, E, Lerut, E, Mannon, RB, Mihatsch, M, Nankivell, BJ, Nicleleit, V, Papadimitriou, JC, Randhawa, P, Regele, H, Renaudin, K, Roberts, I, Seron, D, Smith, RN & Valente, M: Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*, 8: 753-60, 2008.
10. Sis, B, Mengel, M, Haas, M, Colvin, RB, Halloran, PF, Racusen, LC, Solez, K, Baldwin, WM, 3rd, Bracamonte, ER, Broecker, V, Cosio, F, Demetris, AJ, Drachenberg, C, Einecke, G, Gloor, J, Glotz, D, Kraus, E, Legendre, C, Liapis, H, Mannon, RB, Nankivell, BJ, Nicleleit, V, Papadimitriou, JC, Randhawa, P, Regele, H, Renaudin, K, Rodriguez, ER, Seron, D, Seshan, S, Suthanthiran, M, Wasowska, BA, Zachary, A & Zeevi, A: Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant*, 10: 464-71, 2010.
11. Mengel, M, Husain, S, Hidalgo, L & Sis, B: Phenotypes of antibody-mediated rejection in organ transplants. *Transpl Int*, 25: 611-22, 2012.

12. Loupy, A, Hill, GS, Suberbielle, C, Charron, D, Anglicheau, D, Zuber, J, Timsit, MO, Duong, JP, Bruneval, P, Vernerey, D, Empana, JP, Jouven, X, Nochy, D & Legendre, CH: Significance of C4d Banff Scores in Early Protocol Biopsies of Kidney Transplant Recipients with Preformed Donor-Specific Antibodies (DSA). *Am J Transplant*, 11: 56-65, 2011.
13. Everly, MJ, Everly, JJ, Arend, LJ, Brailey, P, Susskind, B, Govil, A, Rike, A, Roy-Chaudhury, P, Mogilishetty, G, Alloway, RR, Tevar, A & Woodle, ES: Reducing de novo donor-specific antibody levels during acute rejection diminishes renal allograft loss. *Am J Transplant*, 9: 1063-71, 2009.
14. Cosio, FG, Lager, DJ, Lorenz, EC, Amer, H, Gloor, JM & Stegall, MD: Significance and implications of capillaritis during acute rejection of kidney allografts. *Transplantation*, 89: 1088-94, 2010.
15. Sis, B, Jhangri, GS, Riopel, J, Chang, J, de Freitas, DG, Hidalgo, L, Mengel, M, Matas, A & Halloran, PF: A new diagnostic algorithm for antibody-mediated microcirculation inflammation in kidney transplants. *Am J Transplant*, 12: 1168-79, 2012.
16. Loupy, A, Suberbielle-Boissel, C, Hill, GS, Lefaucheur, C, Anglicheau, D, Zuber, J, Martinez, F, Thervet, E, Mejean, A, Charron, D, Duong van Huyen, JP, Bruneval, P, Legendre, C & Nochy, D: Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am J Transplant*, 9: 2561-70, 2009.
17. Hidalgo, LG, Sis, B, Sellares, J, Campbell, PM, Mengel, M, Einecke, G, Chang, J & Halloran, PF: NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*, 10: 1812-22, 2010.
18. Hidalgo, LG, Sellares, J, Sis, B, Mengel, M, Chang, J & Halloran, PF: Interpreting NK cell transcripts versus T cell transcripts in renal transplant biopsies. *Am J Transplant*, 12: 1180-91, 2012.
19. Braakman, E, van de Winkel, JG, van Krimpen, BA, Jansze, M & Bolhuis, RL: CD16 on human gamma delta T lymphocytes: expression, function, and specificity for mouse IgG isotypes. *Cell Immunol*, 143: 97-107, 1992.
20. Pouteil-Noble, C, Ecochard, R, Landrivon, G, Donia-Maged, A, Tardy, JC, Bosshard, S, Colon, S, Betuel, H, Aymard, M & Touraine, JL: Cytomegalovirus infection--an etiological factor for rejection? A prospective study in 242 renal transplant patients. *Transplantation*, 55: 851-7, 1993.
21. Humar, A, Gillingham, KJ, Payne, WD, Dunn, DL, Sutherland, DE & Matas, AJ: Association between cytomegalovirus disease and chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation*, 68: 1879-83, 1999.
22. Dzabic, M, Bojakowski, K, Kurzejamska, E, Styczynski, G, Andziak, P, Soderberg-Naucler, C & Religa, P: Significance of cytomegalovirus infection in the failure of native arteriovenous fistula. *Clin Microbiol Infect*, 18: E5-7, 2012.
23. Dechanet, J, Merville, P, Lim, A, Retiere, C, Pitard, V, Lafarge, X, Michelson, S, Meric, C, Hallet, MM, Kourilsky, P, Potaux, L, Bonneville, M & Moreau, JF: Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest*, 103: 1437-49, 1999.

24. Puig-Pey, I, Bohne, F, Benitez, C, Lopez, M, Martinez-Llordella, M, Oppenheimer, F, Lozano, JJ, Gonzalez-Abraldes, J, Tisone, G, Rimola, A & Sanchez-Fueyo, A: Characterization of gammadelta T cell subsets in organ transplantation. *Transpl Int*, 23: 1045-55, 2010.
25. Couzi, L, Lafarge, X, Pitard, V, Neau-Cransac, M, Dromer, C, Billes, MA, Lacaille, F, Moreau, JF, Merville, P & Dechanet-Merville, J: Gamma-delta T cell expansion is closely associated with cytomegalovirus infection in all solid organ transplant recipients. *Transpl Int*, 24: e40-2, 2011.
26. Couzi, L, Pitard, V, Netzer, S, Garrigue, I, Lafon, ME, Moreau, JF, Taupin, JL, Merville, P & Dechanet-Merville, J: Common features of gammadelta T cells and CD8(+) alphabeta T cells responding to human cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *J Infect Dis*, 200: 1415-24, 2009.
27. de Villartay, JP, Lim, A, Al-Mousa, H, Dupont, S, Dechanet-Merville, J, Coumau-Gatbois, E, Gougeon, ML, Lemainque, A, Eidenschenk, C, Jouanguy, E, Abel, L, Casanova, JL, Fischer, A & Le Deist, F: A novel immunodeficiency associated with hypomorphic RAG1 mutations and CMV infection. *J Clin Invest*, 115: 3291-9, 2005.
28. Ehl, S, Schwarz, K, Enders, A, Duffner, U, Pannicke, U, Kuhr, J, Mascart, F, Schmitt-Graeff, A, Niemeyer, C & Fisch, P: A variant of SCID with specific immune responses and predominance of gamma delta T cells. *J Clin Invest*, 115: 3140-8, 2005.
29. Vermijlen, D, Brouwer, M, Donner, C, Liesnard, C, Tackoen, M, Van Rysselberge, M, Twite, N, Goldman, M, Marchant, A & Willems, F: Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. *J Exp Med*, 207: 807-21, 2010.
30. Knight, A, Madrigal, AJ, Grace, S, Sivakumaran, J, Kottaridis, P, Mackinnon, S, Travers, PJ & Lowdell, MW: The role of Vdelta2-negative gamma-delta T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood*, 2010.
31. Pitard, V, Roumanes, D, Lafarge, X, Couzi, L, Garrigue, I, Lafon, ME, Merville, P, Moreau, JF & Dechanet-Merville, J: Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood*, 112: 1317-24, 2008.
32. Halary, F, Pitard, V, Dlubek, D, Krzysiek, R, de la Salle, H, Merville, P, Dromer, C, Emilie, D, Moreau, JF & Dechanet-Merville, J: Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma} {delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med*, 201: 1567-78, 2005.
33. Couzi, L, Levailant, Y, Jamai, A, Pitard, V, Lassalle, R, Martin, K, Garrigue, I, Hawchar, O, Siberchicot, F, Moore, N, Moreau, JF, Dechanet-Merville, J & Merville, P: Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*, 21: 181-8, 2010.
34. Lafarge, X, Merville, P, Cazin, MC, Berge, F, Potaux, L, Moreau, JF & Dechanet-Merville, J: Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis*, 184: 533-41, 2001.
35. Couzi, L, Pitard, V, Sicard, X, Garrigue, I, Hawchar, O, Merville, P, Moreau, JF & Dechanet-Merville, J: Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human gammadelta T cells expressing CD16 (FcgammaRIIIa). *Blood*, 119: 1418-27, 2012.

36. Sis, B, Einecke, G, Chang, J, Hidalgo, LG, Mengel, M, Kaplan, B & Halloran, PF: Cluster analysis of lesions in nonselected kidney transplant biopsies: microcirculation changes, tubulointerstitial inflammation and scarring. *Am J Transplant*, 10: 421-30, 2010.
37. Couzi, L, Araujo, C, Guidicelli, G, Bachelet, T, Moreau, K, Morel, D, Robert, G, Wallerand, H, Moreau, JF, Taupin, JL & Merville, P: Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. *Transplantation*, 91: 527-35, 2011.
38. Willcox, CR, Pitard, V, Netzer, S, Couzi, L, Salim, M, Silberzahn, T, Moreau, JF, Hayday, AC, Willcox, BE & Dechanet-Merville, J: Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat Immunol*, 13: 872-9, 2012.
39. Xu, B, Pizarro, JC, Holmes, MA, McBeth, C, Groh, V, Spies, T & Strong, RK: Crystal structure of a gammadelta T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 2414-9, 2011.
40. Shin, S, El-Diwany, R, Schaffert, S, Adams, EJ, Garcia, KC, Pereira, P & Chien, YH: Antigen recognition determinants of gammadelta T cell receptors. *Science*, 308: 252-5, 2005.
41. Das, H, Groh, V, Kuijl, C, Sugita, M, Morita, CT, Spies, T & Bukowski, JF: MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity*, 15: 83-93, 2001.
42. Toyoda, M, Petrosian, A & Jordan, SC: Immunological characterization of anti-endothelial cell antibodies induced by cytomegalovirus infection. *Transplantation*, 68: 1311-8, 1999.
43. Costa, C, Touscoz, GA, Bergallo, M, Terlizzi, ME, Astegiano, S, Sidoti, F, Sinesi, F, Segoloni, GP & Cavallo, R: Non-organ-specific and anti-endothelial antibodies in relation to CMV infection and acute rejection in renal transplant recipients. *Clin Transplant*, 24: 488-92, 2010.
44. Sigdel, TK, Li, L, Tran, TQ, Khatri, P, Naesens, M, Sansanwal, P, Dai, H, Hsieh, SC & Sarwal, MM: Non-HLA antibodies to immunogenic epitopes predict the evolution of chronic renal allograft injury. *J Am Soc Nephrol*, 23: 750-63, 2012.
45. Dragun, D, Philippe, A & Catar, R: Role of non-HLA antibodies in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*, 17: 440-5, 2012.
46. Clayberger, C: Cytolytic molecules in rejection. *Curr Opin Organ Transplant*, 14: 30-3, 2009.
47. Liptak, P, Kemeny, E, Morvay, Z, Szederkenyi, E, Szenohradszky, P, Marofka, F, Toldi, J, Exner, M & Ivanyi, B: Peritubular capillary damage in acute humoral rejection: an ultrastructural study on human renal allografts. *Am J Transplant*, 5: 2870-6, 2005.
48. Papadimitriou, JC, Drachenberg, CB, Munivenkatappa, R, Ramos, E, Nogueira, J, Sailey, C, Klassen, DK & Haririan, A: Glomerular inflammation in renal allografts biopsies after the first year: cell types and relationship with antibody-mediated rejection and graft outcome. *Transplantation*, 90: 1478-85, 2010.
49. Papadimitriou, JC, Drachenberg, CB, Ramos, E, Kukuruga, D, Klassen, DK, Ugarte, R, Nogueira, J, Cangro, C, Weir, MR & Haririan, A: Antibody-mediated allograft rejection: morphologic spectrum and serologic correlations in surveillance and for cause biopsies. *Transplantation*, 95: 128-36, 2013.

50. Nickel, P, Bold, G, Presber, F, Biti, D, Babel, N, Kreutzer, S, Pratschke, J, Schonemann, C, Kern, F, Volk, HD & Reinke, P: High levels of CMV-IE-1-specific memory T cells are associated with less alloimmunity and improved renal allograft function. *Transpl Immunol*, 20: 238-42, 2009.
51. Reischig, T, Jindra, P, Hes, O, Svecova, M, Klaboch, J & Treska, V: Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Am J Transplant*, 8: 69-77, 2008.
52. Tong, CY, Bakran, A, Peiris, JS, Muir, P & Herrington, CS: The association of viral infection and chronic allograft nephropathy with graft dysfunction after renal transplantation. *Transplantation*, 74: 576-8, 2002.
53. Kliem, V, Fricke, L, Wollbrink, T, Burg, M, Radermacher, J & Rohde, F: Improvement in long-term renal graft survival due to CMV prophylaxis with oral ganciclovir: results of a randomized clinical trial. *Am J Transplant*, 8: 975-83, 2008.
54. Smith, JM, Corey, L, Bittner, R, Finn, LS, Healey, PJ, Davis, CL & McDonald, RA: Subclinical viremia increases risk for chronic allograft injury in pediatric renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*, 21: 1579-86, 2010.
55. Sagedal, S, Hartmann, A, Nordal, KP, Osnes, K, Leivestad, T, Foss, A, Degre, M, Fauchald, P & Rollag, H: Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int*, 66: 329-37, 2004.
56. Helanterä, I, Koskinen, P, Finne, P, Loginov, R, Kyllönen, L, Salmela, K, Gronhagen-Riska, C & Lautenschlager, I: Persistent cytomegalovirus infection in kidney allografts is associated with inferior graft function and survival. *Transpl Int*, 19: 893-900, 2006.
57. Li, Y, Koshiba, T, Yoshizawa, A, Yonekawa, Y, Masuda, K, Ito, A, Ueda, M, Mori, T, Kawamoto, H, Tanaka, Y, Sakaguchi, S, Minato, N, Wood, KJ & Tanaka, K: Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant*, 4: 2118-25, 2004.
58. Martinez-Llordella, M, Lozano, JJ, Puig-Pey, I, Orlando, G, Tisone, G, Lerut, J, Benitez, C, Pons, JA, Parrilla, P, Ramirez, P, Bruguera, M, Rimola, A & Sanchez-Fueyo, A: Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest*, 118: 2845-57, 2008.
59. Zhao, X, Li, Y, Ohe, H, Nafady-Hego, H, Uemoto, S, Bishop, GA & Koshiba, T: Intra-graft Vdelta1 gamma delta T cells with a unique T-cell receptor are closely associated with pediatric semiallogeneic liver transplant tolerance. *Transplantation*, 95: 192-202, 2013.
60. Sis, B, Jhangri, GS, Bunnag, S, Allanach, K, Kaplan, B & Halloran, PF: Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant*, 9: 2312-23, 2009.
61. Sellares, J, Reeve, J, Loupy, A, Mengel, M, Sis, B, Skene, A, de Freitas, DG, Kreepala, C, Hidalgo, LG, Famulski, KS & Halloran, PF: Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. *Am J Transplant*, 13: 971-83, 2013.

62. Toyoda, M, Ge, S, Suviolahti, E, Pichurin, P, Shin, B, Pao, A, Vo, A, Deer, N, Aguiluz, A, Karasyov, A & Jordan, SC: IFN $\gamma$  production by NK cells from HLA-sensitized patients after in vitro exposure to allo-antigens. *Transpl Immunol*, 26: 107-12, 2012.
63. Homs, S, Mansour, H, Desvaux, D, Diet, C, Hazan, M, Buchler, M, Lebranchu, Y, Buob, D, Badoual, C, Matignon, M, Audard, V, Lang, P & Grimbert, P: Predominant Th1 and cytotoxic phenotype in biopsies from renal transplant recipients with transplant glomerulopathy. *Am J Transplant*, 9: 1230-6, 2009.
64. Vicart, P, Testut, P, Schwartz, B, Llorens-Cortes, C, Perdomo, JJ & Paulin, D: Cell adhesion markers are expressed by a stable human endothelial cell line transformed by the SV40 large T antigen under vimentin promoter control. *J Cell Physiol*, 157: 41-51, 1993.
65. Kataoka, T, Shinohara, N, Takayama, H, Takaku, K, Kondo, S, Yonehara, S & Nagai, K: Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol*, 156: 3678-86, 1996.
66. Klahr, S: The modification of diet in renal disease study. *N Engl J Med*, 320: 864-6, 1989.

## Figure Legends

**Figure 1. Binding of anti-class I HLA antibodies from sensitized kidney transplant recipients sera on fibroblastic and endothelial cells.** (A) Representative binding on FSF of IgG from different sera using a goat anti-human IgG antibody coupled to FITC and analyzed by flow cytometry (numbers indicate the MFI). S1 = non-sensitized serum, S9 = sensitized serum without cell-line-specific antibodies (CLSA), Pool S+ = pool of sensitized sera, S3 and S4 = sera containing CLSA. (B) MFI obtained with each serum on all three cell lines. Data are representative of three different experiments. (C) Linear regression analysis of CLSA MFI analyzed by Single Antigen Bead assay versus the MFI of the IgG binding analyzed by flow cytometry on the three cell lines.

**Figure 2. CLSA-dependent cytotoxicity (ADCC) of CD16<sup>pos</sup>  $\gamma\delta$  T cells against endothelial and fibroblastic cells.** (A) FSF, MRC5, and IVEC cell lines were labeled with <sup>51</sup>Cr and pre-incubated or not with sera S3, S4, S7, and S8 that contained different levels of CLSA (indicated + to +++) and sera that did not (indicated -). Ability of the CD16<sup>pos</sup>  $\gamma\delta$  T-cell line to induce lysis of pre-incubated cell lines was evaluated by <sup>51</sup>Cr release in the supernatant. Results are the mean specific lysis of culture triplicates from three independent experiments. SD was always <15% of the mean value (not shown). (B) Linear regression analysis between the MFI of IgG binding analyzed by flow cytometry on the three cell lines and the percentage of specific lysis (FSF: p=0.01, r<sup>2</sup>=0.83; IVEC: p=0.04, r<sup>2</sup>=0.93; MRC5: p=0.14, r<sup>2</sup>=0.74).

**Figure 3. CLSA-dependent ADCC by  $\gamma\delta$  T cells depends on CD16 and perforin.** (A) CD16<sup>pos</sup> (left panel) or CD16<sup>neg</sup> (right panel)  $\gamma\delta$  T-cell-mediated lysis of the FSF primary cell line pre-incubated with the serum S8 (+++) or S1 (-) in the presence or absence of a blocking anti-CD16 mAb or control mAb. (B) Expression of intracellular granzyme B and perforin in CD16<sup>pos</sup>  $\gamma\delta$  T cells. Numbers indicate percentages of positive cells. (C) As in (A) with the addition or not of indicated concentrations of concanamycin A (CMA). Viability of  $\gamma\delta$  T cells was >80% even after an incubation of 7 hours with the highest concanamycin A concentration (data not shown). Data are representative of three different experiments.

**Figure 4.  $\gamma\delta$  T cells are present in antibody-mediated peritubular capillaritis and glomerulitis of CMV-infected patients.** Triple-immunofluorescence staining for CD31 (green),  $\gamma\delta$  T cells (red), and nuclei (blue) on graft biopsies from patients with acute AMR (n=10) and acute TCMR (n=13). (A)

Representative staining of  $\gamma\delta$  T cells in microcirculation lesions associated with acute AMR in peritubular capillaritis (upper panel) and in glomerulitis (lower panel). Arrows indicate  $\gamma\delta$  T cells and arrowheads indicate endothelial cells of the microcirculation. Original magnification x600. (B) Quantification of  $\gamma\delta$  T cells in peritubular capillaries and glomeruli of acute AMR or TCMR graft biopsies in CMV-experienced (CMV+, upper panels) and CMV-naïve (CMV-, lower panels) patients.

**Figure 5. Correlation of  $\gamma\delta$  T cell levels with e-GFR at 12 months post-transplant in patients with DSA.** (A) Median, 25-75<sup>th</sup> percentiles and 10-90<sup>th</sup> percentiles of  $\gamma\delta$  T-cell (right panel) or V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T-cell (left panel) percentages in patients with acute TCMR, acute AMR, or without rejection. NS: not statistically different between each group. (B) Linear regression analysis between circulating  $\gamma\delta$  T-cell percentages (right panel) or V $\delta$ 2<sup>neg</sup>  $\gamma\delta$  T-cell percentages (left panel) and the 12 month post-transplant e-GFR in KTR with DSA the day of the graft. Plain circles are CMV-experienced patients and open circles are CMV-naïve patients. (C) Same analysis as in (B) in anti-HLA non-sensitized KTRs.

**Table 1. Class I HLA typing of FSF, IVEC, and MRC5 and characterization of each cell-line-specific class I HLA antibodies (CLSA) for 10 sera, using the class I SAB assay.**

<b>FSF</b>	<b>A*24</b>	<b>A*29</b>	<b>B*35</b>	<b>B*51</b>	
	MFI SAB A*24	MFI SAB A*29	MFI SAB B*35	MFI SAB B*51	<b>Σ specific MFI</b>
S1	0	0	0	0	<b>0</b>
S2	0	0	0	0	<b>0</b>
S3	10200	7450	12250	11150	<b>41050</b>
S4	14850	10500	1030	1400	<b>27780</b>
S5	200	165	40	70	<b>475</b>
S6	30	50	350	0	<b>430</b>
S7	7600	1100	5670	0	<b>14370</b>
S8	15400	2300	12500	12200	<b>42400</b>
S9	105	210	45	90	<b>450</b>
S10	9100	0	0	0	<b>9100</b>

<b>MRC5</b>	<b>A*02</b>	<b>A*29</b>	<b>B*07</b>	<b>B*44</b>	
	MFI SAB A*02	MFI SAB A*29	MFI SAB B*07	MFI SAB B*44	<b>Σ specific MFI</b>
S1	0	0	0	0	<b>0</b>
S2	0	0	0	0	<b>0</b>
S3	10100	7450	12	3600	<b>21110</b>
S4	15000	10500	2869	0	<b>28350</b>
S5	100	165	1181	130	<b>1500</b>
S6	0	50	9	3500	<b>4000</b>
S7	4000	1100	3351	12500	<b>22150</b>
S8	0	2300	7674	10500	<b>19724</b>
S9	1000	210	10324	5000	<b>16524</b>
S10	0	0	0	0	<b>0</b>

<b>IVEC</b>	<b>A*02</b>	<b>A*3001</b>	<b>B*07</b>	<b>B*4403</b>	
	MFI SAB A*02	MFI SAB A*3001	MFI SAB B*07	MFI SAB B*4403	<b>Σ specific MFI</b>
S1	0	0	0	0	<b>0</b>
S2	0	0	0	0	<b>0</b>
S3	10100	7301	12	2781	<b>20194</b>
S4	15000	9021	2869	13	<b>26903</b>
S5	100	4	1181	18	<b>1303</b>
S6	0	28	9	2143	<b>2180</b>
S7	4000	3614	3351	11469	<b>22434</b>
S8	0	4471	7674	9890	<b>22035</b>
S9	1000	21	10324	4176	<b>15521</b>
S10	0	634	0	0	<b>634</b>

MFI, Mean fluorescence index; SAB, Single Antigen Bead assay,

**Table 2. Characteristics of the 162 kidney-transplant recipients without DSA separated according to the occurrence of TCMR (no AMR was observed in this cohort).**

	<b>TCMR (n=23)</b>	<b>No Rejection (n=139)</b>	<b>p</b>	<b>Total</b>
Recipient age at the time of graft, years	47 [16-70]*	45 [20-58]	0.7	47 [16-70]
Male/Female	17/6	98/41	0.6	115/47
<b>Transplantation condition</b>				
Donor age, years	38 [7-68]	44 [21-64]	0.08	39 [7-68]
Expanded criteria donor (%)	5 (22%)**	21 (15%)	0.06	26 (16%)
Ischemia time, hours	21 [5-35]	21 [8-37]	0.9	21 [5-37]
Delayed graft function	7 (30%)	24 (17%)	0.1	31 (19%)
<b>Immunological parameters at the graft</b>				
HLA mismatch: A-B-DR	3 [1-5]	3 [0-6]	0.7	3 [0-6]
<b>Induction immunosuppressive treatment</b>				
Tacrolimus/Cyclosporine	8/15	69/70	0.2	77/85
Mycophenolate Mofetil/Azathioprine	20/3	121/18	0.9	141/21
ATG/anti-IL2R Abs/No induction	2/14/7	11/67/61	0.6	13/81/68
<b>CMV status</b>				
Pre-graft CMV infection	11 (48%)	71 (51%)	0.6	82 (51%)
Post-graft CMV infection	4 (17%)	35 (26%)	0.5	39 (24%)
Median $\gamma\delta$ TL, % [Min-Max]	3 [0-16.9]	3.8 [0.6-25.7]	0.3	3.75 [0-25.7]
Median $V\delta 2^{\text{neg}}$ $\gamma\delta$ TL, % [Min-Max]	1.79 [0-10.3]	2.2 [0.1-24.6]	0.3	2.15 [0-24.6]

\*Median [range], \*\* n (%)

Abbreviation: TCMR, acute T-cell-mediated rejection; ATG, anti-thymocyte polyclonal Abs; CMV, cytomegalovirus; DSA, donor-specific antibodies; IVIG, intravenous immunoglobulin; MFI, mean fluorescence index; FCXM, flow cytometric crossmatch; TL, T lymphocytes.

**Table 3. Characteristics of the 21 kidney-transplant recipients with DSA according to the occurrence of rejection.**

	Acute TCMR (n=7)	Acute AMR (n=6)	No Rejection (n=8)	p
<b>Recipient age at the time of graft, years</b>	55 [22-70]	46 [33-61]	52 [25-64]	0.5
<b>Male/Female</b>	2/5	4/2	4/4	0.4
<b>Risk factors of HLA sensitization</b>				
History of blood transfusion	4	6	6	0.3
History of pregnancy	4	2	2	0.5
>1 Kidney transplant	4	6	6	0.2
<b>Transplantation conditions</b>				
Donor age, years	56 [18-70]	46 [22-59]	48 [18-63]	0.2
Expanded criteria donor	4	2	1	0.2
Ischemia time, hours	23 [13-33]	25 [23-34]	20 [14-34]	0.2
Delayed graft function	3	1	2	0.6
<b>Immunological parameters at the graft</b>				
HLA mismatch: A-B-DR-DQ	4 [1-7]	4.5 [1-5]	4.5 [2-7]	0.9
MFI ratio of T-cell positive FCXM	2.20 [0.28-2.46]	1.98 [0.97-7.69]	1.47 [1.18-2.22]	0.4
MFI ratio of B-cell positive FCXM	2.83 [1.38-33.02]	3.84 [0.74-25.06]	3.84 [1.38-8.32]	0.9
Day 0 anti-class I DSA	4	3	4	0.9
Day 0 anti-class II DSA	3	3	4	0.9
MFI of Day 0 anti-class I DSA	600 [0-7500]	1250 [0-7900]	300 [0-9700]	0.9
MFI of Day 0 anti-class II DSA	0 [0-15800]	550 [0-3000]	500 [0-8600]	0.8
MFI of Day 0 anti-class I+II DSA	2400 [600-15800]	2750 [1100-7900]	2200 [600-9700]	0.8
<b>Induction immunosuppressive treatment</b>				
Tacrolimus/Mycophenolate mofetil	7	5	8	0.3
ATG / anti-IL2R Abs	1	6	5	0.07
Induction with IVIG	7	6	6	0.2
<b>CMV status</b>				
Pre-graft CMV infection	6	5	6	0.8
Post-graft CMV infection	4	1	2	0.2
Pre or Post-graft CMV infection	6	6	7	0.6
Median $\gamma\delta$ TL, % [Min-Max]	5.4 [2.8-9,5]	6.5 [2.9-14.3]	4.2 [1.2-12.9]	0.5
Median $V\delta 2^{neg}$ $\gamma\delta$ TL, % [Min-Max]	3.19 [1.6-9.3]	5.9 [0.6-13.6]	3.0 [0.5-12.1]	0.6

\*Median [range]

Abbreviation: AMR, acute antibody-mediated rejection; TCMR, acute T-cell-mediated rejection; ATG, anti-thymocyte polyclonal Abs; CMV, cytomegalovirus ; DSA, donor-specific antibodies ; IVIG, intravenous immunoglobulin ; MFI, mean fluorescence index ; FCXM, flow cytometric crossmatch; TL, T lymphocytes.

**Supplemental Figure 1.  $\gamma\delta$  T cells within kidney experiencing acute AMR from CMV-experienced patients were found selectively in the lesions of the microcirculation whereas they were rare and located in the interstitium in kidneys from CMV-naive patients.** Triple-

immunofluorescence staining for CD31 (green),  $\gamma\delta$  (red), and nuclei (blue). Upper panel:

Representative section of an AMR biopsy from a CMV-experienced patient exhibiting a high rate of  $\gamma\delta$  T cells selectively found in contact with endothelial cells at the site of microcirculation lesions (glomerulitis and peritubular capillaritis). Lower panel: Representative section of a TCMR-biopsy from a CMV-naive patient with few  $\gamma\delta$  T cells in the intersitium. Arrows indicate instances of  $\gamma\delta$  T cells and arrowheads indicate endothelial cell of the microcirculation. Original magnification x100.

Figure 1.

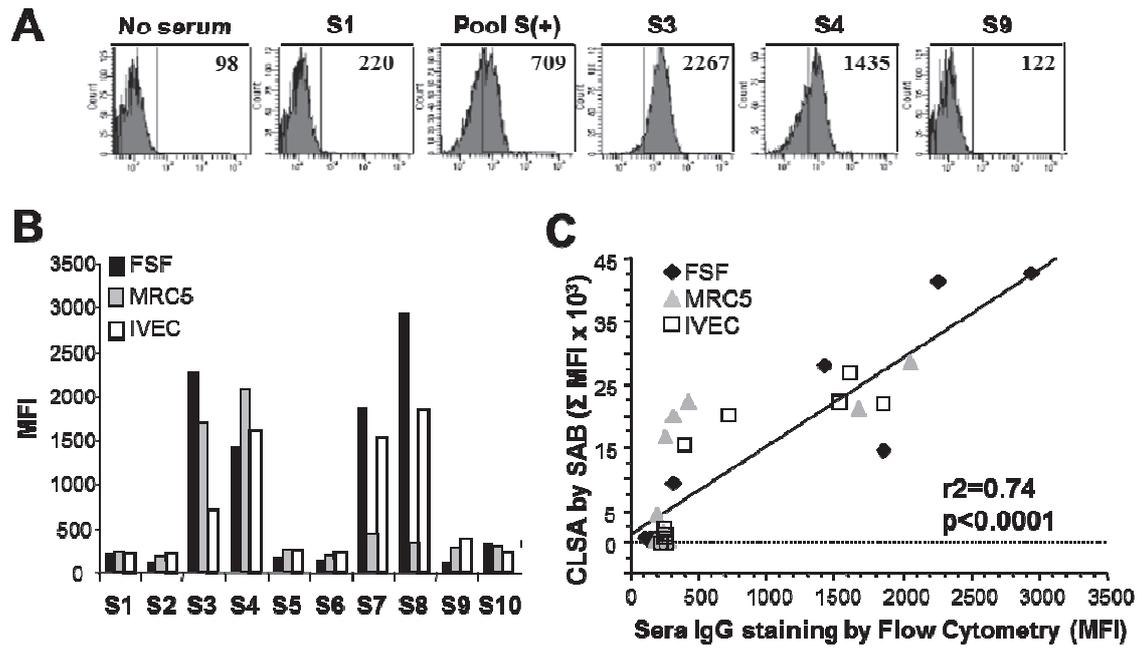


Figure 2.

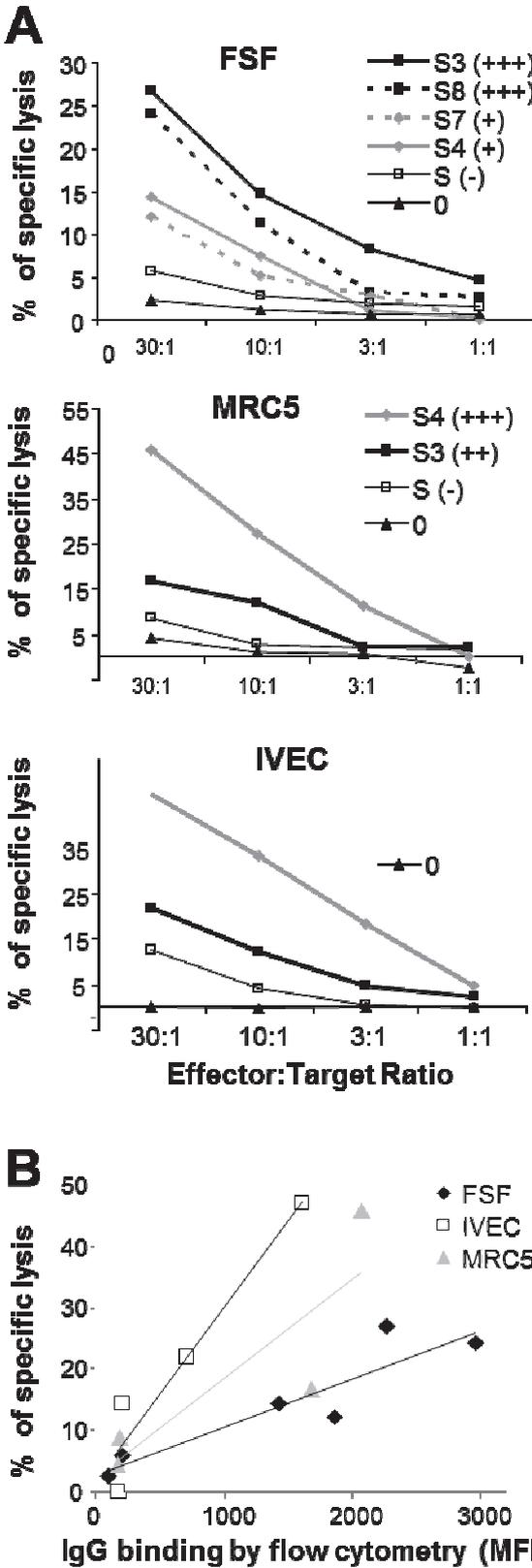


Figure 3.

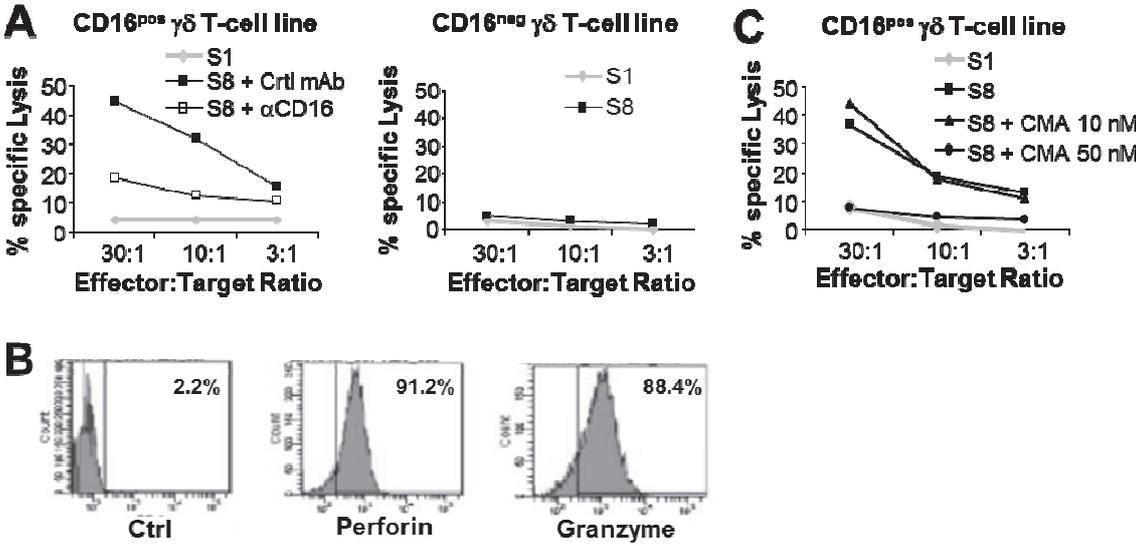
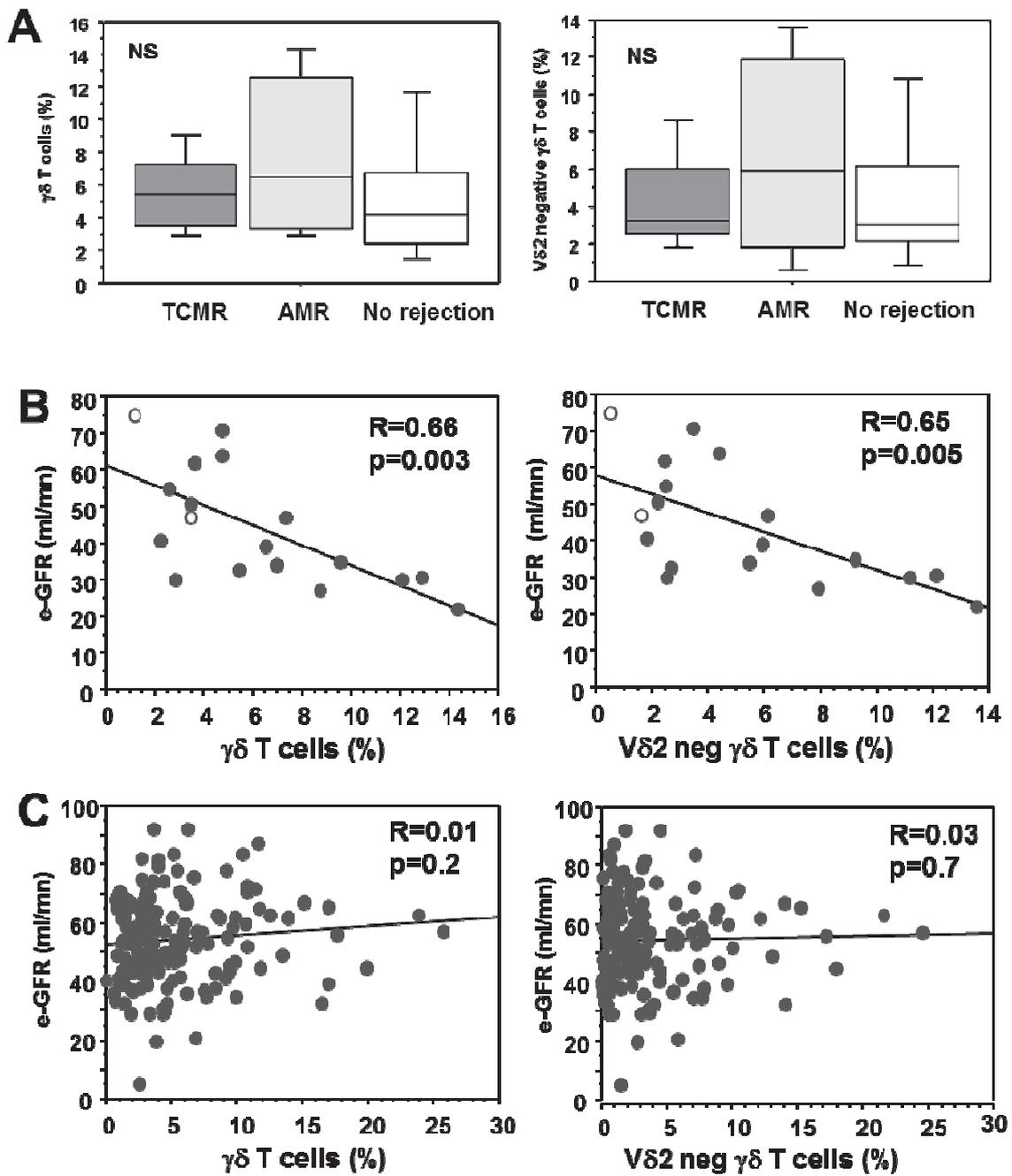
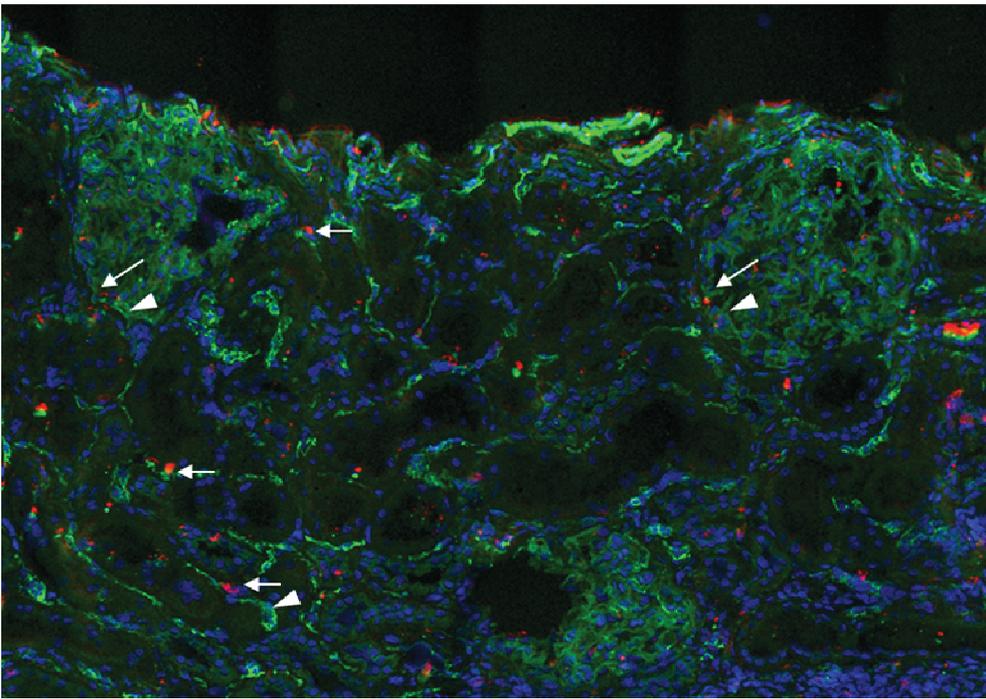


Figure 4

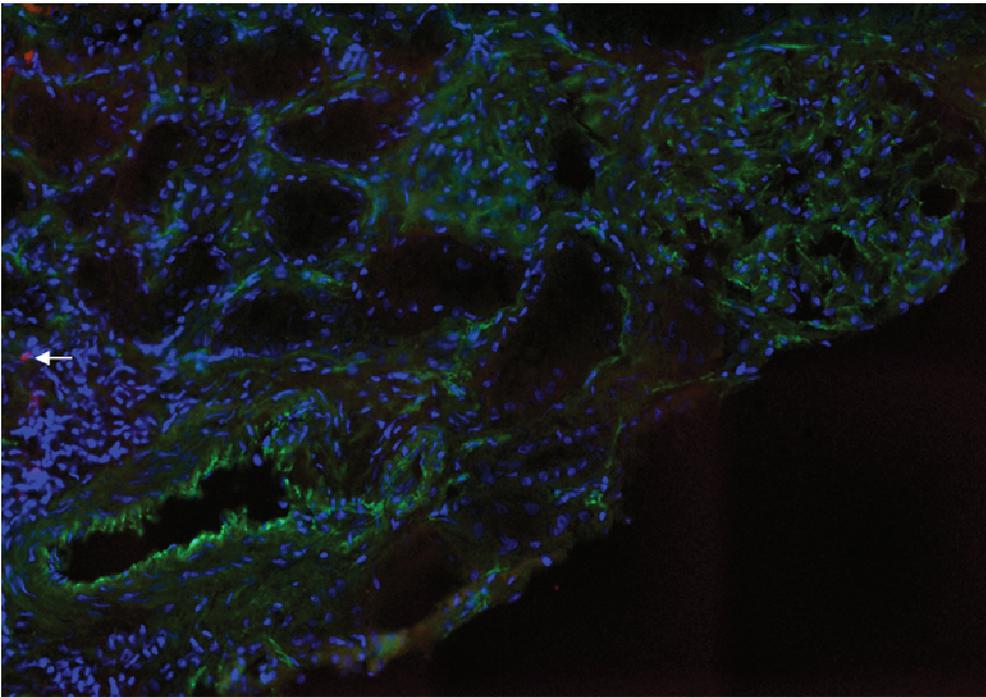


Supplemental figure S1.

**A**



**B**



#### **ARTICLE IV : Cytomegalovirus and Tumor stress surveillance by human V $\delta$ 1 $\gamma\delta$ -TCR binding to Ephrin Receptor A2.**

Accepté en **communication orale à l'European Congress of Immunology** (Glasgow 2012).

Dans ce quatrième article (rédigé en français), nous avons poursuivi la caractérisation de la bioréactivité des lymphocytes T  $\gamma\delta$  : Leur double réactivité anti-CMV et anti-tumorale en fait un candidat de choix pour les stratégies d'immunothérapie chez les transplantés d'organes soumis à ces deux types de risque du fait d'une pression immunosuppressive continue obligatoire. Au regard de nos résultats sur les capacités d'ADCC par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  en présence de DSA, cette perspective ne peut bien sûr s'envisager qu'en l'absence d'une alloréactivité directe : *a priori* tel qu'on peut le retrouver chez les patients non immunisés contre leur donneur. Toutefois, La compréhension de la biologie des cellules T  $\gamma\delta$  est handicapée par l'ignorance des spécificités antigéniques de la plupart des récepteurs cellulaires T (TCR)  $\gamma\delta$ , susceptible d'impacter à la fois leur sélection et leur activation.

C'est pourquoi la thématique du groupe du Julie Déchanet-Merville s'est focalisée sur l'identification et la caractérisation de ces antigènes. La double réactivité anti-CMV et anti-tumorale des cellules T  $\gamma\delta$  a conduit à formuler l'hypothèse que ces antigènes étaient des auto-antigènes de stress reconnus par les cellules T  $\gamma\delta$  dans le cadre d'une surveillance lymphocytaire du stress. Une stratégie globale a été développée basée sur (i) le transfert de TCR  $\gamma\delta$  issus de clones générés à partir de PBMC d'individus infectés par le CMV et présentant une double réactivité anti-virale et anti-tumorale dans des lignées « reporter » de type JRT3 (Sonia Netzer et Vincent Pitard), (ii) l'élaboration d'un panel de cellules cibles induisant la réactivité spécifique du TCR de cette lignée reporter (Lionel Couzi), (iii) puis une immunisation de souris par une de ces lignées cellulaires cibles (Vincent Pitard), (iv) la génération d'hybridomes et le screening des anticorps monoclonaux bloquant spécifiquement la réactivité dépendante du TCR de la JRT3 (Vincent Pitard) (v) et enfin l'identification de l'antigène cible par spectrométrie de masse (Ben Willcox et collègues). De cette façon EPCR a pu être identifié comme le ligand du TCR V $\gamma$ 5V $\delta$ 4.

Après immunoprécipitation par l'équipe de Ben Willcox, un autre antigène activateur d'un clone T  $\gamma\delta$  portant le TCR MAU V $\gamma$ 9V $\delta$ 1 a pu être caractérisé par une étudiante en thèse avant moi (Christelle Harly): EphA2 (Erythropoietin-producing hepatocyte kinases). EphA2 est un récepteur des éphrines, qui correspond à la plus grande famille de récepteurs à activité tyrosine kinase de l'organisme. Il est exprimé par les epithelia et les endothelia, tous les deux cibles du CMV. Il connaît des modifications en réponse au stress immunologique et a été impliqué dans les tumorigénèse, l'angiogénèse ; il a également été identifié comme récepteur membranaire de virus (VHC et HHV8). Nous montrons ici que le TCR MAU, en plus de s'activer en présence d'EphA2, est bien capable de se lier et d'interagir spécifiquement avec lui, en s'appuyant sur la technologie ALPHASCREEN® (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay). De plus nous montrons que les cellules T MAU participent à la constitution d'un complexe trimoléculaire {EphA2, ephrin, TCR MAU} où le TCR MAU et les éphrines A1 et A4 sont exprimés par la cellule T et où EphA2 est exprimé par la cellule cible. En somme, nous suggérons un modèle où les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> s'activent spécifiquement de façon TCR dépendante par la reconnaissance d'un marqueur d'intégrité épithéliale (EphA2) en détournant son mécanisme d'interaction classique avec ses ligands naturels éphrine A1 et A4 pour s'en faire un signal de cosimulation et en s'appuyant sur le contexte de stress pour renforcer son activation.

## **Cytomegalovirus and Tumor stress surveillance by human V $\delta$ 1 $\gamma\delta$ -TCR binding to Ephrin Receptor A2**

Thomas Bachelet<sup>1,2,3</sup>, Christelle Harly<sup>2,3</sup>, Carrie Willcox<sup>4,5</sup>, Vincent Pitard<sup>2,3</sup>, Sonia Netzer<sup>2,3</sup>, Lionel Couzi<sup>1,2,3</sup>, Romain Marlin<sup>2,3</sup>, Jean-François Moreau<sup>1,2,3</sup>, Benjamin Willcox<sup>4,5</sup>, Julie Déchanet-Merville<sup>2,3</sup>

1. CHU Bordeaux,
2. Université Bordeaux Segalen,
3. UMR-CNRS 5164,
4. Birmingham Cancer Research UK Cancer Centre,
5. University of Birmingham

### **INTRODUCTION**

L'analyse de souris dépourvues de lymphocytes T  $\gamma\delta$  a montré que cette sous population de lymphocytes T contribuait à une protection non redondante contre différents processus infectieux et de carcinogénèse (1). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent (i) tuer des cellules transformées ou infectées et des microorganismes *in vitro* (ii) infiltrer des tissus soumis à ces deux types d'agression tumorale ou infectieuse *in vivo* et (iii) s'expandre dans le sang circulant et être associés à un meilleur pronostic clinique (2-4). Ces cellules possèdent une large plasticité fonctionnelle ; elles semblent capables d'intervenir à la fois à la phase afférente et à la phase efférente de la réponse immune (5). Elles peuvent coordonner la réponse immunologique en interagissant avec les différents acteurs (cellules T  $\alpha\beta$ , cellules dendritiques, cellules B, ...). Elles contribuent in fine au maintien de l'intégrité du tissu agressé (6).

La compréhension complète de la biologie des cellules T  $\gamma\delta$  est toutefois handicapée par l'ignorance des spécificités antigéniques de la plupart des récepteurs cellulaires T (TCR)  $\gamma\delta$ . Bien que les gènes codant pour les chaînes  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$  du TCR furent identifiés à peu près simultanément dans les années 1980s (7, 8), la compréhension moléculaire des mécanismes de reconnaissance des lymphocytes  $\gamma\delta$  T est bien moins avancée que celle des cellules des lymphocytes T  $\alpha\beta$ . Comme tous les TCR, les chaînes des TCR  $\gamma\delta$  contiennent aussi des domaines qui portent des régions variables ou hypervariables dans les boucles CDR (Complementary-Determining Region), où siège la spécificité (9, 10). Cependant, les cellules T  $\gamma\delta$  diffèrent clairement des cellules T  $\alpha\beta$  ; dans leur incapacité générale à reconnaître les complexes classiques CMH-peptides et dans la relative rareté de cellules T

$\gamma\delta$  hautement spécifiques d'un pathogène donné. A l'inverse, la prolifération des cellules T  $\gamma\delta$  après une infection par un pathogène et leur contribution substantielle à la protection de l'hôte semble refléter la reconnaissance d'une signature de dérégulation cellulaire, qui explique de la même façon leur réactivité antitumorale.

Cette capacité à « censurer » la dérégulation cellulaire est à la base d'une réponse lymphocytaire de surveillance du stress qui se met en place bien plus rapidement que la réponse adaptative cellulaire classique. Une réponse massive des lymphocytes T  $\gamma\delta$  à différents antigènes de stress est effectivement suggérée par l'utilisation soit de TCR présentant une diversité très restreinte, soit de TCR multiples exprimés par plusieurs compartiments de cellules T  $\gamma\delta$ . La double réactivité anti infectieuse et anti tumorale a été mise en évidence pour différents types de répertoires  $\gamma\delta$  chez l'homme.

Concernant les cellules humaines circulantes exprimant le TCR  $V\gamma9V\delta2$ , ont été identifiés des antigènes activateurs à la base de cette double reconnaissance : des motifs phosphorylés de bas poids moléculaires ou phosphoantigènes, produits génériques du métabolisme des isoprénoïdes des microorganismes ou des cellules humaines après infection (11) ou après transformation tumorale (12). Toutefois, l'interaction directe entre ces phosphoantigènes et les TCR  $V\gamma9V\delta2$  n'a pas été démontrée ; si bien que, malgré l'implication de protéines accessoires (F1-ATPase mitochondriale (13), butyrophiline (14)) pour lesquelles l'interaction physique a été décrite, le mode d'engagement de ce TCR  $V\gamma9V\delta2$ , pourtant le plus fréquent des TCR  $\gamma\delta$  chez l'homme, est encore incomplètement élucidé.

Concernant les autres lymphocytes T  $\gamma\delta$  dit  $V\delta2^{neg}$  qui s'activent de façon indépendante des phosphoantigènes, certains d'entre eux possèdent aussi cette double réactivité. Là encore, la démonstration formelle de leur interaction avec leurs antigènes activateurs est parcellaire (15-17).

Une relation étroite existe entre l'infection à cytomégalovirus (CMV) et l'expansion d'une population de lymphocytes T  $\gamma\delta V\delta2^{neg}$  dans le sang circulant, alors que ces cellules ont initialement un tropisme tissulaire. Cette expansion a été observée d'abord chez les patients transplantés d'organes solides (18) puis chez des patients sains (19, 20) et dans différents contextes physiopathologiques (21-26). Les clones T  $\gamma\delta V\delta2^{neg}$  issus de ces cellules circulantes lysent les cellules cibles infectées par le CMV et produisent in vitro, des cytokines proinflammatoires (tumor-necrosis factor (TNF) et interféron- $\gamma$  (INF- $\gamma$ )) qui limitent la propagation du CMV. Ils sont aussi dirigés de façon TCR-spécifique contre différents lignées de tumeurs solides (27). Ils possèdent donc cette double réactivité anti virale (CMV spécifique) et anti tumorale. Celle-ci existe in vitro et se traduit in vivo : l'expansion de ce sous-type de cellules T  $\gamma\delta V\delta2^{neg}$  après infection par le CMV est associée à une moindre susceptibilité de cancer après transplantation, suggérant un rôle d'immunosurveillance (28). Cette expansion est aussi étroitement associée à la résolution de l'infection (29) : le délai de l'expansion des lymphocytes T  $\gamma\delta$

V $\delta$ 2<sup>neg</sup> est corrélée à la durée de virémie avec une concomitance entre l'expansion et la négativation de la PCR. Inversement, le retard d'expansion et l'absence de clairance virale après expansion est prédictif de la survenue d'une résistance aux traitements anti-viraux (30). Ensembles, ces données suggèrent un rôle important pour ces cellules dans le contexte de la transplantation d'organes solides où, sous la pression immunosuppressive, les patients sont doublement exposés à un risque de cancer et de maladies à CMV.

Bien que la diversité du répertoire des cellules T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> soit limitée au sein de chaque individu infecté par le CMV, le spectre des combinaisons des chaînes V $\delta$  et V $\gamma$  diffère d'un patient à l'autre. Ceci suggère une réponse adaptative diversifiée dépendante du TCR des cellules T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup>, cohérente avec (i) leur phénotype de cellules effecteurs mémoires, (ii) le fait qu'elles partagent la cinétique d'expansion des lymphocytes T  $\alpha\beta$  CD8+ spécifiques du CMV (31) (iii) le fait qu'elles répondent plus rapidement lors de réponses secondaires au CMV (réactivations versus primo-infections) (19).

Après avoir exclu l'implication des ligands précédemment rapportés (CD1, MICA), nous avons fait l'hypothèse que cette expansion sélective de cellules  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> pouvait être dirigée par la reconnaissance par leur TCR  $\gamma\delta$  d'auto-antigènes de stress, partagés entre l'infection à CMV et la transformation cellulaire. Récemment, nous avons rapporté que le récepteur endothélial à la protéine C (EPCR) était l'un de ces antigènes (32). Cette réactivité anti-EPCR n'expliquant pas la réponse de tous les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup>, le but de notre étude était ici d'identifier la spécificité d'un autre clone T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> présentant une double réactivité anti tumorale et anti CMV.

## **MATERIEL ET METHODE**

### **Anticorps et réactifs**

Ont été utilisés

Anti-TCR  $\gamma\delta$  (#IMMU510) anti-V $\delta$ 2, anti CD16, anti CD69 (Beckman Coulter), anti CD3, CD14, CD19, CD27, CD45RA, et CD107a (BD Biosciences), Ephrine A1, A4, A5 et EphA2, A3, A4, A5, A6 murins fusionnés avec un Fc humain et anti EphA2, anti EphA4, anti EphA3, anti EphA5 (R and D System), (R and D System).

### **Analyse cytométrie en flux\***

Toutes les analyses ont été pratiquées sur la plateforme de cytométrie de l'université de Bordeaux (Structure Fédérative de Recherche, Biologie Fondamentale et Appliquée à la Médecine, Bordeaux University, Plateoforme de cytométrie SFR TransBioMed) sur un cytomètre Fortessa ou Canto II (BD

Biosciences). Les tris cellulaires ont été effectués sur le FACS Aria. Le logiciel d'analyse est FACSDiva 6.1.2 software.

**Génération de clones T et tests fonctionnels :** Les cellules mononucléées du sang ont été obtenues après gradient de Ficoll sur échantillons de sang prélevés dans le cadre de soins courant, avec accord du comité médical éthique local. Les clones  $\gamma\delta$  V $\delta$ <sup>neg</sup> MAU et LES ont générées et cultivées comme rapportés précédemment (27, 33) (génération de lignées court-terme avec mise en culture de cellules T CD3+  $\gamma\delta$  +V $\delta$ - triées au FACS Aria, en milieu RPMI (Invitrogen) supplémenté avec 10% de sérum humain, 1000 U/mL rIL-2 (Chiron), 1 $\mu$ g/mL PHA (Sigma Aldrich) et 5 millions de PMBC allogéniques irradiées provenant de deux donneurs différents (35 Gray-Gy) puis clonage en dilution limite avec deuxième cycle de stimulation par PMBC allogéniques). Pour les tests fonctionnels, les cellules (5.10<sup>4</sup> cellules par puits) ont été incubées sur des monocouches de lignées de cellules tumorales, de fibroblastes, infectés ou non par une souche clinique de CMV TB40-E comme précédemment rapporté. Après 6H à 37°C, le TNF présent dans les surnageants a été quantifié par test ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay, Bender MedSystems). Le potentiel de dégranulation des cellules T  $\gamma\delta$  a été évalué dans un test CD107a : les cellules (10<sup>4</sup> cellules effecteurs et cibles par puits) ont été cocultivées pendant 6 heures en présence d'anticorps monoclonal (mAb) couplé à la phycoérythrin (PE) anti CD107a (H4A3 ; BD Biosciences) et de brefeldine A (10 $\mu$ g/mL ; Sigma) ; puis récupérées et marquées avec un anti CD2 avant d'être analysé en cytométrie de flux\*.

**Génération de cellules transfectées pour exprimer EphA2, différents TCR  $\gamma\delta$  ou les molécules éphrine A4.** Les ADNc codant EphA2, ou les chaînes V $\gamma$  et V $\delta$  des différents clones T  $\gamma\delta$  ont d'abord été amplifiés par RT-PCR et sous clonés dans pCR2.1 (TA Cloning kit, Invitrogen). Puis, les ADNc ont été inclus dans le vecteur lentiviral TEEW dans lequel les ADNc sont sous le contrôle du promoteur EF1 $\alpha$  ; les particules lentivirales ont ensuite été produites par transfection transitoire des cellules T293 comme précédemment rapporté (34). Les titres viraux ont été déterminés par ELISA de p24. Toutes les productions ont été réalisées sur la plateforme de production de vecteurs lentiviraux de l'université de Bordeaux (Structure Fédérative de Recherche, Biologie Fondamentale et Appliquée à la Médecine, Bordeaux University, Plateforme de cytométrie SFR TransBioMed). Puis, les lignées tumorales (SKW6.2, 721.221, ...) ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant EphA2 ; les cellules JRT3-T3.5 (American Type Culture Collection) ont été co-transduites avec des particules lentivirales exprimant une chaîne V $\gamma$  et une chaîne V $\delta$ . Ceci a été réalisé à différents niveaux d'infection et en milieu RPMI à 8% de sérum de veau fœtal avec 8 $\mu$ g/mL de protamine sulfate (Sigma). Après 24 heures d'infection, les cellules EphA2+ et TCR+ ont été lavées deux fois puis triées au cytomètre (FACS Aria et FACSDiva 6.1.2 software; BD Biosciences).

Le mécanisme de production des lignées murines WR19L transduites avec éphrine A4 est basé sur le même principe aux différences suivantes (i) vecteur lentiviral 197 avec un IRES2 (1 ARN et eux

protéines exprimées) sous le contrôle d'un promoteur MND avec les sites de restriction *NheI* et *MluI* pour assurer l'insertion des oligonucléotides d'ephrin A4 (ephrin-A4 S *NheI* \*TTTTGCTAGC\*TGCCAGGCCAGACCAAACCG, ephrin-A4 AS *MluI* \*TTTTACGCGT\*ATTGGCACCCCCAGTGCAGG) (ii) un contrôle de l'efficacité de la transduction par analyse de l'expression de Zs-green.

### **Test d'expression du CD69 sur les JRT3.**

Le test d'activation des cellules JRT3 transduits avec différents TCRs est basé sur le marquage membranaire CD69 : les cellules sont cocultivées pendant 4 heures à 37°C puis marquées par un mAb anti CD69-PE (Clone TP1.55.3) ± un anti CD2 couplé à la fluorescein isothiocyanate (FITC) et analysées sur cytomètre\*.

### **Génération des anticorps monoclonaux murins mAb #6G8 et anti ephrin A4 #1D9 et #9C10**

Pour la génération de mAb 6G8, les cellules U373 ( $10^6$  cellules dans 50µL de PBS) ont été injectées sans adjuvant dans le coussin plantaire de souris BALB/c (n=2). Douze jours plus tard, les souris ont été restimulées dans les mêmes conditions (injection « boost »). Au quinzième jour, les ganglions poplités ont été collectés après euthanasie des souris et dissection du scarpa puis les cellules B ont été extraites et fusionnées avec un partenaire myélomateux de fusion (cellules P3U1). Les hybridomes ont été cultivés jusqu'à confluence et évalués sur leur capacité à neutraliser la réactivité de la JRT3 MAU. Les surnageants d'hybridomes (50µL) ont été ajoutés dans les 96 puits à fond plat de plaques contenant des cellules U373 à confluence. Après 30 min d'incubation à 22°C, les cellules JRT3 MAU ont été ajoutées ( $10^5$  cellules par puits) et les plaques incubées pendant 4 heures à 37°C. Après lavage et centrifugation les culots cellulaires ont été marqués avec les mAbs anti CD69-PE et anti CD2-FITC pendant 15 min. Après deux cycles de lavage/centrifugation, les cellules ont été reprises dans du PBS et analysées en cytométrie en flux pour le marquage CD69 sur les cellules CD2 correspondant au JRT3 MAU. Les hybridomes dont l'anticorps présent dans le surnageant neutralise la réactivité de la JRT3 MAU ont été clonés en dilution limite et l'anticorps mAb 6G8 (isotype IgG2) a été sélectionné pour sa forte capacité de blocage.

Pour la génération des mAbs anti éphrine A4, la procédure est la même aux différences près suivantes (i) immunisation avec des éphrines A4 couplés (10µg dans chaque patte) à un fragment Fc avec adjuvant de Freund, (ii) criblage des surnageants sur la capacité à marquer (marquage secondaire Goat anti Mouse couplé PE au 1/200e) les cellules WR19L transduites et pas les WR19L non transduites. Les hybridomes dont l'anticorps présent dans le surnageant marquait spécifiquement la WR19L transduite avec ephrin A4 ont été clonés en dilution limite et les mAb 1D9 et 9C10 (tous deux d'isotype IgG2) ont été sélectionnés pour leur forte capacité de marquage. A noter que la génération d'un anti éphrine A1 fonctionnant en cytométrie n'a pu aboutir malgré trois immunisations du fait

d'un problème de transduction de la WR19L TD eA1 (expression Zs-green sans marquage par le ligand naturel d'ephrinA1, EphA2. Confirmation par marquage secondaire du marquage d'EphA2-Fc (goat anti human au 1/200<sup>e</sup> couplé FITC), nouvelle transduction en cours).

**Immunoprécipitation et spectroscopie de masse.** Des cellules confluentes adhérentes reconnues par la JRT3 MAU (U373 et HeLa) et non adhérentes non reconnues (K562 et Daudi) ont été lavées deux fois au PBS avant biotinylation de surface pour 30 minutes à 4°C avec de la biotine sulfo-N-hydroxysuccinimide-LC (0.5mg/mL en PBS ; Thermo Fisher). Les réactions ont été stoppées par l'adjonction de Tris, pH 7.4, à une concentration de 20mM. Les cellules ont ensuite été lavées et lysées pendant 30 minutes sur la glace dans un tampon de lyse (50mM Tris, pH 7.4, 150mM NaCl, 1% Brij 96 et cocktail d'inhibiteurs complets de protéase (Roche)). Les matières insolubles ont été sorties après centrifugation à 17 000g pendant 15 min. Les lysats solubles ont été prélevés pendant 1H à 4°C avec des billes d'agarose recouvertes d'anticorps IgG de chèvre anti souris (anti-mouse IgG agarose ; Sigma), puis les surnageants ont été immunoprécipités toute la nuit avec mAb 6G8 couplé à l'anticorps anti souris IgG agarose. Les immunoprécipitats ont été lavés trois fois dans un tampon de lyse Brij 96 et élués pendant 30 min à 37°C dans du SDS à 1% avant séparation en SDS-PAGE et détection par streptavidine conjuguée à l'HRP (horseradish peroxydase, Thermo Fisher). Les protéines immunoprécipitées ont été traitées par PGNase F selon les recommandations du fabricant (NEB). Pour des études d'immunoprécipitations à large échelle, les cellules HeLa furent lysées en tampon de lyse Brij96 comme décrit au-dessus, puis prélevés et immunoprécipités avec l'mAb 6G8. Les protéines immunoprécipitées ont été éluées en SDS1% et séparées par électrophorèse sur gradient de gel 4-12% Bis-Tris (Invitrogen) dans des conditions non réductrices et marquées à l'argent. La bande de 130kDa d'intérêt a été excisée, décolorée et digérée à la trypsine ; les peptides tryptiques ont été analysés par spectroscopie de masse (Fourier transform–ion-cyclotron resonance mass spectrometry with a Finnigan LTQ FT mass spectrometer) comme précédemment rapporté (35). Les données issues de la spectroscopie de masse en tandem ont été utilisées pour rechercher sur la base de données non redondantes de la National Center for Biotechnology Information à l'aide de l'algorithme de Sequest de Biowoks 3.3.1 (Thermo Fisher). Les résultats ont obtenus avec le logiciel d'identification de protéine TurboSEQUENT puis filtrés avec un score limite de peptide de 10, une tolérance de masse des précurseurs de 10 p.p.m et une tolérance de masse des fragments de 0.5 Da. Pour la confirmation qu'EphA2 était bien le ligand pour 6G8, les protéines immunoprécipitées avec mAb 6G8 ont aussi été analysées en immunoblot avec un mAb dirigé contre EphA2. La plateforme de spectroscopie de masse de Birmingham FT-ICR a été utilisée (équipement obtenu dans le cadre du projet "the Birmingham Science City Translational Medicine: Experimental Medicine Network of Excellence").

**Expression de TCR solubles et EphA-Fc et études de liaison.**

Le TCR Mau solubles et les différents TCR contrôles ont été générés par fusion de l'ADNc codant pour les chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  et d'une séquence zipper (36) dans pMT-BiP-V5-HisB avec ou sans site BirA et cotransfection dans des cellules S2 de drosophile (Plateforme de Birmingham the University of Birmingham Protein Expression Facility). Les TCRs solubles ont été purifiés avec de l'agarose acide nickel-nitrilotriacetic (Qiagen) et dans un tampon d'échange HEPES (10 mM HEPES, pH 7.4, and 150 mM NaCl) pour les études de liaison. Les TCRs ont été biotynilés avec BirA. Les protéines Eph et ephrin murines fusionnées avec un fragment Fc sont disponibles dans le commerce. Après échec des analyses de résonance plasmonique de surface, l'étude des interactions protéine-protéine a été faite au moyen de la technologie ALPHASCREEN® (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay), récemment développée dans l'industrie selon un principe ressemblant à celui du FRET (transfert d'énergie de résonance de fluorescence), qui utilise deux fluorochromes : un donneur qui va transmettre son énergie à un autre fluorochrome accepteur. Il s'agit d'un système de détection basé sur billes qui permet de caractériser l'interaction entre partenaires biologiques solubles en microplaque. Son principe repose sur le concept suivant : un des partenaires de l'interaction est capturé sur une bille dite bille donneuse qui contient un photosensibilisateur capable de convertir l'oxygène environnant en une forme excitée et réactive d'O<sub>2</sub>- singlet d'oxygène, sous une stimulation bioluminescente à 680 nm. Durant les 4 $\mu$ s de sa demi-vie, le singlet d'oxygène est capable de diffuser en solution sur un périmètre de 200 nm. Si le partenaire protidique, capturé sur une bille dite acceptrice, interagit bien avec le premier partenaire fixé sur la bille donneuse, il se situe alors à moins de 200 nm. Ce qui autorise un transfert d'énergie par le singlet en oxygène vers un dérivé thioxène présent au sein de la bille acceptrice, capable par la suite d'engendrer une production lumineuse à une longueur d'onde comprise entre 520—620 nm. Une bille donneuse streptavidine a été utilisée pour fixer les TCRs biotynilés et une bille acceptrice de protéine A pour fixer les partenaires portant un fragment Fc.

## Statistiques

Les analyses ont été réalisées selon les méthodes statistiques conventionnelles. Le test Mac Nemar  $\chi^2$  a été utilisé pour les variables qualitatives; les tests de Mann-Whitney et de Willcoxon ont été utilisés pour les variables quantitatives quand indiqués. Les analyses ont été faites sur le logiciel JMP 10 IN (2012, SAS Institute Inc. Cary, NC).

## RESULTATS

### **Double reconnaissance anti-tumorale et anti-CMV médiée par le TCR MAU V $\gamma$ 9V $\delta$ 1**

Comme rapporté précédemment, différents clones T  $\gamma\delta$  générés à partir de patients ayant connu une expansion après infection à CMV possèdent une double réactivité anti virale et anti tumorale (27). Les clones LES et MAU sont capables de lyser des cellules fibroblastiques MRC5 infectées par le CMV et de produire du TNF à leur contact (Figure 1), et aussi différentes lignées de carcinome (HT29 représenté, Figure 1B). Nous avons généré les ADNc codant pour différentes chaînes V $\gamma$  et V $\delta$  des différents clones polyréactifs générés et introduit ces ADNc dans une lignée humaine de JRT3 déficiente en TCR pour générer une lignée JRT3 TCR  $\gamma\delta$ , dont l'activation peut facilement s'observer par un test CD69 (lignée reporter). Le spectre de réactivité n'est pas identique entre les lignées reporter JRT3 transduites avec les TCR  $\gamma\delta$  non V $\delta$ 2 dérivés des différents clones réactifs contre le CMV. Ce qui suggère la reconnaissance de plusieurs ligands antigéniques. La JRT3 MAU V $\gamma$ 9V $\delta$ 1, issue du clone MAU, présente, en test CD69, une réactivité dirigée contre un large panel de cellules tumorales ou non, mais adhérentes humaines (A431, FSF, MRC5, HELA PF, HT29, HUVEC, SK-MES, VERO, COS, HEK, JAR, U343, U373, U251...) ou murines adhérentes (3T3, MEF). De fait, il est logique de supposer que son ligand est impliqué dans l'adhésion cellulaire et qu'il correspond à une molécule conservée au cours de l'évolution (Figure 2).

### **Génération d'un anticorps bloquant la réactivité du TCR MAU**

Pour identifier le ligand du TCR MAU, nous avons généré un anticorps monoclonal bloquant après immunisation de souris avec la lignée de glioblastome U373, ciblant efficacement le ligand reconnu de manière TCR-dépendante par le clone #MAU et la lignée JRT3 MAU. Un des mAbs générés, le #6G8 était capable de marquer les cellules cibles de MAU et de bloquer complètement la réactivité de la JRT3 MAU, à l'exclusion de sa réactivité sur les cellules murines (Figure 3A), de façon spécifique puisque le #6G8 était capable d'abroger la réactivité de la JRT3 MAU de la lignée HT29 sans affecter la réactivité de la JRT3 LES sur cette même lignée (non montré). De manière importante, le mAb #6G8 était capable de marquer les fibroblastes (adhérents) infectés et non infectés par le CMV, suggérant que l'expression du ligand du TCR MAU sur la cellule cible est nécessaire et suffisant pour activer la lignée reporter JRT3 MAU alors qu'il est nécessaire mais pas suffisant pour activer le clone MAU. Des signaux de costimulation (ou des signaux de levée d'inhibition) propres au contexte doivent se rajouter pour permettre l'activation du clone.

### **Identification d'EphA2 comme le ligand du mAb #6G8**

En collaboration avec le groupe de B. Willcox (Birmingham,UK), une étude protéomique a été réalisée afin d'identifier la molécule ciblée par mAb #6G8. Une protéine de 130kDa a pu être

immunoprécipitée par le #6G8 à partir de lysats de cellules adhérentes reconnues par la lignée JRT3 MAU (HeLa et U373) mais absente des lysats de cellules humaines non reconnues (Daudi, K562) (Figure 3B). Par spectroscopie de masse, le microséquençage de cette protéine a conduit à l'identification de l'EphA2 Erythropoïétine-producing hepatocyte kinase de la famille des Eph récepteurs naturels des ephrins) humain (non montré, collaboration Birmingham).

L'équivalence entre EphA2 et le ligand du #6G8 a ensuite été montrée en confirmant tout d'abord que le mAb #6G8 reconnaissait spécifiquement EphA2 par différentes approches : (i) compétition de marquage des cellules cibles entre le #6G8 et un anti-EphA2 commercial (Figure 4A), (ii) suppression spécifique de la réactivité de la JRT3 MAU par préincubation des cellules cibles avec l'anti-EphA2 et le #6G8 (Figure 4C), (iii) acquisition du marquage #6G8 après expression de l'EphA2 humain par transduction dans des lignées non adhérentes (721.221 et SKW6.4) (non montré).

De façon intéressante, le #6G8 semble reconnaître spécifiquement l'EphA2 humain mais pas l'EphA2 murin, d'où l'absence de marquage sur les cellules cibles murines de la JRT3 MAU. Ceci est en accord avec la modalité de génération du mAb dans des souris exprimant naturellement l'EphA2 murin. En revanche, l'anti-EphA2 commercial (anticorps de chèvre) marque l'EphA2 murin et humain (forte homologie structurale de cette protéine largement conservée au cours l'évolution). En outre, cet anticorps anti EphA2 s'est révélé capable d'inhiber spécifiquement la réactivité de la lignée JRT3 MAU contre toutes ces cellules cibles, humaines et murines, bien plus efficacement que le #6G8.

### **Reconnaissance d'EphA2 par la JRT3 MAU dépendante des chaînes V $\gamma$ 9 et V $\delta$ 1**

Ensuite la reconnaissance d'EphA2 par le TCR a été confirmée en montrant : (i) l'acquisition d'une réactivité spécifique de la JRT3 MAU après transduction d'EphA2 dans des cellules non activatrices à l'état basal, supprimée par l'anti-EphA2 commercial (Figure 4B et 4D) (ii) l'activation spécifique par de l'EphA2-Fc coatée sur plaque de la JRT3 MAU (Figure 4E).

Des mAbs dirigés contre les chaînes variables du TCR MAU sont capables de bloquer sa réactivité contre EphA2 (Figure 4E). Des JRT3 chimériques, associant différentes chaînes V $\gamma$  et V $\delta$ , provenant de différents clones T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> polyréactifs ont été générés. Alors qu'aucun autre TCR que le TCR MAU n'avait été identifié comme reconnaissant EphA2 et entraînant un signal d'activation dans les lignées JRT3 reporter, certaines associations de la chaîne V $\gamma$ 9 du TCR MAU avec une autre chaîne V $\delta$ 1, ou entre la chaîne V $\delta$ 1 du TCR MAU avec d'autres chaînes V $\gamma$  (4,8 et 9) forment des TCRs capables de reconnaître spécifiquement des lignées transduites avec EphA2 ou de l'EphA2-Fc coaté sur plaque. La présence d'au moins une des deux chaînes du TCR MAU est donc nécessaire mais pas forcément suffisante pour conférer au TCR  $\gamma\delta$  chimérique ainsi créé une réactivité anti-EphA2. Pris ensembles, ces données suggèrent que le TCR MAU est bien central dans la reconnaissance d'EphA2 mais que d'autres TCR proches structurellement pourraient avoir la même réactivité (Figure 5).

### **Interaction directe et spécifique d'EphA2 avec TCR MAU (Figure 6)**

Il était ensuite important de documenter l'interaction moléculaire directe entre le TCR Mau et EphA2. Après échec des stratégies classiques pour mettre en évidence l'interaction directe entre le TCR MAU et EphA2 (étude de la phosphorylation du CD3 zeta au cours de l'activation par EphA2, études de résonance plasmonique de surface avec de l'EphA2 monomérique, non montré), nous nous sommes appuyés sur une technologie innovante d'étude de l'interaction protéine-protéine : l'ALPHASCREEN (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) qui correspond à un système de détection qui permet de caractériser l'interaction entre partenaires biologiques solubles fixés sur des billes selon un principe de transfert d'énergie . La preuve définitive de l'interaction moléculaire directe entre le TCR Mau et EphA2 a été obtenue grâce à cette technique. Le TCR MAU soluble biotinilé fixé sur des billes de streptavidine interagit spécifiquement avec de l'EphA2 dimérisé sur un Fc fixé sur billes de protéine A. D'autres Eph récepteurs (EphA4, EphA5, EphB6) ainsi que d'autres TCR solubles (TCR  $\gamma\delta$  LES, murin de DETC et  $\alpha\beta$ ) n'engendrent pas de signal équivalent. Il existe une courbe dose réponse en fonction des différents niveaux de molarité utilisée suggérant un mécanisme d'interaction protéine-protéine classique (effet cloche). Le meilleur compromis (niveau d'émission maximal/quantité de matériel minimal) a été trouvé pour des molarités à 0.7-1  $\mu$ M de TCR soluble et 0.05-1  $\mu$ M d'EphA2-Fc.

### **Rôle des ligands naturels d'EphA2 ephrins dans l'activation du TCR MAU (Figure 7)**

Nous nous sommes ensuite interrogés sur le rôle possible des ligands naturels d'EphA2 (les éphrines) dans la réactivité des JRT3-Mau contre EphA2. En effet, l'EphA2-Fc tout comme l'EphA4-Fc murins marquent la membrane de toutes les JRT3, que celles-ci expriment ou non le TCR MAU. Cette fixation d'EphA2 sur la surface des JRT3 MAU n'est inhibée par aucun anti TCR pan  $\gamma\delta$  ni anti CD3 (non montré), suggérant l'implication complémentaire d'autres molécules que le TCR MAU dans la reconnaissance d'EphA2 par les JRT3. La première explication possible est l'expression des ligands naturels d'EphA2 (et EphA4) sur les JRT3. Les molécules d'éphrines A1 et A4 ont été rapportées au niveau des cellules lymphocytaires T, le plus souvent inductibles sur lymphocytes activés (37, 38). En l'absence d'anticorps fonctionnant en cytométrie en flux, leur mise en évidence reposait jusqu'à présent sur la détection d'ARNm codant pour ces deux éphrines ou sur des analyses en biochimie de la présence de ces deux protéines.

Nous avons donc décidé de générer un anticorps anti-éphrine A4 (eA4) fonctionnant en cytométrie. Avec ce mAb anti eA4 nous avons pu montrer que (i) les JRT3 exprimaient eA4 (Figure 7A), (ii) le mAb anti eA4 était capable de déplacer la fixation d'EphA2 Fc sur les JRT3 (manip de compétition) mais de façon incomplète (Figure 7B, 20% de fixation d'EphA2 résiduelle, même lorsqu'elles expriment un autre TCR que le TCR MAU) suggérant l'expression de molécules redondantes liant EphA2, type éphrine A1 (génération mAb anti eA1 en cours) (iii) la préincubation des JRT3 MAU

avec un mAb anti eA4 était capable d'abaisser le niveau de réactivité de la JRT3 MAU contre des lignées B (Boissel, SKW6.4) transduites avec EphA2 (iv) sans qu'aucune activation directe par les anti-éphrines des différentes JRT3 n'ait pu être identifiée (Figure 7C).

Nous avons ensuite utilisé les propriétés de l'enzyme phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC $\gamma$ ) capables de cliver les ancras GPI attachant les éphrines du groupe A à leur membrane (Christelle Harly). Le prétraitement des JRT3 par la PIPLC $\gamma$  abroge la fixation des Eph récepteurs (EphR) couplés à un fragment Fc sur la membrane des JRT3, sans altérer l'expression membranaire de CD3 ou du TCR. Cette abrogation de la fixation des EphR-Fc sur les JRT3 est complète, y compris pour la fixation d'EphA2-Fc sur la JRT3 MAU, suggérant que l'interaction basale entre EphA2 et le TCR V $\gamma$ 9V $\delta$ 1 est très faible. L'activation de la JRT3 MAU par EphA2 est également inhibée après prétraitement des JRT3 MAU par de la PIPLC $\gamma$ , alors que l'activation par un anti-CD3 n'est pas modifiée. Malgré une extinction complète de l'expression membranaire des éphrines après traitement à dose saturante de PIPLC $\gamma$  (0.1U/mL), l'inhibition de la réactivité de la JRT3 MAU en test CD69 n'est pourtant que partielle. Ceci fait discuter une réexpression des éphrines au cours des 4 heures d'incubation à 37°C exigées par le test, ou des mécanismes redondants maintenant l'activation des JRT3 MAU par EphA2 indépendamment des éphrines attachées par une ancre GPI (Figure 7E-F).

Les JRT3 MAU ont enfin été transduites avec eA4 pour évaluer l'impact d'une surexpression d'eA4 sur leur réactivité. La transduction d'eA4 conduit à une légère augmentation de la réactivité des JRT3 MAU sur EphA2-Fc coaté sur plaque en CD69 (Figure 7D). D'autres EphR-Fc et d'autres types de JRT3 transduites avec eA4 n'induisent pas de surcroît réactivité (données non montrées).

### **Création d'un complexe trimoléculaire activateur {EphA2, ephrin, TCR MAU} (Figure 8)**

Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence la création physique de ce complexe tri-moléculaire en utilisant de nouveau les propriétés de l'ALPHASCREEN. Les différents partenaires que nous avons initialement choisis étaient les suivants : TCR soluble MAU, EphA2-rh commercial (R and D System) et éphrine-A1 (eA1) couplé à un fragment Fc. Le rationnel était d'utiliser les molarités maximales tolérées par le système en EphA2 soluble rh monomérique (limite du volume) afin de s'assurer de l'existence d'une interaction minimale entre EphA2 et le TCR MAU, étant donné le faisceau d'arguments suggérant une affinité faible entre ces deux partenaires, à l'inverse de l'affinité entre EphA2 et un de ses ligands naturels : eA1. Le TCR MAU a été d'abord préincubé sur sa bille de streptavidine en présence de molarité saturante d'EphA2 monomérique soluble. Ont ensuite été rajoutées l'eA1-Fc préincubé et fixé sur sa bille de protéine A. Le TCR MAU et eA1-Fc n'interagissent pas à l'état basal mais nous avons pu enregistrer un signal d'émission d'ALPHASCREEN quand a été rajouté de l'EphA2 monomérique (Figure 8A). Ceci est cohérent avec la formation d'un complexe trimoléculaire où EphA2 ferait le pont entre TCR MAU fixé sur sa bille donneuse et eA1-Fc fixé sur sa bille acceptrice de telle sorte que les billes seraient suffisamment

proches pour générer la formation d'un signal. Ce système est moins pur que le précédent et fait appel à de l'EphA2 monomérique, d'où des ratios d'émission nettement plus faibles mais qui sont significativement différents après ajout d'EphA2 rh (Figure 8B). A l'inverse, l'utilisation d'EphA5 rh, dont on sait qu'il n'interagit pas avec le TCR MAU n'induit aucun signal ALPHA (Figure 8C). Nous avons enfin réalisé la même expérience en faisant varier la molarité d'EphA2 monomérique à la baisse. Ceci a permis de révéler une interaction correspondant à la constitution de ce complexe trimoléculaire avec des ratios d'émission convaincants (Figure 8D). L'éphrine A1 pourrait donc jouer le rôle de co-récepteur dans la reconnaissance d'EphA2 par un TCR  $\gamma\delta$ , comme le CD4/CD8 dans la reconnaissance des complexes MHC-peptide par les TCR  $\alpha\beta$ .

## DISCUSSION

Nous montrons ici que le clone T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> MAU présente une double réactivité anti virale et anti tumorale via la reconnaissance d'EphA2.

EphA2 (Erythropoïétine-producing hepatocyte kinase) appartient à la plus large famille de récepteurs à activité tyrosine kinase de l'organisme. Son interaction classique avec les éphrines (éphrines A1-6) est à la base d'un système de communication cellulaire important susceptible de réguler la mobilité cellulaire, les phénomènes de répulsion et d'attraction cellulaire et les contacts entre cellules et avec la matrice extracellulaire. Elle jouerait sur la réorganisation du cytosquelette d'actine et pourrait influencer l'activité des intégrines et des molécules d'adhésion intercellulaire telles que les cadhérines (39). Physiologiquement, le rôle essentiel d'EphA2 semble résider dans le maintien de l'intégrité des epithelia (40), même si EphA2 a aussi été impliqué dans de nombreux autres phénomènes (embryogénèse (41) et le développement neurologique (42), angiogénèse (43), sécrétion d'insuline(44), immunorégulation (45)). Physiopathologiquement, sa mutation est associée à un phénotype de cataracte autosomique dominante (46), il a été récemment identifié comme corécepteur d'entrée du virus de l'hépatite C (47) et du virus herpès 8 (48)). et il serait associé à une susceptibilité à une réponse de type granulomateuse dans un modèle murin KO d'infection à mycobactérie par inhibition de la migration des cellules immunocompétentes(49). Néanmoins, c'est son implication dans la carcinogénèse qui a suscité le plus d'intérêt et de publications. EphA2 pourrait intervenir à tous les stades : tumorigénèse (signal oncogénique), migration/métastase (organisation spatiale récepteur ligand associée à un phénotype invasif), angiogénèse tumorale. Sa surexpression est en tout cas fréquemment observée et pourrait avoir une signification pronostique (50, 51) (moindre survie, résistance à la chimiothérapie). La preuve en est qu'EphA2 est aujourd'hui une cible de l'immunothérapie en cancérologie.

Ce nouvel antigène activateur de lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ <sup>neg</sup> ne présente pas les caractéristiques de molécules CMH-like des précédents ligands avancés (MICA, CD1 et EPCR) ni même de polymorphisme. Toutefois, son expression physiologique et pathologique supporte notre hypothèse de travail selon laquelle les ligands des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ <sup>neg</sup> pourraient inclure des molécules codées par l'hôte exprimées à la fois durant l'infection et la transformation. D'abord, EphA2 est exprimée au niveau des cellules épithéliales et endothéliales, qui sont toutes deux permissives au CMV et susceptibles de constituer un site de latence. Ensuite, EphA2 a récemment été rapporté comme un récepteur de surface permettant l'entrée de virus de familles différentes (VHC (47) et HHV8 (48)). Puis, EphA2 a été impliqué dans différentes situations de stress (cancer (52), UV (53), irradiations (54), hypoxie (55), ischémie/reperfusion (56)...). En particulier, son organisation à la membrane et ses capacités transductrices sont profondément réorganisées lors de la tumorigénèse et semblent contribuer à la fois à l'acquisition d'un phénotype tumoral et d'un phénotype invasif (perte du contact avec les reste des cellules tissulaires et angiogénèse). En somme, EphA2 répond aux critères des antigènes susceptibles de déclencher les mécanismes de surveillance lymphocytaire du stress (i) il s'agit d'un auto-antigène (à l'expression relativement ubiquitaire), (ii) dont les fonctions physiologiques contribuent au maintien de l'intégrité tissulaire des epithelia, (iii) qui se modifie dans son fonctionnement et vraisemblablement sa structure lors de situations de stress et qui peut donc représenter une signature de soi dérégulé, susceptible d'être communiquée aux lymphocytes T V $\delta$ <sup>neg</sup>. Il est donc un des signaux de l'épimmunome commun entre infection à CMV et transformation tumorale (57).

La compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels EphA2 est reconnu par les cellules T MAU est cruciale pour comprendre la surveillance du stress. Il sera intéressant de disposer des résultats de mutagenèse dirigée pour déterminer l'épitope activateur d'EphA2 et la localisation et la séquence impliquée sur la partie variable du TCR MAU (collaboration en cours avec le groupe de B. Willcox, Birmingham). Quoiqu'il en soit, cette reconnaissance non dépendante du CMH par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ <sup>neg</sup> d'un autoantigène natif présente deux intérêts (i) les spécificités des TCR  $\gamma\delta$  pour des autoantigènes non polymorphiques tels qu'EphA2 persistent au sein du répertoire humain adulte et (ii) contribuent à la surveillance du stress via l'induction d'une autoimmunité bénéfique de stress.

La question majeure est comment EphA2 devient immunogène. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées : d'abord l'interaction d'EphA2 avec le TCR MAU ne résume pas la reconnaissance d'EphA2 comme un antigène activateur. Les molécules de costimulation associées semblent cruciales. Pour preuve, si la JRT3 MAU s'active en présence de fibroblastes infectés ou non infectés par le CMV du fait de la seule présence d'EphA2, en revanche le clone MAU ne s'active qu'en présence de fibroblastes infectés. On peut donc postuler que les cellules T MAU reconnaissent un contexte moléculaire associé au stress qui fait office de signature dont le ligand EphA2 interagissant

directement avec le TCR est l'élément nécessaire mais non suffisant. Ces cosignaux peuvent être activateurs, comme l'augmentation d'expression de CD54-ICAM1 sur les cellules infectées par le CMV, susceptible d'interagir avec son ligand LFA1, ainsi que nous l'avons montré pour le clone  $\gamma\delta$  reconnaissant EPCR (32). Ils peuvent aussi être inhibiteurs : l'infection à CMV (58) et la transformation tumorale (59) ont en commun de diminuer l'expression des molécules HLA et de facto l'engagement des récepteurs inhibiteurs du HLA (comme KIRs, NKG2 et ILT) avec un effet net activateur. Ceci fonde un modèle de reconnaissance du stress par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{neg}$  associant à la fois des composants innés (KIRs, NKG2 et ILT) et adaptatifs (TCR  $\gamma\delta$ ). La cartographie fonctionnelle de ces différentes molécules de costimulation sera un des axes de recherche à développer. Enfin, on peut se référer au modèle développé par Chodaczek et collègues avec les cellules T  $\gamma\delta$  cutanées murines qui met en évidence une reconnaissance basale d'auto antigènes par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  cutanés à la surface des kératinocytes, les plaçant dans un état préactivé et prêts à répondre immédiatement lors des situations d'agression tissulaire (60). Le même processus pourrait exister pour les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{neg}$  en contact avec des autoantigènes constitutifs tels qu'EphA2 ou EPCR. La nécessité d'intégrer de nouveaux cosignaux activateurs permettrait alors de moduler le « rhéostat » de l'activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{neg}$  et de prévenir l'autoréactivité. Egalement, cet état pré-activé au contact de l'Ag constitutif pourrait activer des fonctions homéostatiques des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{neg}$  impliquées dans la prolifération des cellules épithéliales.

Ensuite, EphA2 a la propriété d'interagir avec son ligand naturel les éphrines dans un système complexe : schématiquement, (i) un premier complexe hétérotétramérique entre Eph et ephrin situés chacun de part et d'autre des cellules en interaction fait office de nucléation qui (ii) déclenche ensuite une extension latérale des agrégats (clusters) Eph/ephrin via différents types d'interactions Eph/ephrin et Eph/Eph ; (iii) c'est seulement alors que s'ensuit la modulation des circuits de phosphorylation traditionnelles. Il semble donc que ce soit la taille et la composition de ces clusters qui détermine le devenir et la nature du signal (61). On peut aussi postuler que c'est la taille et la composition de ces clusters qui détermine le caractère immunogène d'EphA2 pour les lymphocytes T  $\gamma\delta$ . De façon intéressante, le CMV n'induit pas d'augmentation d'expression d'EphA2 ni en cytométrie en flux, ni en immunofluorescence sur fibroblastes infectés (Figure supplémentaire). Au-delà de l'hypothèse du signal global intégrant les molécules de costimulation, on peut aussi imaginer que la circulation d'EphA2 à la membrane des cellules cibles est modifiée (restreinte ou facilitée) après infection par le CMV telle que cela a pu être démontrée dans des situations de tumorigénèse (62) contribuant à une instabilité cytoarchitecturale. In fine, c'est cette modification conformationnelle qui pourrait représenter la signature de soi dérégulé censurée par la réponse T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{neg}$ . Par analogie à la réponse NK, on pourrait dire que le paradigme gouvernant l'activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{neg}$  n'est pas celui du soi manquant (« missing self ») mais celui de l'intégrité déconstruite (« missing integrity ») qui transcende un simple concept de soi modifié. A ce titre, il serait intéressant d'appliquer les outils

développés pour étudier l'expression membranaire d'EphA2 dans le contexte de la transformation tumorale et du caractère invasif ou non des lignées étudiées, pour déterminer si l'infection à CMV modifie aussi les propriétés de circulation membranaire d'EphA2 (modification du coefficient d'adhésion membranaire d'EphA2 par exemple (63)).

Enfin, cette perspective d'analyse souligne deux paramètres importants 1. EphA2 ne doit pas être compris comme un partenaire monomérique de surface. L'affinité d'une seule molécule d'EphA2 avec le TCR MAU semble extrêmement faible, comme l'atteste la négativité de l'étude de l'interaction en résonance plasmonique de surface (Biacore®). Au contraire, l'analyse basée sur l'ALPHASCREEN® s'appuie sur la constitution d'un réseau d'interactions EphA2 et TCR MAU (notamment du fait du caractère dimérique d'EphA2 couplé à son fragment Fc) qui génère un signal d'émission significatif ; 2. L'interaction d'EphA2 avec ses ligands naturels guide les phénomènes d'aggrégation membranaire et d'activation intracellulaire tyrosine kinase. La reconnaissance d'EphA2 par les cellules T MAU fait donc appel à la génération d'un complexe trimoléculaire, dans lequel les cellules T MAU détournent l'interaction naturelle EphA2-éphrine pour s'en faire un signal d'activation et de costimulation. Nos données suggèrent en effet que la présence d'éphrine A1 ou A4 (qui semblent être celles exprimées sur les cellules T activées (37)) (i) participe à la constitution physique d'un complexe trimoléculaire, (ii) régule spécifiquement le niveau d'activation de la JRT3 MAU (augmentation quand transduite, inhibition quand bloquée ou décollée de sa membrane par application de PIPLC $\gamma$ ). Il sera intéressant de voir si l'ajout d'un anticorps anti éphrine A1 parvient à bloquer complètement l'activation de la JRT3 MAU, une fois sa génération acquise. Toutefois, les molécules éphrines sont très peu exprimées sur les cellules lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> circulants, y compris sur les cellules TEMRA, et pas toujours exprimées sur les clones T générées en PHA IL2. En conséquence, ce mécanisme semble être particulier au clone MAU et peut-être à la JRT3 MAU. Le contrôle de l'expression d'éphrine A4 sur le clone MAU n'a malheureusement pas pu être effectué du fait de la perte de ce clone et du décès du patient qui avait permis de le générer.

Collectivement, ces résultats sont en faveur d'un modèle où les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> s'activent spécifiquement de façon TCR dépendante par la reconnaissance d'un marqueur d'intégrité épithéliale (EphA2) en détournant son mécanisme d'interaction classique avec ses ligands naturels éphrine pour s'en faire un signal de cosimulation et en s'appuyant sur le contexte de stress pour renforcer son activation.

Si ce modèle d'activation est séduisant à l'échelle d'un patient où le TCR MAU représentait plus de 10% au sein du répertoire, la généralisation d'une réactivité prototypique anti-EphA2 pour plusieurs répertoires T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> provenant de patients différents est délicate. En pratique, nous ne sommes pas parvenus à détecter une réactivité anti EphA2 au niveau de cellules circulantes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup>, même après infection à CMV chez des patients transplantés rénaux qui exprimaient aussi la chaîne V $\delta$ 1, dont

on pense qu'elle porte l'essentiel de la variabilité (64). De la même façon, la génération de lignées puis de clones même en présence de lignées « feeders » surexprimant EphA2 après transduction n'a pas permis de retrouver une réactivité pour ces différents clones. Ainsi, la réactivité anti EphA2 pourrait être rare en détail mais paradigmatique en principe. En conclusion, la surveillance du stress par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> pourrait comprendre des composants innés (type NKG2D...) et adaptatifs (TCR spécifiques), avec un TCR  $\gamma\delta$  qui serait potentiellement capable d'engager une large variété de motifs antigéniques codés par le soi et régulés par le stress, à l'inverse de la focalisation du répertoire T  $\alpha\beta$  sur des déterminants antigéniques spécifiques du pathogène, présentés par les molécules du CMH.

## Légende des Figures

### **Figure 1. Double réactivité TCR dépendante du clone MAU (#5-4) anti-CMV et anti tumorale.**

A. Réactivité sur des cellules infectées par le CMV (lignée fibroblastique MRC5, CMV TB40/E à une MOI=1, sur 4 jours), B. Réactivité sur lignées épithéliales normales ou transformées. Réactivité évaluée par un test ELISA de détection du TNF $\alpha$  dans le surnageant (résultats exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  écart –type cultures en triplicate. Résultats issus du papier Halary et al, J Exp Med 2005(27)).

### **Figure 2. Réactivité de la lignée reporter JRT3 MAU V $\gamma$ 9V $\delta$ 1 contre des lignées adhérentes humaines et murines.**

A. Modalités de génération de la lignée reporter JRT3 MAU à partir d'un clone double réactif anti CMV et anti tumoral issu d'un patient transplanté rénal infecté par le CMV. B. Panel de réactivité de la JRT3 MAU sur différentes lignées en culture (Coculture des JRT3 pendant 4H au contact de ces cellules cibles. Analyse de l'activation par enregistrement du CD69 sur les JRT3 MAU en cytométrie en flux. Evaluation quantitative de la réactivité en fonction du niveau de MFI et du pourcentage de cellules exprimant CD69 par rapport au témoin négatif). Résultats générés par Lionel Couzi et Sonia Netzer.

### **Figure 3. Génération d'un anticorps monoclonal bloquant spécifiquement la réactivité de la lignée reporter JRT3 MAU V $\gamma$ 9V $\delta$ 1 et ciblant une protéine de 130kDa.**

A. Blocage de la réactivité de la JRT3 MAU V $\gamma$ 9V $\delta$ 1 sur ces cellules cibles par l'anticorps monoclonal #6G8. Coculture des JRT3 pendant 4H au contact de ces cellules cibles, en présence ou non du #6G8. Analyse de l'activation par enregistrement du CD69 sur les JRT3 MAU en cytométrie en flux. B. Détection de la protéine biotinylée de 130kDa immunoprécipitée par le #6G8 à partir de cellules marquées par le #6G8 (HeLa, U373) et non marquées (K562, Daudi). Résultats générés par Vincent Pitard et collaboration équipe Willcox, Birmingham Université.

### **Figure 4. EphA2 est la protéine reconnue par le #6G8 et active spécifiquement la lignée reporter JRT3 MAU V $\gamma$ 9V $\delta$ 1**

A. L'anticorps polyclonal anti EphA2 abroge le marquage par le #6G8. B. La transduction de lignées non réactives par EphA2 confère une réactivité à la JRT3 MAU. C. Le #6G8 comme l'anticorps polyclonal anti EphA2 bloque la réactivité anti-EphA2 de façon spécifique (pas d'effet sur une autre lignée reporter JRT3 LES et son ligand EPCR), D. L'anti-EphA2 et pas l'anti EphA4 bloque spécifiquement la réactivité de la JRT3 MAU, E. La JRT3 MAU s'active spécifiquement sur de l'EphA2-Fc coaté. La réactivité de la JRT3 MAU vs EphA2 est dépendante du TCR MAU V $\gamma$ 9V $\delta$ 1.

### **Figure 5. Reconnaissance d'EphA2 par la JRT3 MAU dépendante des chaînes V $\gamma$ 9 et V $\delta$ 1.**

Les lignées JRT3 chimériques, exprimant différents TCR  $\gamma\delta$  ont été activées en présence d'anti CD3, de Boissel wt, de Boissel transduites avec EphA2 (TD EphA2),  $\pm$  anti EphA2 polyclonal.

L'expression du marqueur d'activation CD69 à la surface des JRT3 a été analysée en cytométrie en flux après immunomarquage.

**Figure 6. Interaction directe entre le TCR MAU V $\gamma$ 9V $\delta$ 1 et EphA2.** Ration émission/bruit de fond pour A. différentes molarités d'EphA2 et de TCR MAU et B. différents Eph récepteurs et TCRs.

**Figure 7. Implication de l'éphrine A4 dans la reconnaissance d'EphA2 par la JRT3 MAU V $\gamma$ 9V $\delta$ 1.** A. Marquage de la JRT3 MAU et des autres JRT3 par de l'EphA2-Fc (marquage secondaire chèvre anti humain couplé FITC au 1/50<sup>e</sup>) attestant de l'expression de ses ligands naturels en plus du TCR, confirmé par la positivité du marquage anti eA4 (marquage secondaire chèvre anti souris couplé PE au 1/200<sup>e</sup>); B. Inhibition partielle de la fixation d'EphA2-Fc sur la JRT3 par l'anti-eA4 ; C. Blocage partiel de l'activation des JRT3 MAU sur des lignées B transduites avec EphA2, après préincubation par anti-eA4 et anti-EphA2 (N=4); D. Augmentation de la réactivité des JRT3 MAU sur EphA2-Fc coaté par la transduction d'eA4 (N=4). E-F. Effet de la phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC), qui clive l'ancre GPI liant les éphrines A. Incubation pendant 1H des JRT3 MAU pendant 1H à différentes concentrations de PIPLC puis lavage et E. marquage par un anti CD3 (pas d'ancre GPI, contrôle (-)), un anti CD59 (ancre GPI, expression sur la JRT3, contrôle (+)) ou EphA2-Fc ciblant les éphrins A; puis analyse en cytométrie de flux. F. utilisées dans un test CD69, en présence d'anti-CD3, d'EphA2-Fc, d'EphA4-Fc coatés sur plaque (N=4). Test d'activation CD69 : expression du marqueur CD69 en cytométrie en flux après immunomarquage effectué au terme des 4H d'incubation. Test statistique de Wilcoxon avec  $p < 0,05$  (\*).

**Figure 8. Mise en évidence physique d'un complexe trimoléculaire {TCR MAU; EphA2m; eA1-Fc}.** Enregistrement du signal d'émission ALPHASCREEN exprimé sous forme de ratio/bruit de fond donné par les billes seules A. TCR MAU soluble biotinylé fixé sur billes de streptavidine, eA1-Fc fixé sur billes de protéine A et EphA2 monomérique (EphA2m). Gamme de molarités d'eA1-Fc avec molarité maximale d'EphA2m autorisée par le volume; B. Différents ratio d'émission en fonction de la présence ou non d'EphA2m. Test statistique Wilcoxon; C. Signal ALPHASCREEN comparatif avec EphA2 monomérique ou EphA5 monomérique, avec molarité maximale à 0,7 avec gamme d'eA1-Fc (N=2); D. Signal ALPHASCREEN comparatif avec gamme d'EphA2 monomérique ou EphA5 monomérique et molarité fixe d'eA1-Fc à 0.02 $\mu$ M (N=2).

**Figure Supplémentaire. Absence d'augmentation de l'expression d'EphA2 après infection à CMV.**

A. Immunomarquage secondaire d'EphA2 (10 $\mu$ g/mL, anticorps âne anti-chèvre couplé PE au 1/200<sup>e</sup>) sur des FSF infectés ou non par le CMV, analysé en cytométrie en flux. B. Marquage en immunofluorescence d'EphA2 (en vert et noyaux en bleu DAPI) sur des FSF infectés ou non par le CMV (lignée fibroblastique FSF, CMV TB40/E à une MOI=1, au 4e jour).

## References

1. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, et al. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 2001; 294 (5542): 605.
2. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, et al. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003; 102 (1): 200.
3. Costa G, Loizon S, Guenot M, et al. Control of Plasmodium falciparum erythrocytic cycle: gammadelta T cells target the red blood cell-invasive merozoites. *Blood* 2011; 118 (26): 6952.
4. Dechanet J, Merville P, Berge F, et al. Major expansion of gammadelta T lymphocytes following cytomegalovirus infection in kidney allograft recipients. *J Infect Dis* 1999; 179 (1): 1.
5. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 2010; 10 (7): 467.
6. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* 2013; 13 (2): 88.
7. Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday AC, Eisen HN, Tonegawa S. A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1984; 312 (5989): 36.
8. Chien YH, Iwashima M, Kaplan KB, Elliott JF, Davis MM. A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature* 1987; 327 (6124): 677.
9. Li H, Lebedeva MI, Llera AS, Fields BA, Brenner MB, Mariuzza RA. Structure of the Vdelta domain of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* 1998; 391 (6666): 502.
10. Allison TJ, Winter CC, Fournie JJ, Bonneville M, Garboczi DN. Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* 2001; 411 (6839): 820.
11. Feurle J, Espinosa E, Eckstein S, et al. Escherichia coli produces phosphoantigens activating human gamma delta T cells. *J Biol Chem* 2002; 277 (1): 148.
12. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* 2003; 197 (2): 163.
13. Scotet E, Martinez LO, Grant E, et al. Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* 2005; 22 (1): 71.
14. Vavassori S, Kumar A, Wan GS, et al. Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human gammadelta T cells. *Nat Immunol* 2013.
15. Zeng X, Wei YL, Huang J, et al. gammadelta T cells recognize a microbial encoded B cell antigen to initiate a rapid antigen-specific interleukin-17 response. *Immunity* 2012; 37 (3): 524.
16. Xu B, Pizarro JC, Holmes MA, et al. Crystal structure of a gammadelta T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108 (6): 2414.

17. Spada FM, Grant EP, Peters PJ, et al. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med* 2000; 191 (6): 937.
18. Dechanet J, Merville P, Lim A, et al. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest* 1999; 103 (10): 1437.
19. Pitard V, Roumanes D, Lafarge X, et al. Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood* 2008; 112 (4): 1317.
20. Roux A, Mourin G, Larsen M, et al. Differential Impact of Age and Cytomegalovirus Infection on the gammadelta T Cell Compartment. *J Immunol* 2013; 191 (3): 1300.
21. Vermijlen D, Brouwer M, Donner C, et al. Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. *J Exp Med* 2010; 207 (4): 807.
22. Ehl S, Schwarz K, Enders A, et al. A variant of SCID with specific immune responses and predominance of gamma delta T cells. *J Clin Invest* 2005; 115 (11): 3140.
23. de Villartay JP, Lim A, Al-Mousa H, et al. A novel immunodeficiency associated with hypomorphic RAG1 mutations and CMV infection. *J Clin Invest* 2005; 115 (11): 3291.
24. Knight A, Madrigal AJ, Grace S, et al. The role of Vdelta2-negative gammadelta T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2010; 116 (12): 2164.
25. Scheper W, van Dorp S, Kersting S, et al. gammadeltaT cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT cross-recognize CMV and leukemia. *Leukemia* 2013; 27 (6): 1328.
26. Fornara C, Lilleri D, Revello MG, et al. Kinetics of effector functions and phenotype of virus-specific and gammadelta T lymphocytes in primary human cytomegalovirus infection during pregnancy. *J Clin Immunol* 2011; 31 (6): 1054.
27. Halary F, Pitard V, Dlubek D, et al. Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma} {delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 2005; 201 (10): 1567.
28. Couzi L, Levaillant Y, Jamaï A, et al. Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21 (1): 181.
29. Lafarge X, Merville P, Cazin MC, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* 2001; 184 (5): 533.
30. Kaminski H, Couzi L, Helou S, et al. T Lymphocytes Subpopulation into Cmv Infection with Antiviral Drug Resistance. *Transplant International* 2012; 25: 36.
31. Couzi L, Pitard V, Netzer S, et al. Common features of gammadelta T cells and CD8(+) alphabeta T cells responding to human cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *J Infect Dis* 2009; 200 (9): 1415.

32. Willcox CR, Pitard V, Netzer S, et al. Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat Immunol* 2012; 13 (9): 872.
33. Couzi L, Pitard V, Sicard X, et al. Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human gammadelta T cells expressing CD16 (FcgammaRIIIa). *Blood* 2012; 119 (6): 1418.
34. Geronimi F, Richard E, Redonnet-Vernhet I, et al. Highly efficient lentiviral gene transfer in CD34+ and CD34+/38-/lin- cells from mobilized peripheral blood after cytokine prestimulation. *Stem Cells* 2003; 21 (4): 472.
35. Peterman SM, Dufresne CP, Horning S. The use of a hybrid linear trap/FT-ICR mass spectrometer for on-line high resolution/high mass accuracy bottom-up sequencing. *J Biomol Tech* 2005; 16 (2): 112.
36. Adams EJ, Chien YH, Garcia KC. Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22. *Science* 2005; 308 (5719): 227.
37. Holen HL, Shadidi M, Narvhus K, Kjosnes O, Tierens A, Aasheim HC. Signaling through ephrin-A ligand leads to activation of Src-family kinases, Akt phosphorylation, and inhibition of antigen receptor-induced apoptosis. *J Leukoc Biol* 2008; 84 (4): 1183.
38. Wohlfahrt JG, Karagiannidis C, Kunzmann S, et al. Ephrin-A1 suppresses Th2 cell activation and provides a regulatory link to lung epithelial cells. *J Immunol* 2004; 172 (2): 843.
39. Pasquale EB. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat Rev Cancer* 2010; 10 (3): 165.
40. Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, et al. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 2002; 111 (2): 251.
41. Klein R. Eph/ephrin signalling during development. *Development* 2012; 139 (22): 4105.
42. Depaape V, Suarez-Gonzalez N, Dufour A, et al. Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature* 2005; 435 (7046): 1244.
43. Hunter SG, Zhuang G, Brantley-Sieders D, Swat W, Cowan CW, Chen J. Essential role of Vav family guanine nucleotide exchange factors in EphA receptor-mediated angiogenesis. *Mol Cell Biol* 2006; 26 (13): 4830.
44. Konstantinova I, Nikolova G, Ohara-Imaizumi M, et al. EphA-Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. *Cell* 2007; 129 (2): 359.
45. Freywald A, Sharfe N, Miller CD, Rashotte C, Roifman CM. EphA receptors inhibit anti-CD3-induced apoptosis in thymocytes. *J Immunol* 2006; 176 (7): 4066.
46. Jun G, Guo H, Klein BE, et al. EPHA2 is associated with age-related cortical cataract in mice and humans. *PLoS Genet* 2009; 5 (7): e1000584.
47. Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 2011; 17 (5): 589.

48. Hahn AS, Kaufmann JK, Wies E, et al. The ephrin receptor tyrosine kinase A2 is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Med* 2012; 18 (6): 961.
49. Khounlotham M, Subbian S, Smith R, 3rd, Cirillo SL, Cirillo JD. Mycobacterium tuberculosis interferes with the response to infection by inducing the host EphA2 receptor. *J Infect Dis* 2009; 199 (12): 1797.
50. Salaita K, Groves JT. Roles of the cytoskeleton in regulating EphA2 signals. *Commun Integr Biol* 2010; 3 (5): 454.
51. Astin JW, Batson J, Kadir S, et al. Competition amongst Eph receptors regulates contact inhibition of locomotion and invasiveness in prostate cancer cells. *Nat Cell Biol* 2010; 12 (12): 1194.
52. Tandon M, Vemula SV, Mittal SK. Emerging strategies for EphA2 receptor targeting for cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15 (1): 31.
53. Zhang G, Njauw CN, Park JM, Naruse C, Asano M, Tsao H. EphA2 is an essential mediator of UV radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 2008; 68 (6): 1691.
54. Mosch B, Pietzsch D, Pietzsch J. Irradiation affects cellular properties and Eph receptor expression in human melanoma cells. *Cell Adh Migr* 2012; 6 (2): 113.
55. Vihanto MM, Plock J, Erni D, Frey BM, Frey FJ, Huynh-Do U. Hypoxia up-regulates expression of Eph receptors and ephrins in mouse skin. *Faseb J* 2005; 19 (12): 1689.
56. Thundiyil J, Manzanero S, Pavlovski D, et al. Evidence that the EphA2 receptor exacerbates ischemic brain injury. *PLoS One* 2013; 8 (1): e53528.
57. Swamy M, Jamora C, Havran W, Hayday A. Epithelial decision makers: in search of the 'epimmunome'. *Nat Immunol* 2010; 11 (8): 656.
58. Lemmermann NA, Fink A, Podlech J, et al. Murine cytomegalovirus immune evasion proteins operative in the MHC class I pathway of antigen processing and presentation: state of knowledge, revisions, and questions. *Med Microbiol Immunol* 2012; 201 (4): 497.
59. Garrido F, Cabrera T, Aptsiauri N. "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. *Int J Cancer* 2010; 127 (2): 249.
60. Chodaczek G, Papanna V, Zal MA, Zal T. Body-barrier surveillance by epidermal gammadelta TCRs. *Nat Immunol* 2012; 13 (3): 272.
61. Janes PW, Nievergall E, Lackmann M. Concepts and consequences of Eph receptor clustering. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 23 (1): 43.
62. Salaita K, Nair PM, Petit RS, et al. Restriction of receptor movement alters cellular response: physical force sensing by EphA2. *Science* 2010; 327 (5971): 1380.
63. Lohmuller T, Xu Q, Groves JT. Nanoscale Obstacle Arrays Frustrate Transport of EphA2-Ephrin-A1 Clusters in Cancer Cell Lines. *Nano Lett* 2013.
64. Chien YH, Bonneville M. Gamma delta T cell receptors. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63 (18): 2089.

Figure 1.

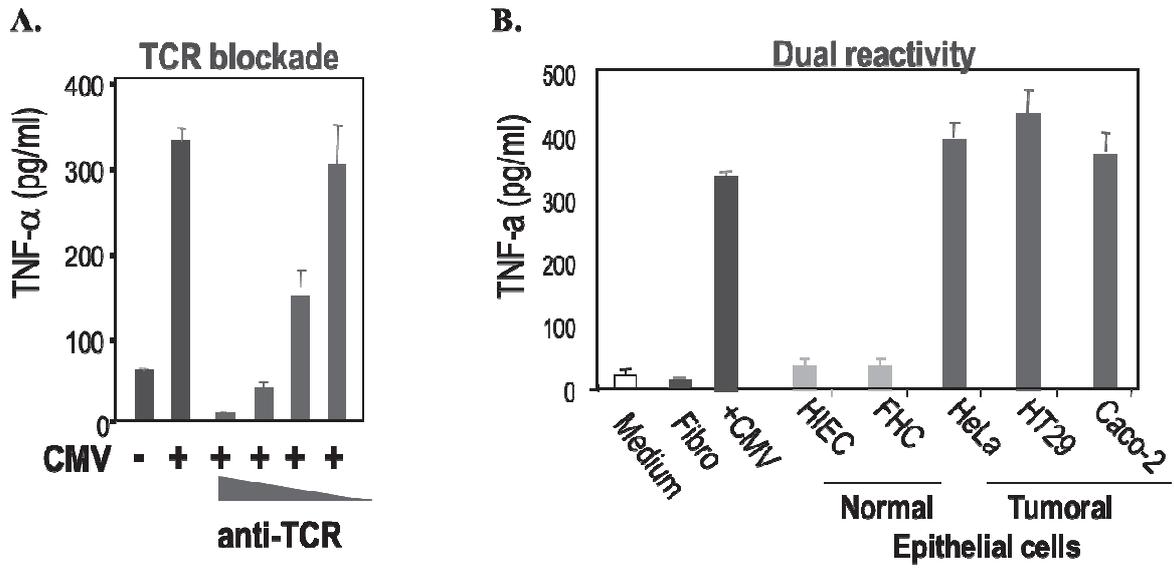


Figure 2.

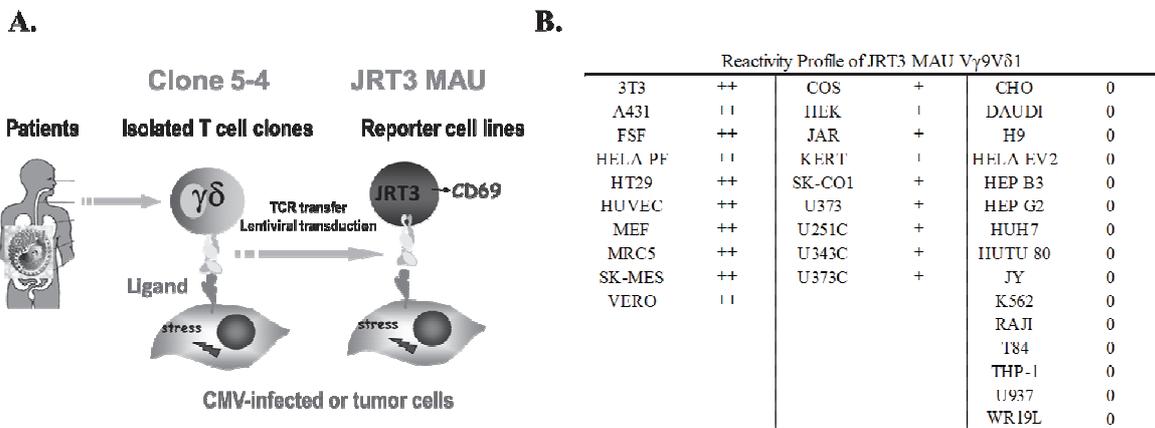
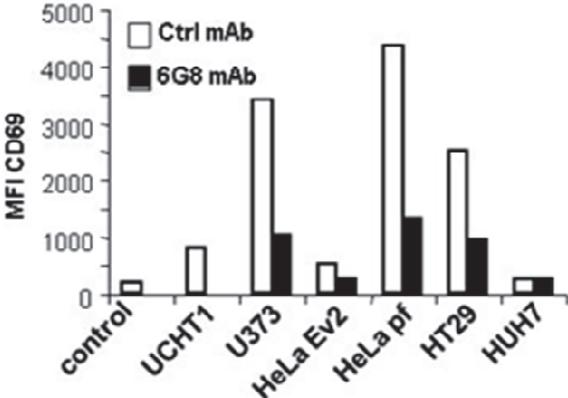


Figure 3.

A.



B.

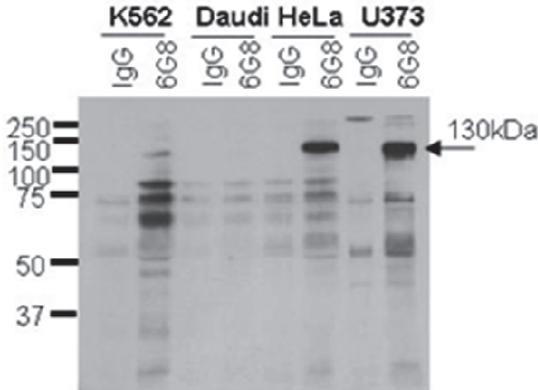


Figure 4.

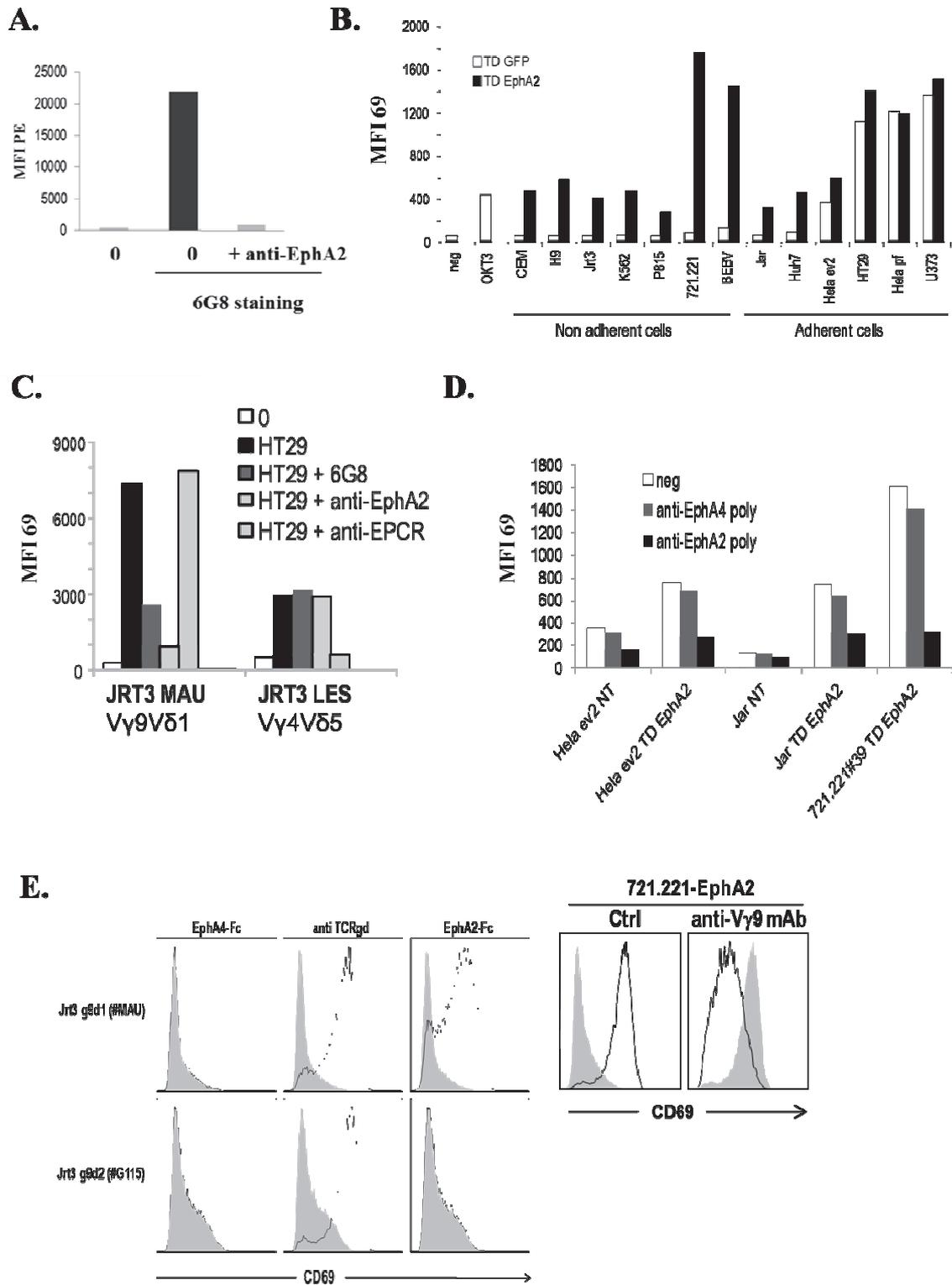


Figure 5.

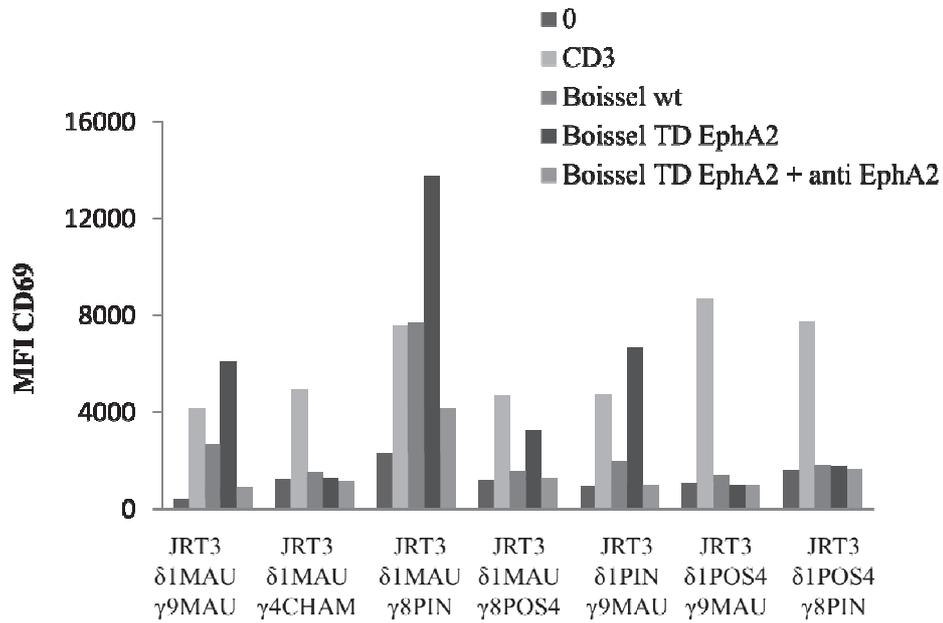


Figure 6.

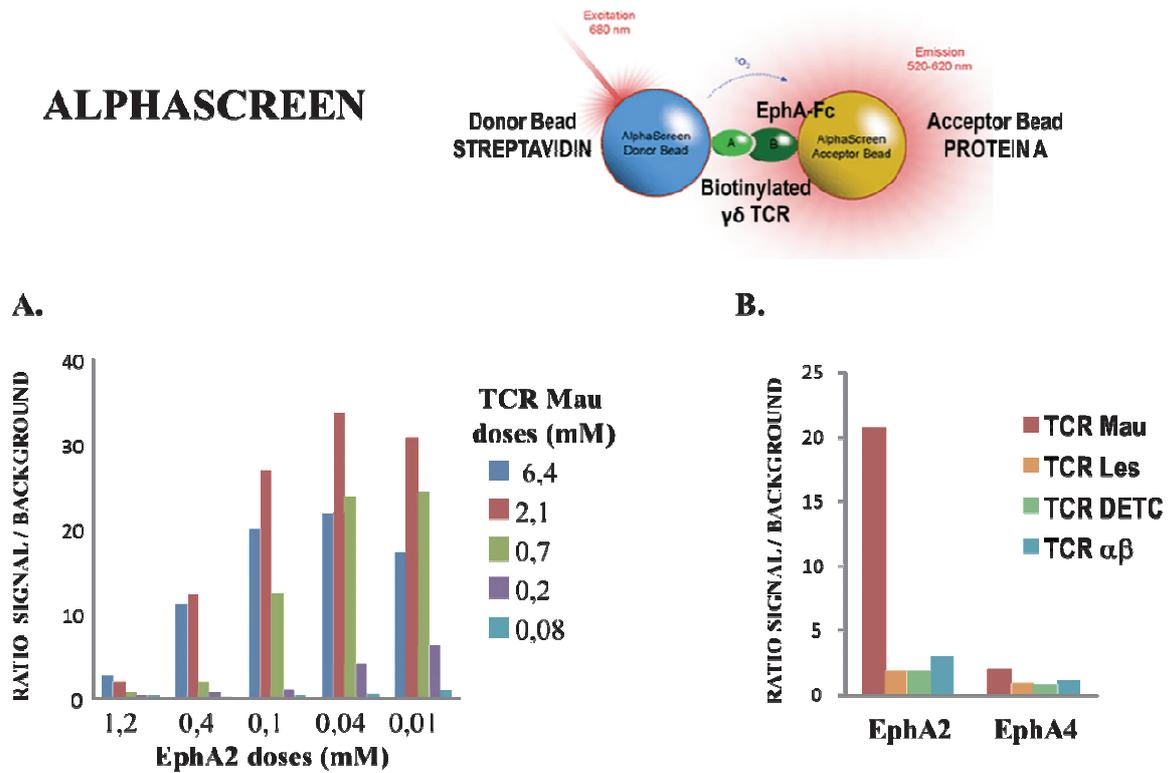
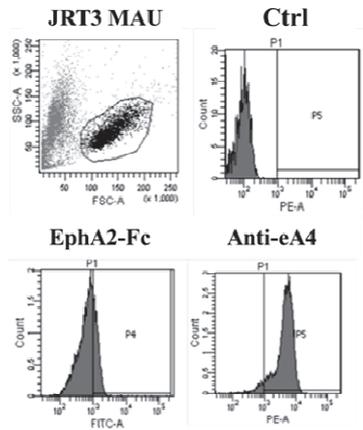
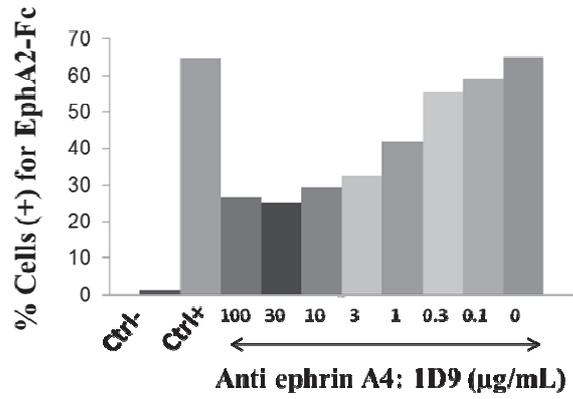


Figure 7.

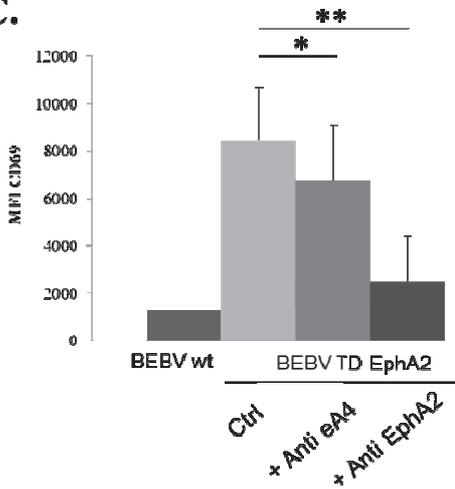
**A.**



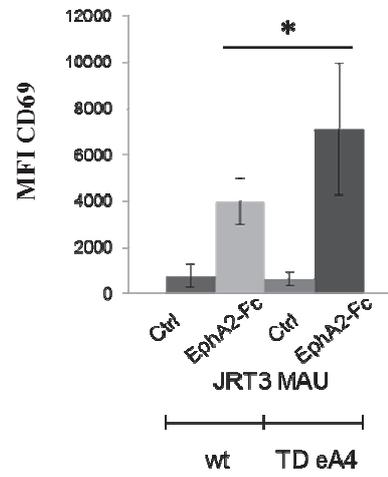
**B.**



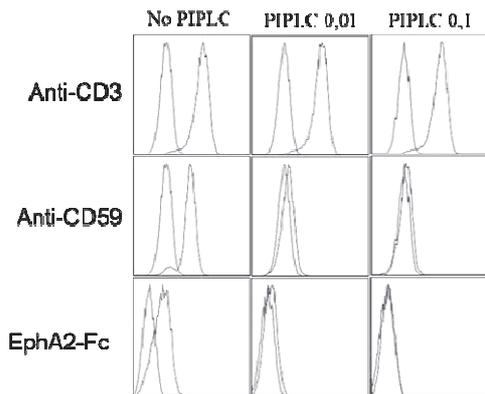
**C.**



**D.**



**E.**



**F.**

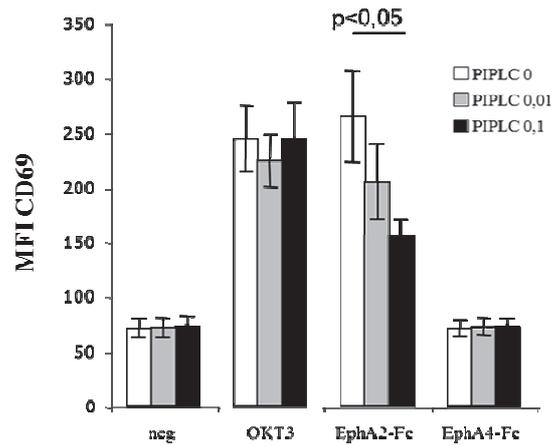


Figure 8.

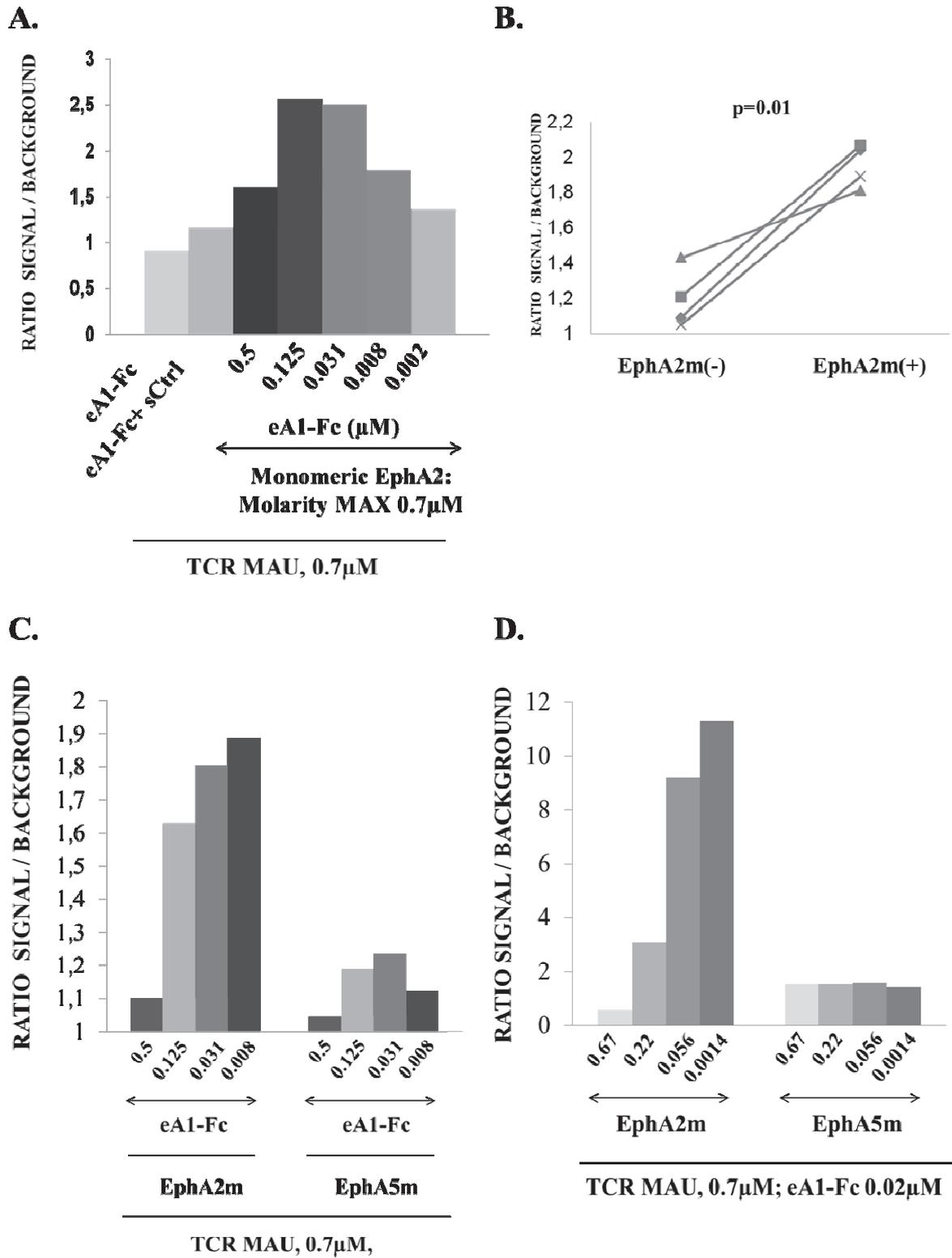
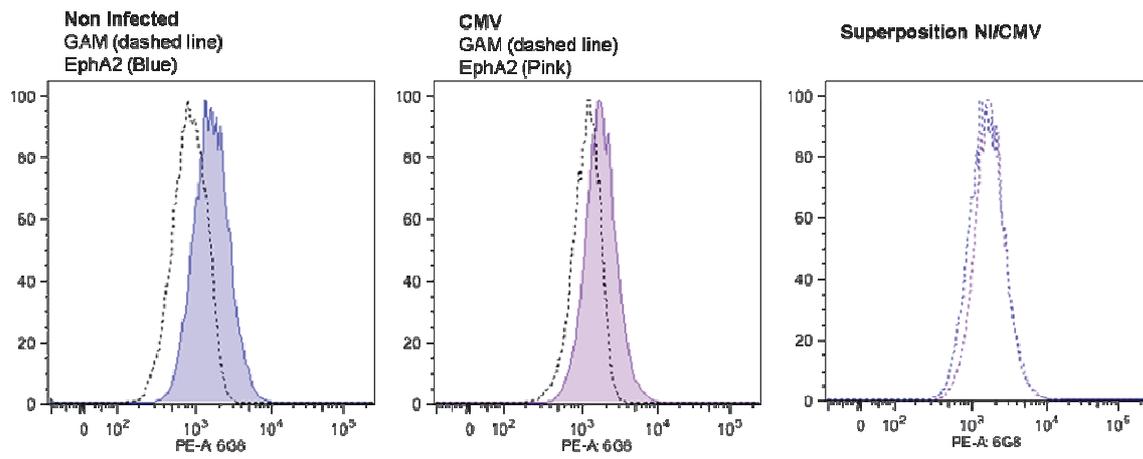
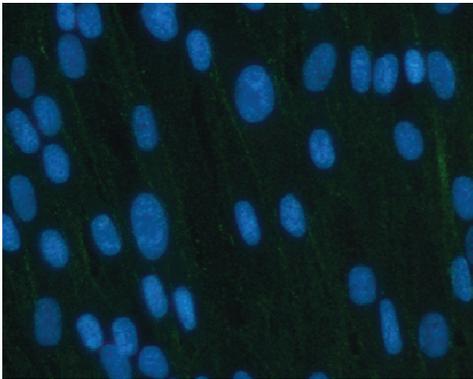


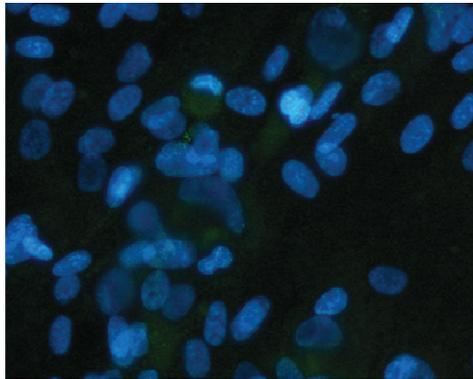
Figure Supplémentaire.



Non infected  
Control



CMV  
Mouse Anti EphA2 mAb (6G8\*)



## **ARTICLE V: Engagement of ephrins A1 and A4 on lymphocytes modulates T cell activation.**

Fort des résultats enregistrés avec la cellule T MAU qui détourne l'interaction naturelle d'EphA2 avec son ligand naturel les éphrines A1 et A4, nous avons ensuite voulu savoir si le couple EphR/éphrines pouvait être impliqué dans d'autres systèmes d'activation lymphocytaire dans lesquelles le TCR ne reconnaît pas EphA2.

Le système EphR/éphrine est intéressant dans le contexte de la transplantation d'organe: il interfère avec la tumorigénèse et pourrait être modifié après infection par le CMV (dans la mesure où un clone de cellules T  $\gamma\delta$  a pu être généré à partir d'un patient ayant monté une réponse T  $\gamma\delta$  soutenue après infection à CMV et que le TCR MAU de ce clone était capable d'interagir avec EphA2).

Grâce à la génération d'un anticorps fonctionnant en cytométrie en flux, nous montrons d'abord que l'expression basale des éphrines A4 est extrêmement faible mais qu'elle peut augmenter après activation polyclonale en milieu IL2, IL15. Ensuite, à partir de différents systèmes d'activation suboptimale lymphocytaire, mis au point par Christelle Harly (Figure 4 A, B, C, D), nous confirmons une fonction immunomodulatrice pour les éphrines.

Ces données sont à mettre en perspective avec les données récentes conférant un rôle immunorégulateur pour plusieurs familles de molécules impliquées dans la neurogénèse et ouvre des passerelles entre la circulation axonale et la circulation membranaire à la surface des cellules immunologiques actives dont le point de confluence réside dans le concept de synapse immunologique.

## Engagement of ephrins A1 and A4 on lymphocytes modulates T cell activation

Thomas Bachelet<sup>1,2,3</sup>, Christelle Harly<sup>2,3</sup>, Vincent Pitard<sup>2,3</sup>, Sonia Netzer<sup>2,3</sup>, Romain Marlin<sup>2,3</sup>, Jean-François Moreau<sup>1,2,3</sup>, Julie Déchanet-Merville<sup>2,3</sup>

1. CHU Bordeaux,

2. Université Bordeaux Segalen,

3. UMR-CNRS 5164,

### INTRODUCTION

Les récepteurs erythropoietin-producing hepatocellular receptors (Ephs) représentent la plus grande famille de récepteurs à activité tyrosine kinase chez l'homme. Ils interagissent classiquement en trans avec les ephrins (Eph receptors interacting proteins) ligand de surface cellulaire au cours d'un contact cellule-cellule. Les éphrines sont composées de huit membres, tous attachés à la membrane, soit par une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) pour les éphrines A (eA) soit par une hélice transmembranaire avec une courte portion intracytoplasmique pour les éphrines B (eB). Les Eph sont aussi divisés en deux familles (EphA et EphB), groupées en partie selon des similarités de séquence, en partie sur une préférence de liaison des EphA pour les eA et des EphB pour les eB. Le système Eph/ éphrines est un système de signalisation bidirectionnelle qui a été impliqué dans de nombreux mécanismes physiologiques et physiopathologiques (1) ; il exerce des effets localisés sur la dynamique du cytosquelette, dirigeant de la sorte des réponses d'attraction ou de répulsion. Il a été initialement décrit dans la morphogénèse en particulier neurologique. Il est à la base d'un système de communication cellule-cellule qui guide le positionnement, la ségrégation et la migration des cellules, contribuant ainsi à la fois à l'homéostasie tissulaire et au développement. Inversement, les Ephs sont largement exprimés au niveau des cellules transformées et dans les vaisseaux des tumeurs vascularisées ; de telle sorte qu'elles ont été impliquées dans la progression tumorale et la diffusion métastatique(2). Du fait de sa large distribution dans l'organisme, le couple Eph/ éphrines a été aussi associé à la plasticité synaptique (3), l'angiogénèse (4, 5), le remodelage osseux (6), la sécrétion d'insuline (7).

Les fonctions régulatrices du couple Eph/ éphrines au sein du système immunitaire n'ont été rapportées que récemment. Elles découlent de leur capacité à moduler le niveau de contact entre différents partenaires cellulaires, niveau de contact dont on sait qu'il est crucial dans (i) l'adhésion et la migration de cellules immunologiquement actives au niveau des sites lésionnels (8, 9) (ii) le développement séquentiel et régulé des cellules de l'immunité adaptative (développement thymique (10) et (iii) la formation et le maintien de synapses immunologiques fonctionnelles (11-16).

Toutefois, la compréhension du rôle exact de ces différents partenaires est handicapée par plusieurs paramètres : d'abord, les outils à disposition sont limités (absence d'anticorps fonctionnant en cytométrie en flux pour les éphrines, mise en évidence reposant jusqu'à présent sur la détection d'ARNm ou sur des analyses en biochimie) ; ensuite la cartographie d'expression du système Eph/éphrines au niveau du système immunitaire est incomplète ; enfin les éphrines et leurs récepteurs semblent pouvoir se trouver à la fois sur les cellules lymphocytaires et sur les cellules présentatrices d'antigènes, avec un niveau d'expression et de signalisation intracellulaire qui diffère en fonction du contexte et du niveau d'activation. A ceci s'ajoutent les effets des signalisations bidirectionnelles sur les cibles et effecteurs, qui complexifient encore l'effet global du couple Eph/éphrines sur le système.

Nous avons récemment identifié EphA2 comme un antigène activateur du TCR  $\gamma\delta$  MAU porté par un clone T  $\gamma\delta$  présentant une double réactivité anti cytomégalo virus et anti tumorale. Ce clone MAU a été généré à partir d'un patient transplanté rénal ayant présenté une infection à CMV avec forte expansion dans le sang circulant de la sous population T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup>. Nous avons montré que la cellule T MAU détournait l'interaction EphA2-éphrines pour amplifier son activation via la création d'un complexe trimoléculaire. Notre hypothèse est que le couple Eph/éphrines interfère avec l'activation des lymphocytes T, indépendamment de la spécificité antigénique reconnue par le TCR, comme un nouveau partenaire cellulaire de régulation immunologique.

L'objectif du travail présenté ici est d'utiliser un nouvel anticorps monoclonal, fonctionnant en cytométrie en flux dirigé contre l'éphrine A4 pour 1. caractériser l'expression d'eA4 au sein des cellules immunes circulantes ; 2. déterminer si la mise en culture de PBMC en milieu IL2 IL15 (privilégiant l'expansion des cellules NK et T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup>) induit une augmentation de l'expression d'eA4 sur les lymphocytes et 3. analyser l'impact d'eA4 dans un système contrôlé d'activation lymphocytaire T.

## **MATERIEL ET METHODE**

### **Anticorps et réactifs**

Ont été utilisés des anticorps anti-TCR  $\gamma\delta$  (#IMMU510), anti-V $\delta$ 2, anti CD16, anti CD69 (Beckman Coulter), anti CD3, CD14, CD19, CD27, CD45RA, et CD107a (BD Biosciences), Ephrines A1, A4, A5 et EphA2, A3, A4, A5, A6 murins fusionnés avec un Fc humain et anti EphA2, anti EphA4, anti EphA3, anti EphA5 (R and D System), anti éphrines A1, A2, A3, A4 et A5(Santa Cruz, Biotechnology).

### **Analyse cytométrie en flux\***

Toutes les analyses ont été pratiquées sur la plateforme de cytométrie de l'université de Bordeaux (Structure Fédérative de Recherche, Biologie Fondamentale et Appliquée à la Médecine, Bordeaux University, Plateforme de cytométrie SFR TransBioMed) FACS cytomètre Fortessa ou Canto II (BD Biosciences). Les tris cellulaires ont été effectués sur le FACS Aria. Le logiciel d'analyse est FACSDiva 6.1.2 software.

#### **Génération de cellules transfectées pour exprimer différents TCR $\gamma\delta$ ou les molécules ephrinA4.**

Les ADNc codant les chaînes V $\gamma$  et V $\delta$  des différents clones T  $\gamma\delta$  ont d'abord été amplifiés par RT-PCR et sous clonés dans pCR2.1 (TA Cloning kit, Invitrogen). Puis, les ADNc ont été inclus dans le vecteur lentiviral TEEW dans lequel les ADNc sont sous le contrôle du promoteur EF1 $\alpha$ ; les particules lentivirales ont ensuite été produites par transfection transitoire des cellules T293 comme précédemment rapporté (17). Les titres viraux ont été déterminés par ELISA de p24. Toutes les productions ont été réalisées sur la plateforme de production de vecteurs lentiviraux de l'université de Bordeaux (Structure Fédérative de Recherche, Biologie Fondamentale et Appliquée à la Médecine, Bordeaux University, Plateforme de cytométrie SFR TransBioMed). Puis, les cellules J.RT3-T3.5 (American Type Culture Collection) ont été co-transduites avec des particules lentivirales exprimant une chaîne V $\gamma$  et une chaîne V $\delta$ . Ceci a été réalisé à différents niveaux d'infection de 2, 4 et en milieu RPMI à 8% de sérum de veau fœtal avec 8 $\mu$ g/mL de protamine sulfate (Sigma). Après 24 heures d'infection, les cellules TCR+ ont été lavées deux fois puis triées au cytomètre (FACS Aria et FACSDiva 6.1.2 software; BD Biosciences).

Le mécanisme de production des lignées murines WR19L transduites avec eA4 est basée sur le même principe aux différences près suivantes (i) vecteur lentiviral 197 avec un IRES2 (1 ARN et eux protéines exprimées) sous le contrôle d'un promoteur MND avec les sites de restriction NheI et MluI pour assurer l'insertion des oligonucléotides d'ephrin A4 (ephrin-A4 S NheI \*TTTTGCTAGC\*TGCCAGGCCAGACCAAACCG, ephrin-A4 AS MluI \*TTTTACGCGT\*ATTGGCACCCCCAGTGCAGG) (ii) un contrôle de l'efficacité de la transduction par analyse de l'expression de Zs-green.

#### **Génération des anticorps monoclonaux murins anti eA4 #1D9 et #9C10**

Pour la génération des anticorps monoclonaux anti ephrinA4, 10 $\mu$ g d'eA4 couplé à un fragment Fc (R et D system) ont été injectés avec de l'adjuvant de Freund dans le coussin plantaire de souris BALB/c (n=2). Douze jours plus tard, les souris ont été restimulées dans les mêmes conditions (injection « boost »). Au quinzième jour, les ganglions poplités ont été collectés après euthanasie des souris et dissection du scarpia puis les cellules B ont été extraites et fusionnées avec un partenaire myélomateux de fusion (cellules P3U1). Les hybridomes ont été cultivés jusqu'à confluence et évalués sur leur capacité à marquer spécifiquement les cellules WR19L transduites pour eA4 et pas les WR19L non

transduites (marquage secondaire Goat anti Mouse couplé PE au 1/200e). Les hybridomes dont l'anticorps présent dans le surnageant marquait spécifiquement la WR19L transduite avec éphrine A4 ont été clonés en dilution limite et les mAb 1D9 et 9C10 (tous deux d'isotype IgG2) ont été sélectionnés pour leur forte capacité de marquage. A noter que la génération d'un anti éphrine A1 fonctionnant en cytométrie n'a pu aboutir malgré trois immunisations du fait d'un problème de transduction de la WR19L TD eA1 (expression Zs-green sans marquage par le ligand naturel d'éphrine A1, EphA2. Confirmation par marquage secondaire du marquage d'EphA2-Fc (goat anti human au 1/200° couplé FITC), nouvelle transduction en cours).

**Génération de lignées IL2 IL15 et tests fonctionnels :** Les cellules mononucléées du sang PBMC ont été obtenues après gradient de Ficoll sur échantillons de sang prélevés dans le cadre de soins courant, avec accord du comité médical éthique local. Les cellules isolées ont été marquées en marquage indirect multicolore soit à l'état frais soit après décongélation. Des lignées IL2 IL15 ont été générées (génération de lignées court-terme avec mise en culture de cellules PBMC reprises à  $2.10^6$ /mL en milieu RPMI (Invitrogen) supplémenté avec 8% de sérum de veau foetal, 1000UI/ml de rIL2 (Chiron) et 10ng/mL d'IL15 (Preprotech) à partir de patients transplantés rénaux infectés par le cytomégalovirus.

Pour les tests fonctionnels, les plaques P96 à fond plat ont été co-coatées overnight avec de l'anti CD3 à 0.01, 0.1 et 10µg/mL et soit un anti ephrin murin (généré comme décrit ci-dessus) ou lapins (Santa Cruz), soit des Ephs murins fusionnés avec des Fc humains soit un anticorps control monoclonal IF10 de souris anti LIF, généré par l'équipe. Le potentiel de dégranulation des cellules T a été évalué dans un test CD107a et le niveau d'activation des cellules circulantes par l'expression de CD69 : les cellules de PBMC provenant de donneurs de sang de l'EFS ( $5.10^5$  cellules effecteurs par puits) ont été cocultivées pendant 6 heures en présence d'anti-CD107a couplé à la phycoérythrin (PE) (H4A3 ; BD Biosciences) et de monenzyme (10µg/mL ; Sigma) ; puis récupérées et marquées avec un anti CD3, un anti-pan  $\gamma\delta$ , un anti-V $\delta$ 2 ou un anti CD4 et un anti CD8, avant d'être analysés en cytométrie de flux\*. Pour le test CD69, elles ont été récupérées après une période d'incubation variable en milieu RPMI, SVF8% et marquées avec l'anti CD69 en même temps que les autres marquages puis analysées au cytomètre. Pour les JRT3 transduites avec différents TCR  $\gamma\delta$ , les cellules effectrices ( $10^5$  cellules par puits) ont été incubées dans les puits après lavage. Après 4H, Le test d'activation des cellules JRT3 transduites avec différents TCRs est basé sur le marquage membranaire CD69 : les cellules sont cocultivées pendant 4 heures à 37°C puis marquées par un mAb anti CD69-PE (Clone TP1.55.3) ± un anti CD2 couplé à la fluorescein isothiocyanate (FITC) et analysées sur cytomètre\*. Pour les lignées IL2 IL15, un tri sur les cellules CD3+  $\gamma\delta$ + V $\delta$ 2- était réalisé la veille sur FACSAria avec incubation des cellules dans les puits coatés dans un milieu enrichi à 10 ng/mL d'IL12 (PreproTech). Après 24H à 37°C, l'INF $\gamma$  présent dans les surnageants a été quantifié par test ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay, Bender MedSystems).

## Statistiques

Les analyses ont été réalisées selon les méthodes statistiques conventionnelles. Le test Mac Nemar  $\chi^2$  a été utilisé pour les variables qualitatives; les tests de Mann-Whitney et de Willcoxon ont été utilisés pour les variables quantitatives quand indiqués. Les analyses ont été faites sur le logiciel JMP 10 IN (2012, SAS Institute Inc. Cary, NC).

## RESULTATS

### Expression basale d'éphrine A4 sur les PBMC

A l'état basal sur cellules fraîches ou décongelées, l'expression d'eA4 a été analysée chez différents patients (donneurs de sang EFS ou patients transplantés rénaux ayant expérimenté une infection à CMV avec expansion de cellules T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> >5% des lymphocytes T CD3+). L'expression du CD16 et du V $\delta$ 1 a été utilisée comme contrôle positif de marquage sur ces cellules.

Les lymphocytes CD3+ et CD3- n'expriment que peu d'eA4 à l'état basal (Figure 1). Certains individus n'en expriment pas du tout (Figure 1B) et d'autres en expriment un peu (exemple montré en Figure 1C panel du bas). Sur l'ensemble des individus la médiane d'expression est présentée dans la Figure 1C. Ce marquage ne varie pas en fonction du niveau de différenciation des cellules T étudiées (non montré); en particulier l'acquisition d'un phénotype de différenciation terminale tel qu'il est enregistré après infection à CMV sur les contingents T  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$  n'est pas associé à une augmentation de l'expression d'eA4 (Figure 2A). La positivité de l'eA4 sur les lymphocytes CD3- est principalement expliquée par un marquage anti-eA4 sur les lymphocytes B (Figure 2B). A l'inverse, les monocytes expriment de hauts niveaux d'eA4 (Figure 2C).

### Induction de l'expression d'éphrine A4 dans un milieu enrichi en IL2 IL15

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'expression d'eA4 pouvait être induite à la surface des lymphocytes par leur activation polyclonale. Une activation par anti-CD3, PHA ou PMA Iono n'induit pas de variation significative de l'expression d'eA4 sur les lymphocytes T CD3+ (données non montrées). Nous avons ensuite appliqué les conditions de culture que nous utilisons pour amplifier les cellules T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> in vitro tout en conservant leur phénotype de cellules effecteurs mémoires différenciées TEMRA (CD45RA+, CD27-) par adjonction d'IL2 et IL15 aux PBMCs (Figure 3A). L'expression d'eA4 augmente dans ces conditions sur les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> mais aussi sur les autres lymphocytes non  $\gamma\delta$ , suggérant que sous certaines conditions d'activation les lymphocytes peuvent augmenter leur expression d'eA4, comme cela avait déjà été suggéré en présence de sérum humain (14) (Figure 3B-C).

## **Retentissement fonctionnel de l'interférence avec les éphrines lymphocytaires**

La fonction de l'eA4 exprimée par les lymphocytes T après activation a ensuite été étudiée. Sur les PBMC totaux, une activation suboptimale par une gamme d'anti CD3 coaté est modulée négativement par l'engagement des éphrines par des Eph couplés à des fragments Fc (Eph-Fc). De façon surprenante elle est aussi inhibée par des anticorps commerciaux dirigés contre les éphrines A1 ou A4, alors que l'adjonction d'un anticorps contrôle ne modifie pas le niveau d'activation basale : l'engagement des éphrines sur les lymphocytes CD4+, CD8+, doubles négatifs, doubles positifs, T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{\text{neg}}$  et T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{\text{pos}}$  induit une diminution significative de l'expression de CD69 (Figure 4A). Ces anticorps anti-eA1 ou eA4 commerciaux ne fonctionnent pas en cytométrie mais semblent avoir une activité fonctionnelle malgré la faible expression de l'éphrine A4 à la surface des PBMC.

L'activation des cellules T par des anti-CD3 entraîne une diminution de l'expression du TCR et du CD3 qui lui est lié. Cette diminution est moindre et se rapproche du contrôle quand les anticorps commerciaux anti-éphrines A1 et A4 sont ajoutés en même temps que l'anti-CD3, sur tous les sous types lymphocytaires (Figure 4B). Les éphrines A1 et A4 semblent impliquées. La confirmation de l'expression d'eA1 n'a pour l'instant pas pu être réalisée en l'absence d'anticorps fonctionnant en cytométrie.

Sur les JRT3  $\gamma\delta$ , eA4 est largement exprimée. L'ajout d'anticorps anti-eA4 déplace la fixation d'EphA2 Fc sur les JRT3 mais de façon incomplète (20% de fixation d'EphA2 résiduelle) suggérant l'expression de molécules redondantes liant EphA2, type éphrine A1. L'engagement des éphrines soit directement par des anti-eA4 ou eA1 commerciaux soit indirectement par des Eph-Fc diminue l'activation des JRT3 par le CD3 (Figure 3C pour la JRT3 V $\gamma 9$ V $\delta 2$ ).

Sur les PBMC stimulées de façon suboptimale avec des anti CD3, conjointement avec du pamidronate (biphosphonate connu pour amplifier l'activation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{\text{pos}}$  via la génération de phosphoantigènes), l'expression de CD107a membranaire sur les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{\text{pos}}$  est également moindre après engagement des éphrines (Figure 4D).

Enfin, la production d'INF- $\gamma$  en présence d'IL12 par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta 2^{\text{neg}}$ , enrichis après culture en milieu IL2 IL15, est aussi diminuée après engagement des éphrines sur les lymphocytes en conditions sous maximale d'activation par un anti-CD3 (Figure 4E). Dans ces expériences, l'anti-eA4 utilisé était l'anticorps que nous avons généré.

## **DISCUSSION**

Nos résultats confirment un rôle immunologique pour les éphrines exprimées au niveau lymphocytaire. Grâce à la génération d'un anticorps monoclonal murin anti-eA4 fonctionnant en

cytométrie, nous montrons que l'expression basale d'eA4 est faible au niveau des lymphocytes, à l'exception notable des lymphocytes B, mais qu'elle augmente après culture avec de l'IL2 et de l'IL15. Malgré un faible niveau d'expression, l'engagement des ephrins sur les lymphocytes module négativement l'activation suboptimale par le CD3.

Du fait de leur capacité à interagir avec la migration cellulaire et le contact cellule-cellule, un rôle dans la circulation des cellules immunitaires avait déjà été suggéré pour le couple Eph/éphrines : à l'interface endothéliale, l'expression séquentielle des éphrines et des Eph et leur capacité à moduler le cytosquelette et l'expression des intégrines joueraient un rôle dans les phases initiales de contact (roulement, ancrage puis translocation) (9). C'est cette même capacité à contrôler les phénomènes d'attraction/répulsion qui leur confère un rôle dans l'entrée, la migration et la sortie des thymocytes, contribuant ainsi à leur différenciation (10).

Nos données sont toutefois originales dans la mesure où elles suggèrent que les éphrines au niveau lymphocytaire peuvent moduler les conditions d'activation classique. Si quelques publications suggèrent de façon convaincante l'implication des EphB au niveau de certains lymphocytes (11, 12), peu d'équipes ont jusqu'à présent fait la démonstration d'un rôle de leurs ligands, les éphrines. Wohlfahrt et collègues ont rapporté un rôle immunomodulateur pour la protéine eA1 sur les cellules T CD4+ dans un modèle pulmonaire d'asthme à différenciation Th2 (16).

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer notre résultat : D'abord, l'engagement des éphrines induit une signalisation qui module la cascade de phosphorylations induites par le CD3. L'analyse biochimique et l'identification des cibles restent à faire. Toutefois, le fait que l'engagement (potentiellement activateur) par des Eph-Fc liant les éphrines lymphocytaires tout comme l'engagement par différents anticorps anti éphrine (dont certains pourraient être bloquants) induisent le même type de réponse fait privilégier une explication alternative : Les synapses immunologiques qui servent de plateforme à la signalisation induite par l'engagement du TCR, du CD3 et le recrutement de protéines adaptatrices (18) sont susceptibles d'être déstabilisées par une interférence avec les éphrines, qui les dissocierait. Cette hypothèse permettrait d'harmoniser cette réponse stéréotypée dans différents systèmes d'activation lymphocytaire T et différents tests d'activation.

Pour étayer cette observation, on peut aussi envisager d'autres pistes et d'autres outils (i) l'utilisation d'autres anticorps anti éphrines pour bloquer de la façon la plus exhaustive possible la totalité de l'axe Eph-éphrines, (ii) l'utilisation d'ARN interférants est également susceptible de répondre à cette exigence, (iii) la mise au point du marquage membranaire des éphrines et l'enregistrement de leur circulation membranaire, dans différentes conditions d'activation, (iv) l'utilisation d'un système d'activation lymphocytaire T physiologique inductible avec un TCR à la spécificité connue (spécifique de l'ovalbumine, d'un peptide du CMV, d'un antigène de tumeur,...) et des cellules cibles présentant cet antigène pour mesurer l'effet de la modulation du couple Eph/ éphrines en paracrine.

Quoiqu'il en soit, il est intéressant de souligner la reconnaissance récente d'un rôle immunologique pour plusieurs couples de récepteurs, initialement décrits dans la neurogénèse. Parmi elles, le couple semaphorin/plexin semble particulièrement pertinent (19, 20). Il a été rapporté dans différents modèles d'immunorégulation et de façon récente impliqué dans la génération de T reg (21) et comme molécule de costimulation alternative des lymphocytes  $\gamma\delta$  T épithéliaux murins de type DETC(22).

Collectivement, ces données confirment que la compréhension des signaux de costimulation ou d'inhibition du signal activateur de la cellule T est encore incomplète. Des molécules membranaires telles que les ephrins pourraient aussi avoir un rôle soit en interférant avec la signalisation intracellulaire, soit en interférant avec la circulation des radeaux lipidiques qui permettent au TCR de générer son signal. Il s'agit en tout d'un nouvel axe original de travail qui mériterait d'être développé, en étendant ces résultats au niveau des autres cellules immunologiquement actives et des lymphocytes B.

## Légende des Figures.

**Figure 1. Expression basale d'éphrine A4 (eA4) sur les lymphocytes.** A. Marquage représentatif d'un échantillon de PBMC. B. Marquage des lymphocytes CD3<sup>+</sup>, αβ et γδ Vδ2<sup>neg</sup> avec un anticorps control (ISO, anti LIF), anti eA4, anti CD16 et anti Vδ1 (10μg/mL). Immunomarquage secondaire avec anticorps de chèvre anti souris couplé PE au 1/200e, après marquage anti CD3, anti γδ, anti Vδ2, matrice de compensation et lecture au cytomètre en flux (ici, les lymphocytes T γδ Vδ2<sup>neg</sup> induits par le CMV sont Vδ1 et CD16 positifs). C. Médianes des MFI des lymphocytes CD3<sup>+</sup> marqués avec l'anticorps anti-eA4 ou avec l'anticorps contrôle et ratio des MFI d'eA4 par rapport au contrôle. Comparaison des moyennes avec test de Mann Whitney, N=52. Immunomarquage représentatif de l'expression d'eA4 en comparaison au contrôle.

**Figure 2. Expression basale d'éphrine A4 (eA4) sur les cellules immunitaires.** A. Marquage d'eA4 sur les cellules effecteurs mémoires TEMRA αβ ou γδ Vδ2<sup>neg</sup>. B. Expression d'éphrine A4 sur les cellules lymphocytaires CD3<sup>-</sup>, CD16<sup>-</sup> et CD16<sup>+</sup>. C. Expression d'eA4 sur les lymphocytes B et les monocytes. Immunomarquage secondaire avec anticorps de chèvre anti souris couplé PE au 1/200e, après marquage anti CD3, anti γδ, anti Vδ2, CD27, CD45RA, CD16 ou CD19 ou CD14, matrice de compensation et lecture au cytomètre en flux.

**Figure 3. Induction d'éphrine A4 en culture avec de l'IL2 et de l'IL15.** A. Expression du phénotype TEMRA de cellules T γδ Vδ2<sup>neg</sup> T après mise en culture en IL2 (1000UI/mL) et IL15 (10ng/mL) de PBMC issues de patients transplantés d'organes solides (TOS) ayant expérimenté une infection à CMV. B. Immunomarquage représentatif de l'expression d'eA4 (avec contrôle négatif et anti-CD16 contrôle positif) entre le jour de la mise en culture et 7 jours plus tard. C. Augmentation significative du ratio des MFI d'eA4 pr rapport au contrôle, analysé au niveau des lymphocytes T CD3<sup>+</sup>, N=25. Comparaison effectuée avec un test de Wilcoxon. Résultats similaires sur lymphocytes T αβ et T γδ Vδ2<sup>neg</sup>.

**Figure 4. Modulation de l'activation des TCR αβ et γδ par l'engagement des éphrines A1 et A4.** A. Activation ex vivo de PBMC provenant de donneurs de sang, avec des concentrations variables d'anti-CD3 (OKT3) ± des anti éphrines (commerciaux) ou des Eph-Fc fixés sur plaque (10μg/mL). L'expression du marqueur d'activation CD69 a été enregistrée sur les différents sous types cellulaires des lymphocytes CD3<sup>+</sup> après immunomarquage multicouleur (CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4-CD8<sup>-</sup>, CD4+CD8<sup>+</sup>, Vδ2<sup>neg</sup>, Vδ2<sup>pos</sup>) au terme de 13H d'incubation et analysée en cytométrie en flux. Résultats similaires sur tous les sous types. B. Activation ex vivo de PBMC avec des concentrations croissantes d'anti-CD3 fixé sur plaque pendant 13H. L'inhibition d'activation par l'engagement des éphrines exprimées par les lymphocytes T CD3<sup>+</sup> (eA1 et eA4 mais pas eA2,3,5) est associée à une diminution de l'expression membranaire du CD3. C. Inhibition de l'activation sous maximale de la JRT3 Vγ9Vδ2 (anti- CD3 fixé sur plaque) par l'engagement des éphrines (Test CD69, 4H, analyse en cytométrie en

flux). D. Inhibition de l'activation sous maximale (anti-CD3 fixé sur plaque) des lymphocytes T V $\delta$ 2<sup>pos</sup> en présence de pamidronate 1 $\mu$ M par l'engagement des éphrines (Test CD107a+monoenzyme 6H, l'expression du marqueur membranaire a été enregistrée après 6 heures d'incubation et immunomarquage des cellules T CD3+,  $\gamma\delta$ ,V $\delta$ 2<sup>pos</sup>). E. Inhibition de l'activation sous maximale (anti-CD3 fixé sur plaque) des lymphocytes T V $\delta$ 2<sup>neg</sup> triés à 3 semaines de culture en IL2 (1000UI/mL) IL15 (10ng/mL) (Mesure de la production d'INF- $\gamma$  par ELISA dans le surnageant, à 24H de culture en milieu enrichi en IL12).

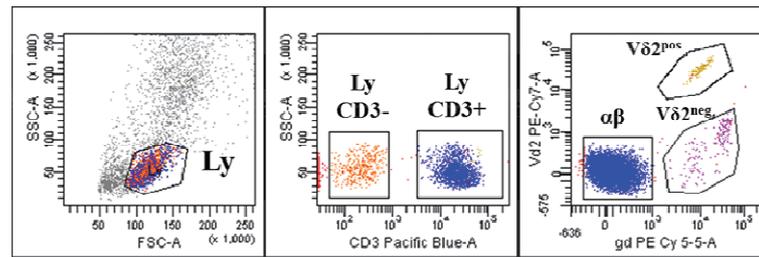
## REFERENCES

1. Pasquale EB. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat Rev Cancer* 2010; 10 (3): 165.
2. Tandon M, Vemula SV, Mittal SK. Emerging strategies for EphA2 receptor targeting for cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15 (1): 31.
3. Sheffler-Collins SI, Dalva MB. EphBs: an integral link between synaptic function and synaptopathies. *Trends Neurosci* 2012; 35 (5): 293.
4. Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* 2010; 465 (7297): 483.
5. Sawamiphak S, Seidel S, Essmann CL, et al. Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature* 2010; 465 (7297): 487.
6. Matsuo K, Otaki N. Bone cell interactions through Eph/ephrin: bone modeling, remodeling and associated diseases. *Cell Adh Migr* 2012; 6 (2): 148.
7. Konstantinova I, Nikolova G, Ohara-Imaizumi M, et al. EphA-Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. *Cell* 2007; 129 (2): 359.
8. Khounlotham M, Subbian S, Smith R, 3rd, Cirillo SL, Cirillo JD. Mycobacterium tuberculosis interferes with the response to infection by inducing the host EphA2 receptor. *J Infect Dis* 2009; 199 (12): 1797.
9. Funk SD, Yurdagul A, Jr., Albert P, et al. EphA2 activation promotes the endothelial cell inflammatory response: a potential role in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32 (3): 686.
10. Mendes-da-Cruz DA, Stimamiglio MA, Munoz JJ, et al. Developing T-cell migration: role of semaphorins and ephrins. *Faseb J* 2012; 26 (11): 4390.
11. Luo H, Yu G, Wu Y, Wu J. EphB6 crosslinking results in costimulation of T cells. *J Clin Invest* 2002; 110 (8): 1141.
12. Luo H, Yu G, Tremblay J, Wu J. EphB6-null mutation results in compromised T cell function. *J Clin Invest* 2004; 114 (12): 1762.

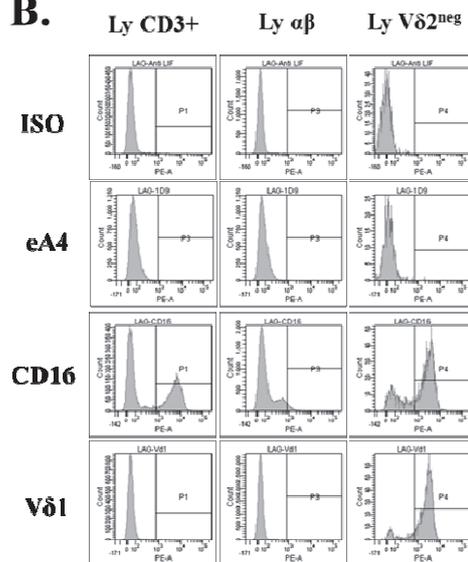
13. Holen HL, Nustad K, Aasheim HC. Activation of EphA receptors on CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> memory cells stimulates migration. *J Leukoc Biol* 2010; 87 (6): 1059.
14. Holen HL, Shadidi M, Narvhus K, Kjosnes O, Tierens A, Aasheim HC. Signaling through ephrin-A ligand leads to activation of Src-family kinases, Akt phosphorylation, and inhibition of antigen receptor-induced apoptosis. *J Leukoc Biol* 2008; 84 (4): 1183.
15. Kawano H, Katayama Y, Minagawa K, Shimoyama M, Henkemeyer M, Matsui T. A novel feedback mechanism by Ephrin-B1/B2 in T-cell activation involves a concentration-dependent switch from costimulation to inhibition. *Eur J Immunol* 2012; 42 (6): 1562.
16. Wohlfahrt JG, Karagiannidis C, Kunzmann S, et al. Ephrin-A1 suppresses Th2 cell activation and provides a regulatory link to lung epithelial cells. *J Immunol* 2004; 172 (2): 843.
17. Geronimi F, Richard E, Redonnet-Vernhet I, et al. Highly efficient lentiviral gene transfer in CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>/38<sup>-</sup>/lin<sup>-</sup> cells from mobilized peripheral blood after cytokine prestimulation. *Stem Cells* 2003; 21 (4): 472.
18. Magee T, Pirinen N, Adler J, Pagakis SN, Parmryd I. Lipid rafts: cell surface platforms for T cell signaling. *Biol Res* 2002; 35 (2): 127.
19. O'Connor BP, Eun SY, Ye Z, et al. Semaphorin 6D regulates the late phase of CD4<sup>+</sup> T cell primary immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105 (35): 13015.
20. Sakurai A, Doci CL, Gutkind JS. Semaphorin signaling in angiogenesis, lymphangiogenesis and cancer. *Cell Res* 2012; 22 (1): 23.
21. Delgoffe GM, Woo SR, Turnis ME, et al. Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature* 2013.
22. Witherden DA, Watanabe M, Garijo O, et al. The CD100 receptor interacts with its plexin B2 ligand to regulate epidermal gammadelta T cell function. *Immunity* 2012; 37 (2): 314.

Figure 1.

**A.**



**B.**



**C.**

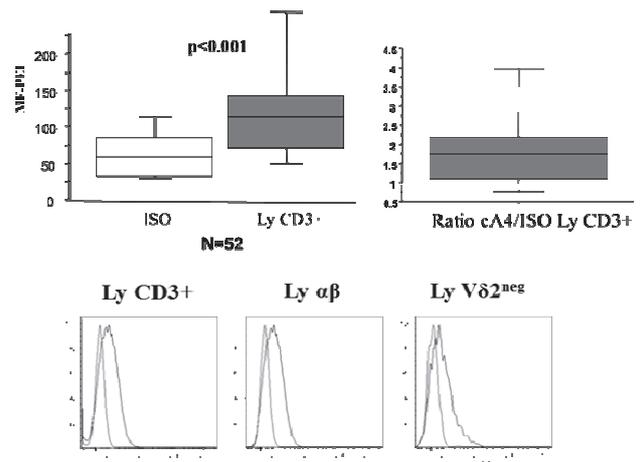


Figure 2.

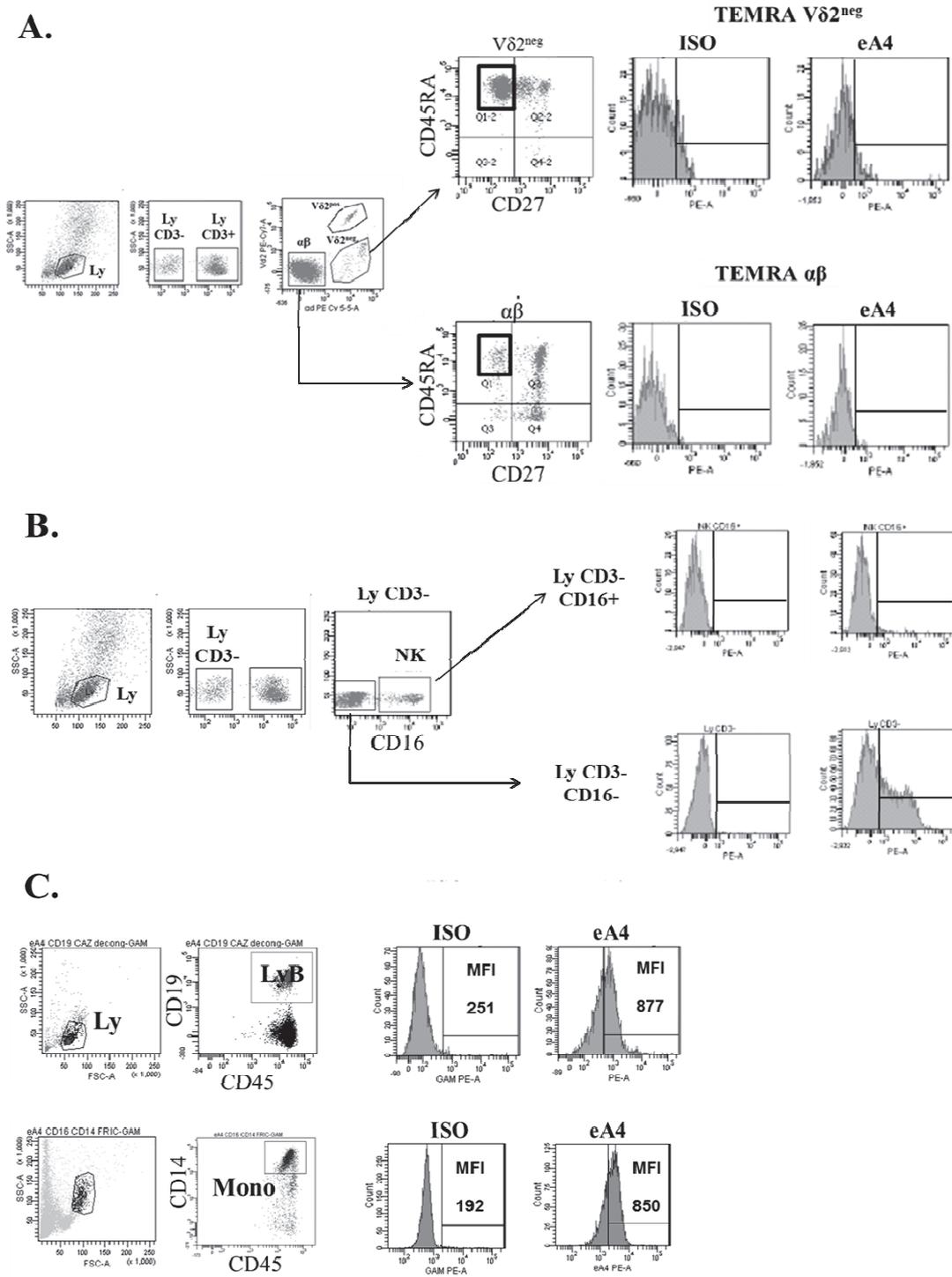
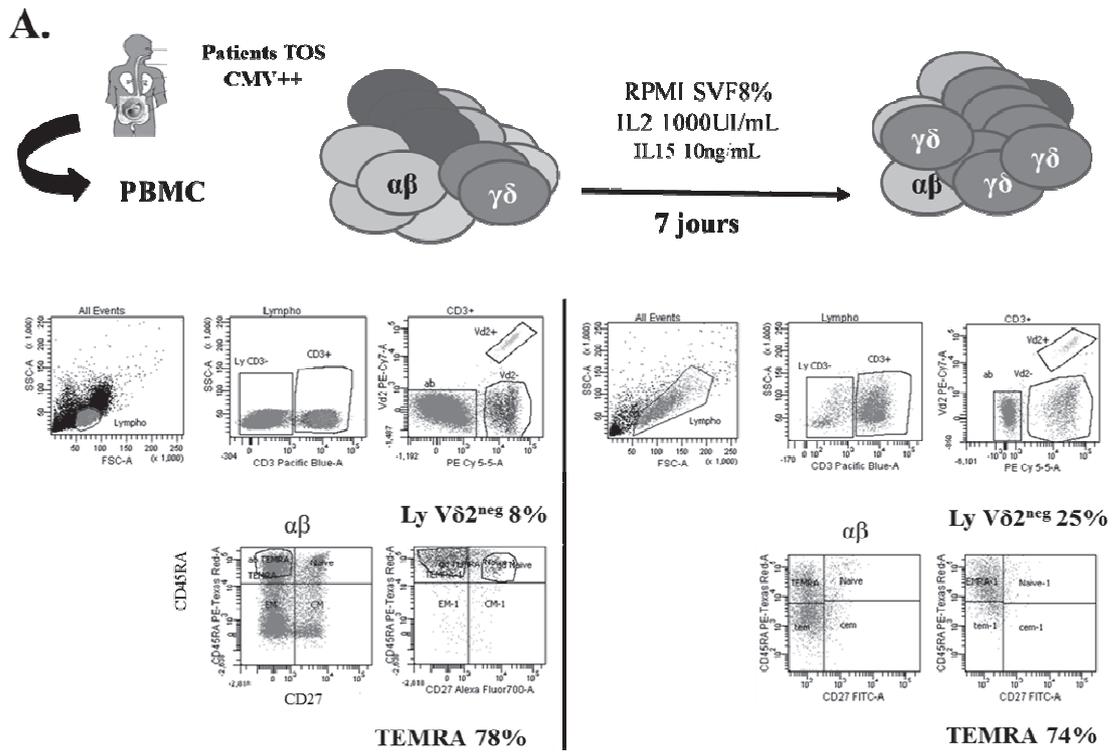
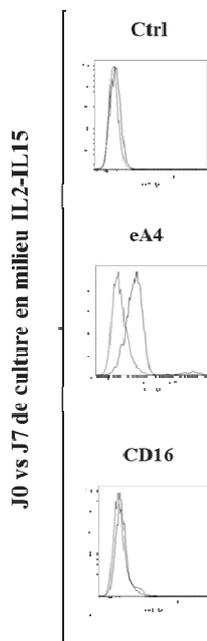


Figure 3.



**B.** Ly CD3+



**C.**

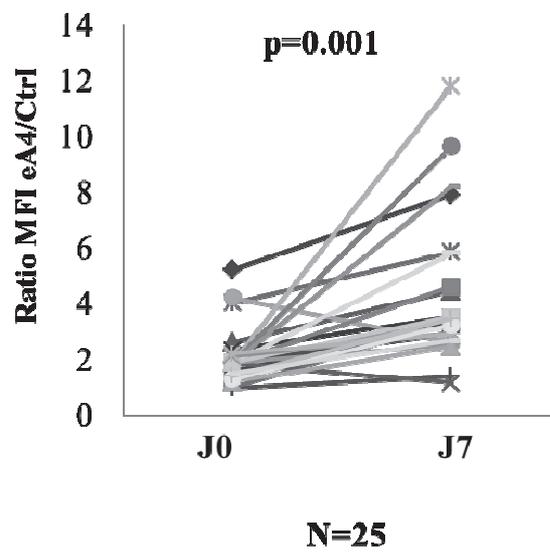
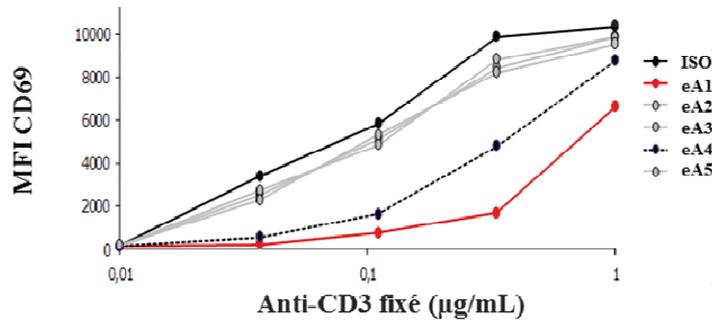
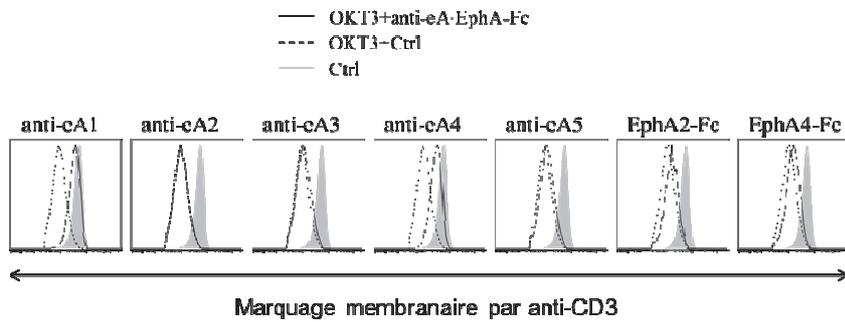


Figure 4.

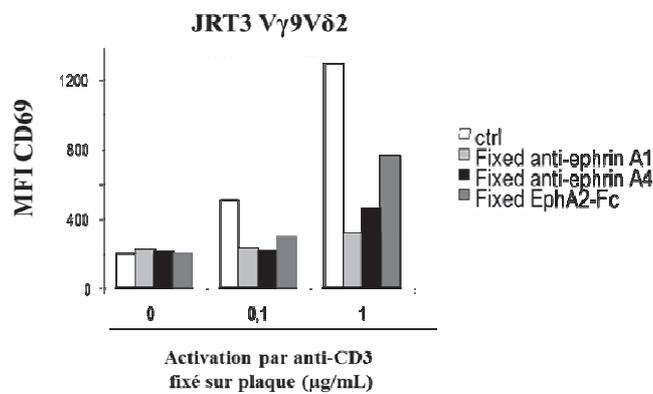
**A.**



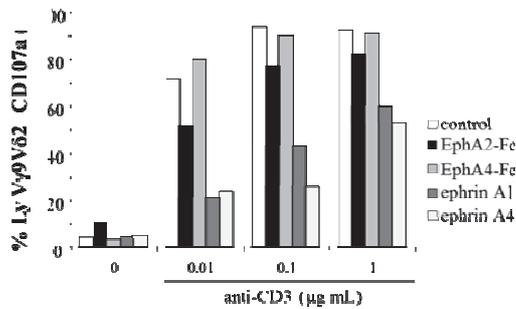
**B.**



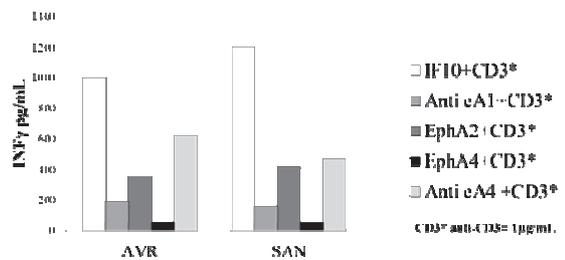
**C.**



**D.**



**E.**



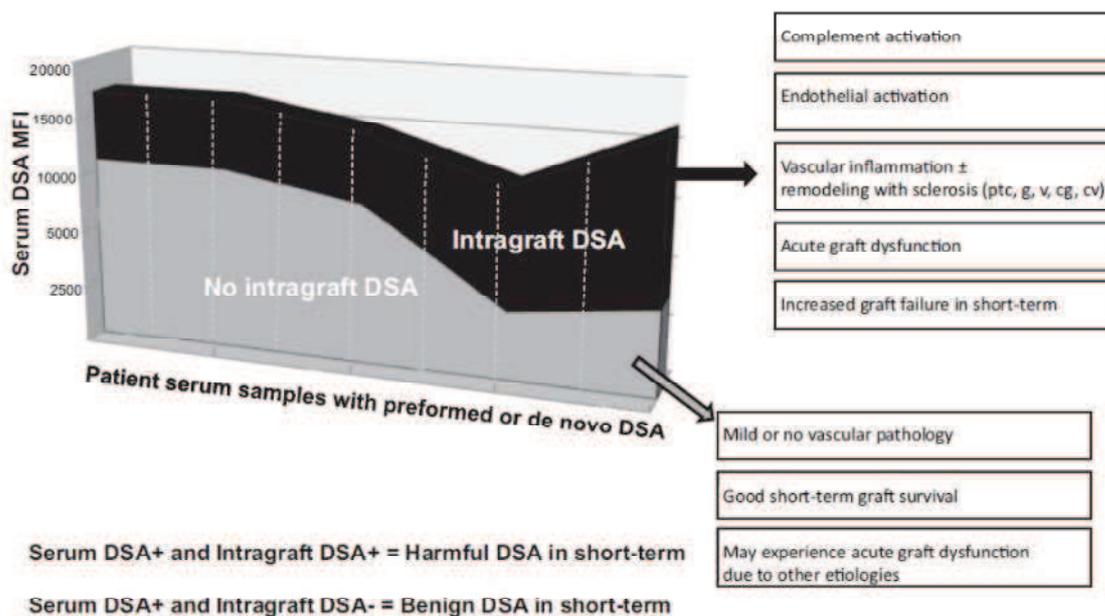
# V. CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

---

L'infection à CMV et l'existence d'anticorps dirigés contre le donneur sont deux facteurs majeurs de détérioration du greffon rénal.

A travers le questionnement sur les mécanismes physiopathologiques mis en jeu pour ces deux types d'agressions, nous avons d'abord identifié deux nouvelles pistes pour interpréter les données histologiques rendues en pratique clinique :

- l'artériosclérose telle qu'elle est appréhendée par la classification de Banff dans la notation du score d'épaississement fibreux de l'intima (cv) pourrait être une des signatures histologiques sur l'allogreffe rénal, d'une infection à CMV antérieure à la biopsie, au même titre de ce qui a pu être rapporté sur la coronaropathie d'allogreffe en transplantation cardiaque. Etant donné l'impact pronostique tant sur la survie du greffon que sur le risque cardiovasculaire du patient transplanté, la mise en évidence de ce lien ouvre des perspectives sur la possibilité d'un marqueur histologique des effets indirects du CMV. Sa confirmation pourrait aussi permettre de vérifier si cette lésion est réversible après traitement antiviral ; ce qui permettrait d'élargir l'arsenal thérapeutique de la prise en charge du vieillissement accéléré du greffon rénal. A contrario, aucun lien entre rejet ou fibrose interstitielle et atrophie tubulaire n'a pu être retrouvé dans notre étude. Il est possible que l'application d'immunomarquages visant à caractériser une transition épithélio-mésenchymateuse TEM (perte de l'expression d'E-cadhérine, acquisition de l'expression de vimentine, translocation de beta-caténine (1)) pourrait permettre de confirmer ce lien entre CMV et TEM mis en évidence in vitro (2) et dégager une histoire naturelle de l'infection à CMV du tissu rénal conduisant à la perte du greffon (3) (4). En outre, il est intéressant de souligner que CMV et DSA semblent diriger ce même type de lésions chroniques d'artériosclérose (5).
- La mise en évidence de DSA dirigés contre les molécules HLA du donneur, dans l'éluat des biopsies rénales, en utilisant les techniques à haute résolution basée sur l'identification en single antigen (SAFB), pourrait représenter un nouvel outil. Il est susceptible d'enrichir la caractérisation du phénotype de rejet à médiation humorale, en apportant la preuve immunopathologique d'un processus allogénique en cours in situ. Il répond en tout cas à une difficulté quotidienne dans la prise en charge des malades immunisés contre le donneur dont les études de cohortes ont montré que près de 2/3 garderont une fonction rénale normale, a fortiori si les niveaux de DSA sont faibles. Etant donné la faible performance diagnostique à l'échelon individuelle de la mise en évidence d'un DSA dans la circulation sur la capacité à prédire la perte du greffon, Banu Sis a proposé l'intégration de cet outil de détection intragreffon des DSA en SAFB dans l'analyse des données disponibles selon le schéma ci-dessous. En outre, il est intéressant de mentionner que l'hypothèse initiale de greffon comme piège à DSA n'est pas vérifiée dans cette étude. Toutefois, malgré cet apparent manque de sensibilité, et si chaque gDSA était toujours associé à au moins un sDSA, la spécificité HLA reconnue par le gDSA était différente de celle du sDSA dans 2 cas sur 15 (13%) ; ce qui là encore ouvre des perspectives de distinction des DSA réellement pathogènes.



**Hiérarchisation du risque en fonction de l'existence d'un DSA dans le greffon, d'après Sis, Am J Transplant 2013.**

L'analyse de la réponse allogénique humorale est un champ de recherche actif de la discipline. De nombreuses questions sont encore ouvertes sur le maniement optimal des outils à disposition et leur translation en pratique. Nous avons proposé leur utilisation dans l'éluat des greffons pathologiques biopsiés sur indication. Il pourra être intéressant de les rechercher sur des biopsies protocolaires afin de valider leur intérêt et leur association avec les lésions de la microcirculation de façon prospective. On pourra aussi les rechercher dans d'autres organes transplantés (Appel offre Agence de la Biomédecine, Jean-Luc Taupin).

L'interprétation des données semi-quantitatives, fournies par l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de fixation du sérum sur les billes de single antigène, est aussi un axe de travail de l'équipe. A ce jour, les tests de SAFB ne sont validés que pour leur composante qualitative par les autorités institutionnelles (FDA (6)). Il a été rapporté certaines limites du test qui faussent les MFI (7), comme l'effet prozone (8) ou la dénaturation des molécules HLA sur les billes (Visentin et al, Transplantation, soumis). Pourtant, nous disposons d'un supplément d'information qui a vraisemblablement un sens biologique et clinique (9), sous réserve de définir ces conditions d'application. A cet effet, nous avons développé un système d'évaluation des MFI sur leur capacité à prédire les résultats de crossmatches (XM) positifs en cytométrie en flux (FCXM) ou en microlymphocytotoxicité (LCT) dans un système limité à la classe I : 603 crossmatches réalisés à partir de 137 sera de patients immunisés anti HLA sur les cellules T de 90 ganglions de donneurs décédés. Ce système nous a permis de fonder nos conditions d'analyse du SAFB : il faut mieux faire la somme des MFI des différents DSA, doubler la MFI pour les spécificités HLA homozygotes et compter les MFI des DSA anti HLA-Cw. Les performances des MFI de SAFB-DSA préformés sont insuffisantes pour ne pas réaliser de crossmatches prospectifs (AUC MFI à 0.78 et 0.80 pour prédire un FCXM (MCS>45) et en LCT (score >1) positifs, respectivement). Globalement 1 test sur 4 est mal classé mais l'intégration des MFI permet de stratifier le risque immunologique avant la réalisation du XM, comme cela a pu être proposé par d'autres équipes (10). Deux seuils « locaux » (sans crossvalidation permettant l'extrapolation) ont ainsi pu être dégagés : un seuil de  $\Sigma$  MFI-DSA > 3000 est associé avec un FCXM+, avec un bon

niveau de sensibilité (79%) et de valeur prédictive positive (85%). Un seuil de  $\Sigma$  MFI-DSA > 8000 est associé avec un LCT+, avec une bonne valeur prédictive négative (94%), suggérant qu'il ne faut pas convoquer ces patients immunisés pour la réalisation d'un XM prospectif avec de tels niveaux de MFI (Bachelet, ESOT 2013).

Nous avons également repris les greffes réalisées avec des DSA anti HLA-Cw et HLA-DP afin de confirmer leur pathogénicité et la nécessité de leur intégration dans les systèmes d'allocation des greffes ((11) et Bachelet, ESOT 2013) et confirmé l'absence d'efficacité d'un traitement ciblant la réponse B (immunoglobulines polyvalentes par voie intraveineuse et rituximab) à un stade avancé de rejet chronique à médiation humorale (Bachelet, ESOT 2013).

Dans cette volonté de mieux définir les termes d'une immunisation pathogène dirigée contre le donneur, nous avons identifié un nouvel acteur qui fait le lien entre DSA et CMV : le lymphocyte T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup>. Il s'inscrit dans la composante effectrice cellulaire des lésions médiées par les DSA, par un mécanisme de cytotoxicité dépendant de l'anticorps (ADCC). Là encore, nous apportons des éléments de réflexion à la communauté de transplantation à un moment où l'implication du complément à la phase effectrice de la réponse humorale est de nouveau débattu (i) discutée avec la reconnaissance de rejets à médiation humorale négatifs pour le C4d mais avec d'authentiques lésions inflammatoires de la microcirculation (capillarite et glomérulite) (12) (ii) renforcée par les dernières données sur le rôle pathogène des DSA-C1q, capables d'activer la voie classique du complément (13). Pourtant, l'enrichissement en transcrits associés à la production d'INF- $\gamma$  et associés aux cellules NK au niveau des biopsies de rejets à médiation humorale, ainsi que l'importance du fragment Fc des DSA également suggéré par le travail de Loupy et al suggère que d'autres mécanismes indépendants du complément pouvaient être à l'oeuvre au niveau du greffon : l'hypothèse la plus vraisemblable est l'implication d'un acteur cellulaire capable à la fois de s'activer par l'engagement du DSA sur un récepteur au fragment Fc des immunoglobulines (type Fc $\gamma$ RIIIA-CD16, récepteur activateur du fragment constant Fc des immunoglobulines IgG, dont l'engagement conduit à la dégranulation de molécules cytotoxiques et à la lyse de la cellule sur laquelle est fixé l'anticorps) et de produire de l'INF- $\gamma$ .

Si les cellules NK présentent ces caractéristiques (14), nous montrons que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  induits par le CMV sont aussi un excellent candidat pour réaliser cet ADCC allogénique. Nous avons apporté plusieurs types d'arguments qui vont dans ce sens : a) des arguments in vivo basés sur une analyse en cytométrie en flux de cellules mononuclées issues de sang de patients transplantés, confirmant l'expansion des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> de phénotype effecteur mémoires à différenciation terminale (TEMRA) avec de hautes capacités cytotoxiques (expression intracytoplasmique de perforine-granzyme) qui expriment également du CD16 dans des proportions similaires aux cellules NK chez les patients CMV+ ; b) des arguments ex vivo basés sur l'analyse en immunofluorescence de biopsies présentant des lésions de rejet, qui retrouve électivement les lymphocytes T  $\gamma\delta$  au niveau des lésions inflammatoires de la microcirculation des rejets aigus à médiation humorale ; c) des arguments in vitro basés sur la mise en évidence de l'implication des lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans un modèle d'ADCC allogénique et d) des arguments fonctionnels basés sur une analyse de cohortes de patients transplantés rénaux, retrouvant une corrélation entre un niveau faible de fonction rénale et un taux élevé de lymphocytes T  $\gamma\delta$ , ce uniquement chez les patients ayant développé un CMV et présentant des DSA.

Ces données confèrent aux lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> induits par le CMV chez les patients transplantés rénaux, une nouvelle fonction allogénique indépendante de leur TCR, qui vient se rajouter à leurs propriétés anti-virales et anti-tumorales, déjà rapportées par l'équipe. Par ce travail, nous venons compléter la caractérisation de cette cellule atypique et originale, qui associe des caractéristiques de l'immunité innée et adaptative. Les concepts récents (15) insistent sur la dimension « empathique » de cette cellule, d'un point de vue immunologique : elle est capable de détecter les signaux de stress (« sentir la souffrance ») directement au niveau des cellules d'interface que sont les cellules épithéliales voire endothéliales. A partir de l'interprétation de ce qu'elle a reconnu et sa confrontation au contexte, elle agit pour maintenir ou rétablir l'intégrité cellulaire et tissulaire. De là découlent sa distribution, son répertoire et sa fonction. Toutefois, cette dimension « de soin en réponse à la souffrance » qu'on peut prêter au sous type cellulaire, est conceptuellement mise à mal par l'ajout d'une altérité telle que peut le représenter le greffon. Longtemps, on a considéré que ces cellules  $\gamma\delta$  n'étaient pas allogéniques, c'est-à-dire qu'elles ne reconnaissent pas le greffon comme un stimulus allogénique. La question du rôle de ces cellules  $\gamma\delta$  au sein du greffon a deux réponses :

- maintien de l'intégrité tissulaire ; alors (i) les cellules  $\gamma\delta$  pourraient être impliquées dans la réponse aux lésions d'ischémie/reperfusion et dans la régulation des lésions faisant suite à la réponse allogénique; (ii) toutes les perspectives d'immunothérapie basée sur les lymphocytes T  $\gamma\delta$  aux propriétés anti-infectieuses et anti-tumorales sont possibles.
- participation à la réponse allogénique, soit (i) directement avec l'émergence de ligands activateurs de son TCR du fait du contexte de la transplantation propre à l'émergence locale de molécules de stress, soit (ii) indirectement par des mécanismes activateurs tels que l'engagement du CD16 qui déclenche le relargage des molécules cytotoxiques dont elles sont chargées.

L'élargissement à l'autre (autrui) de la capacité du soin des cellules  $\gamma\delta$  (une sorte de « care » tel que le définit Carol Gilligan) pourrait guider une incorporation du greffon dans un système régulé qui fonderait la tolérance opérationnelle. Ce qui a été suggéré par les premiers résultats présentés par l'équipe de Sanchez-Fueyo en greffe hépatique (16). Pourtant, l'hypothèse optimiste d'une « intuition bonne » pour cette cellule lourdement armée (du fait de son fort potentiel cytotoxique et de l'expression de nombreuses molécules de costimulation susceptible d'abaisser son seuil d'activation) ne tient pas. Dans la sous population de lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> qui nous intéresse, le CMV joue un rôle essentiel puisqu'on pense aujourd'hui qu'il dirige l'expansion de ces cellules depuis les épithéliales/endothéliales par lesquels il pénètre ou dans lesquels il se maintient en phase de latence, entrecoupée de phases de réplication. La réponse aux situations de danger guide la réactivité croisée de ces cellules initialement générées pour leur activité anti-virale anti CMV mais aussi capables d'activité anti-tumorale. Le CMV possède en plus ce potentiel d'amplifier la réponse allogénique (i) à la fois cellulaire, via notamment l'activation endothéliale (17) et (ii) humorale en induisant des anticorps dirigés contre le donneur via la génération d'une immunité hétérologue polymorphe (alloanticorps anti HLA directement (18) ou comme événement proinflammatoire (19), anticorps anti cellules endothéliales (20) (21) voire d'authentiques autoanticorps (22)). De façon intéressante, notre groupe travaille également sur un clone T  $\gamma\delta$  double réactif capable de reconnaître des molécules HLA dépourvues de  $\beta$ 2-microglobuline (Free Heavy Chain), qui serait induites par le CMV. En outre, les tests en phase solide de caractérisation des alloanticorps ont permis de mettre en évidence l'existence d'anticorps circulant dans le sérum de patients immunisés anti-HLA, dirigés contre des molécules HLA dénaturées, *id est* qui ne sont plus liées à la  $\beta$ 2-microglobuline (7) (23). Jusqu'à présent, ces anticorps qui ne positivent pas systématiquement le crossmatch étaient considérés comme non pathogènes. On peut toutefois tout à fait postuler que c'est justement ce type de stimuli qui peut

favoriser la réponse T  $\gamma\delta$ . En somme, ces cellules T  $\gamma\delta$  possèdent un « arsenal » cytotoxique en rapport avec une différenciation terminale de cellules effecteurs mémoire de type TEMRA et ont la capacité de s'activer par des voies alternatives à celle de la réponse allogénique classique (CD16, reconnaissance de molécules dénaturées et autres signatures de stress) ; de telle sorte que malgré leur non implication dans les schémas classiques de la réponse allogénique, on peut imaginer qu'elles peuvent participer à la réponse allogénique de façon indirecte.

Pourtant, ces deux types de réponses au sein du greffon (maintien de l'intégrité tissulaire *versus* participation à la réponse allogénique) ne sont pas mutuellement exclusives. Finalement, ce qui va les guider, c'est ce que va reconnaître la cellule T  $\gamma\delta$ . L'immunologie réécrit cette histoire de la reconnaissance du visage de l'autre chère à Emmanuel Lévinas à l'échelon cellulaire. Dans le cadre de l'immunité adaptative, du fait des diversités combinatoires et jonctionnelles, le potentiel de reconnaissance est infini. Comme on l'a vu, les cellules T  $\gamma\delta$  possèdent un TCR donc cette potentialité. La compréhension de la bioréactivité de ces cellules passe nécessairement par l'identification de leurs antigènes ligands activateurs. C'est ce qui a été entrepris par l'équipe de Julie Déchanet-Merville depuis près de 10 ans. La stratégie adoptée associe (i) le transfert de TCR  $\gamma\delta$  issus de clones générés à partir de PBMC d'individus infectés par le CMV et présentant une double réactivité anti-virale et anti-tumorale dans des lignées « reporter » JRT3, (ii) l'élaboration d'un panel de cellules cibles induisant la réactivité spécifique du TCR de cette lignée reporter, (iii) une immunisation de souris par une de ces lignées cellulaires cibles, (iv) la génération d'hybridomes et le screening des anticorps monoclonaux bloquant spécifiquement la réactivité dépendante du TCR de la JRT3 (v) et enfin l'identification de l'antigène cible par spectrométrie de masse.

Elle a permis d'identifier trois ligands : EPCR (24), une molécule HLA sans  $\beta$ 2-microglobuline de type FHC (Free-Heavy-Chain) (25) et EphA2. Ces trois ligands reconnus par trois TCR  $\gamma\delta$  différents n'expliquent pas eux seuls toute la diversité des spécificités antigéniques des lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup> répondant au CMV. Beaucoup de ligands pourraient probablement encore être identifiés : nous pensons maintenant que cette réponse T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2<sup>neg</sup>, même si elle est dirigée par des antigènes non polymorphiques, pourrait malgré tout être extrêmement diversifiée. Cette diversité des antigènes reconnus pourrait être aussi large que celle enregistrée pour la réponse T  $\alpha\beta$  capable de reconnaître de nombreux peptides viraux différents présentés par différentes molécules HLA (26). On peut faire l'hypothèse d'un type d'immunité originale médiée par des récepteurs diversifiés générés par réarrangement génique (TCR  $\gamma\delta$ ) mais reconnaissant des ligands qui seraient à la fois divers mais non polymorphes. Cette immunité se distinguerait de celle médiée par les cellules NK activées par des récepteurs non polymorphes reconnaissant des ligands à la diversité restreinte, et de celle des lymphocytes T  $\alpha\beta$  médiée par des TCR très diversifiés et très spécifiques de variations infinies de peptides/lipides antigéniques présentés par des molécules polymorphes (HLA). Dans le cas du CMV et des processus de tumorigénèse qui inhibent l'expression des molécules HLA et également celle des ligands des cellules NK, la réponse  $\gamma\delta$  prendrait alors tout son sens.

Malgré leurs différences, les trois ligands identifiés jusqu'à présent ont les caractéristiques d'auto-antigènes de stress. Si EphA2 n'est pas une molécule présentatrice d'antigène contrairement aux deux autres, elle est fortement impliquée dans le maintien de l'intégrité des epithelia et elle est dérégulée dans la tumorigénèse et contribue au potentiel invasif des tumeurs. De la même façon, EPCR n'est pas reconnue en tant que molécule présentatrice mais sa topologie membranaire et son association avec d'autres ligands activateurs semble être essentielles pour sa reconnaissance. Une des questions à laquelle il est difficile de répondre est le mécanisme au cours de l'infection à CMV, qui rend EphA2

actif pour les lymphocytes T  $\gamma\delta$ . Nous n'avons enregistré aucune surexpression en cytométrie en flux ni en immunofluorescence. Il serait intéressant de développer les outils permettant de vérifier l'hypothèse d'une modification de la circulation membranaire d'EphA2 et de ses capacités d'agrégation en réponse à l'infection à CMV, comme cela a pu être montrée pour les tumeurs (27). Au-delà, une interaction monomérique entre le TCR MAU et EphA2 n'induit qu'un signal très faible, suggérant qu'il faut plusieurs molécules EphA2, donc potentiellement un cluster pour interagir de façon efficace avec le TCR MAU. Nos données suggèrent en outre que la cellule T MAU détourne les interactions naturelles d'EphA2 avec les éphrines pour s'en faire une molécule de costimulation, via la création d'un complexe trimoléculaire. Comme avancé avec EPCR, EphA2 est nécessaire mais pas suffisant pour activer la cellule T MAU ; le contexte et la modulation des cosignaux activateurs est essentiel (24). L'absence du clone MAU ne permet pas de vérifier ces résultats. De façon plus générale on est gêné pour affirmer la pertinence physiologique de cette réactivité au-delà de la simple histoire d'un clone. Toute la démonstration est bâtie sur la réactivité d'un TCR. La question de la représentativité de ces TCR in vivo est cruciale. Nos tentatives de généralisation de cette réactivité ont pour l'instant échoué (culture en réaction lymphocytaire mixte avec lignées transduites avec EphA2, clonage de cellules faiblement réactives, génération de TCR chimériques, tests d'interaction en ALPHASCREEN avec d'autres molécules EphA). D'autres stratégies devraient pouvoir être développées au travers de plusieurs collaborations (sonde moléculaire permettant de dépister dans le sang les TCRs réactifs contre EphA2- Bonneville, NANTES, recherche d'une conservation des séquences de CDR3 V $\delta$  du TCR chez d'autres individus transplantés ou non –Vermijlen, GOSSÉLIES, ...).

Au cours d'un travail de master recherche (Relation Hôte Greffon 2011-2012, Anna Boueilh), EphA2 a été recherché sur des biopsies rénales pathologiques ou non en immunohistochimie. Comme attendu, son expression était essentiellement tubulaire. Pourtant, aucune corrélation n'a pu être faite entre ses variations d'expression et le résultat anapathologique des biopsies ni avec l'existence d'une infection à CMV antérieure à la biopsie. EphA2 ne semble pas être exprimé de façon spécifique au niveau de l'allogreffe. EphA2 ne semble pas être induit ni par le CMV ni par l'existence de DSA. Une surexpression transitoire d'EphA2 au cours de l'infection ne peut cependant être exclue. Sinon, on peut aussi postuler que l'activation des LT  $\gamma\delta$  par EphA2 lors de l'infection à CMV pourrait se dérouler dans un site anatomique différent du greffon rénal, qui n'est pas l'organe de prédilection pour la multiplication du virus (qui a lieu plus probablement dans le système digestif ou respiratoire).

En conclusion, nous avons présenté au cours de ce travail de nouveaux mécanismes physiopathologiques attachés à deux phénomènes de détérioration du greffon : le CMV et les DSA. Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont susceptibles de faire le lien entre CMV et DSA, à la phase effectrice cellulaire de la réponse allogénique humorale. Travailler sur la nature des antigènes de stress qui gouvernent l'amplification des lymphocytes T  $\gamma\delta$  en réponse au CMV a conduit à identifier un nouvel auto-antigène de stress EphA2. Mais la route est encore longue pour comprendre cette cellule complexe et la positionner au sein de la réponse immunologique sous pression immunosuppressive propre à la transplantation d'organe.

## REFERENCES

1. Hertig A, Verine J, Mougenot B, et al. Risk factors for early epithelial to mesenchymal transition in renal grafts. *Am J Transplant* 2006; 6 (12): 2937.
2. Shimamura M, Murphy-Ullrich JE, Britt WJ. Human cytomegalovirus induces TGF-beta1 activation in renal tubular epithelial cells after epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS Pathog* 2010; 6 (11): e1001170.
3. Helanterä I, Koskinen P, Finne P, et al. Persistent cytomegalovirus infection in kidney allografts is associated with inferior graft function and survival. *Transpl Int* 2006; 19 (11): 893.
4. Dzabic M, Rahbar A, Yaiw KC, et al. Intra-graft cytomegalovirus protein expression is associated with reduced renal allograft survival. *Clin Infect Dis* 2011; 53 (10): 969.
5. Hill GS, Nochy D, Bruneval P, et al. Donor-specific antibodies accelerate arteriosclerosis after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22 (5): 975.
6. Archdeacon P, Chan M, Neuland C, et al. Summary of FDA antibody-mediated rejection workshop. *Am J Transplant* 2011; 11 (5): 896.
7. Tait BD, Susal C, Gebel HM, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and Non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 2013; 95 (1): 19.
8. Guidicelli G, Anies G, Bachelet T, et al. The complement interference phenomenon as a cause for sharp fluctuations of serum anti-HLA antibody strength in kidney transplant patients. *Transpl Immunol* 2013.
9. Mizutani K, Terasaki P, Hamdani E, et al. The importance of anti-HLA-specific antibody strength in monitoring kidney transplant patients. *Am J Transplant* 2007; 7 (4): 1027.
10. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21 (8): 1398.
11. Bachelet T, Couzi L, Guidicelli G, et al. Anti-Cw donor-specific alloantibodies can lead to positive flow cytometry crossmatch and irreversible acute antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2011; 11 (7): 1543.
12. Cohen D, Colvin RB, Daha MR, et al. Pros and cons for C4d as a biomarker. *Kidney Int* 2012; 81 (7): 628.
13. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med* 2013; 369 (13): 1215.
14. Hidalgo LG, Sis B, Sellares J, et al. NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2010; 10 (8): 1812.
15. Kalyan S, Kabelitz D. Defining the nature of human gammadelta T cells: a biographical sketch of the highly empathetic. *Cell Mol Immunol* 2013; 10 (1): 21.
16. Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, et al. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest* 2008; 118 (8): 2845.
17. Waldman WJ, Knight DA, Adams PW, Orosz CG, Sedmak DD. In vitro induction of endothelial HLA class II antigen expression by cytomegalovirus-activated CD4+ T cells. *Transplantation* 1993; 56 (6): 1504.
18. Haynes LD, Waldman WJ, Bushkin Y, Love RB, Burlingham WJ. CMV-infected allogeneic endothelial cells initiate responder and bystander donor HLA class I release via the metalloproteinase cleavage pathway. *Hum Immunol* 2005; 66 (3): 211.
19. Locke JE, Zachary AA, Warren DS, et al. Proinflammatory events are associated with significant increases in breadth and strength of HLA-specific antibody. *Am J Transplant* 2009; 9 (9): 2136.
20. Toyoda M, Petrosian A, Jordan SC. Immunological characterization of anti-endothelial cell antibodies induced by cytomegalovirus infection. *Transplantation* 1999; 68 (9): 1311.
21. Costa C, Touscoz GA, Bergallo M, et al. Non-organ-specific and anti-endothelial antibodies in relation to CMV infection and acute rejection in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2010; 24 (4): 488.
22. Varani S, Muratori L, De Ruvo N, et al. Autoantibody appearance in cytomegalovirus-infected liver transplant recipients: correlation with antigenemia. *J Med Virol* 2002; 66 (1): 56.
23. Cai J, Terasaki PI, Anderson N, Lachmann N, Schonemann C. Intact HLA not beta2m-free heavy chain-specific HLA class I antibodies are predictive of graft failure. *Transplantation* 2009; 88 (2): 226.
24. Willcox CR, Pitard V, Netzer S, et al. Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat Immunol* 2012; 13 (9): 872.
25. Marlin R, Netzer S, Pitard V, et al. HLA class I molecules in tumor B cells: stress antigens for Vdelta3 gamma-delta TCR? *Immunology* 2012; 137: 399.
26. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 2005; 202 (5): 673.
27. Salaita K, Nair PM, Petit RS, et al. Restriction of receptor movement alters cellular response: physical force sensing by EphA2. *Science* 2010; 327 (5971): 1380.

# VI. CURRICULUM VITAE et TITRES ET TRAVAUX

**Thomas BACHELET**

N° d'inscription à l'ordre 33/13955

N° RPPS 10100073146

Thomas BACHELET  
Téléphone : 06 70 57 83 43  
Mail : [thomas.bachelet@gmail.com](mailto:thomas.bachelet@gmail.com)

*Né le 01/07/1980 à Alfortville (94)  
Nationalité Française.  
Marié, 2 enfants.*

#### **MEMBRES**

- Membre de la Société de Néphrologie depuis 2010.
- Membre de la Société Francophone de Transplantation depuis 2009.

#### **EDUCATION**

- Baccalauréat Scientifique (1998) : Mention Très bien.
- 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> cycle d'études de médecine (1998-2004) : Université Paris XII. CHU H. Mondor.
- Internat DES Néphrologie (2004-2008) : Bordeaux-Océan Indien.

#### **TITRES UNIVERSITAIRES**

- Maitrise de Science Biologiques et Médicales (2004) : Université Paris XII Créteil.
- Certificat de génétique humaine et comparée. Paris XII (2001).
- Certificat de physiopathologie des maladies transmissibles Paris VII (2001).
- Certificat d'immunologie et mécanismes physiopathologiques Paris XII (2000).
- Master 2 Relation Hôte Greffon (2009): Université Besançon-Université Franche Comté.
- Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine (2009) : Université Bordeaux II Victor Segalen.
- Diplôme d'Etudes Spécialisées en Néphrologie (2009) : Université Bordeaux II Victor Segalen.
- Chef de Clinique des Universités (2009) : Université Bordeaux II Victor Segalen.
- Diplômes universitaires :
- DIU Infections et Transplantation (2012) : Université Paris V.
- DIU Thérapeutiques Extrarénales (2008) : Université Strasbourg.
- DIU HTA et maladies rénales (2007) : Université Strasbourg.
- DU Médecine Tropicale (2006) : Université Bordeaux II Victor Segalen.

#### **TITRES HOSPITALIERS**

- Externe des Hôpitaux de Paris (2001).
- Interne Bordeaux-Océan Indien (2004).
- Assistant des Hôpitaux de Bordeaux (2009).
- Assistant Hospitalier de Recherche (2012).

#### **STAGES DE RECHERCHE**

- Stage Mémoire DES néphrologie (2007) : Groupe de recherche des maladies infectieuses et inflammatoires de l'Océan Indien. Université de La Réunion.
- Stage de Master 2 Recherche (2008-2009) : Laboratoire UMR CNRS 5164- CIRID. Université Bordeaux 2 Victor Segalen.
- Stage de Doctorant (2011-2013) : Laboratoire UMR CNRS 5164- CIRID. Université Bordeaux 2 Victor Segalen.

#### **MEDECIN COINVESTIGATEUR**

- Dans le cadre d'essais cliniques multicentriques (PHRC ou partenariat industrie) : Everold (CHU de Brest), CERTITEM (Novartis), ADVANCE (Astellas), OSAKA (Astellas), OSIRIS (Astellas), BENEFIT et BENEFIT -EXT (BMS), Rein Marginal (Roche) et PIRAT (CHU de St-Etienne), WIN-Lupus (Chu de Marseille), C10-002 (Alexion).
- Dans le cadre du protocole EVERCMV (essai phase IV, prospectif multicentrique piloté par Bordeaux) : début des inclusions début 2014.

## COMMUNICATIONS ORALES (\*1<sup>er</sup> auteur, ° dernier auteur)

### ◆ Congrès européen de Transplantation ESOT :

- Vienne 2013\* : Virtual crossmatch : looking for the MFI threshold.
- Vienne 2013\* : Kidney intragraft donor specific antibodies as determinant of antibody-mediated lesions and poor graft outcome.
- Vienne 2013° : Can cytomegalovirus induce transplant vascular sclerosis in renal allograft ?
- Vienne 2013\* : Treating transplant glomerulopathy: too late to succeed ?
- Vienne 2013\* : Critical reappraisal of Banff's classification in a clinical perspective.
- Vienne 2013\* : Pleading for integrating HLA-Cw antigens as unacceptable.
- Glasgow 2011\* : A novel cell effector in the antibody mediated lesion of the microcirculation.

### ◆ Congrès européen d'immunologie ECI :

- Glasgow 2012\* : CMV and tumor stress surveillance by human V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  TCR binding to Ephrin Receptor A2 (EphA2).
- Glasgow 2012\* :  $\gamma\delta$  T cells as a novel cell effector in the antibody mediated kidney allograft rejection.

### ◆ Congrès américain de transplantation ATC :

- Philadelphie 2011\* (+ ESOT 2011\* Glasgow) : A novel cell effector in the antibody mediated lesion of the microcirculation.

### ◆ Société Francophone de Transplantation :

- Nantes 2012\* : La mise en évidence de DSA dans le greffon. Un nouveau biomarqueur des lésions à médiation humorale.
- Nantes 2012\* : Quel intérêt pour l'analyse en clusters fonctionnels des items de la classification Banff dans l'interprétation histologique des biopsies rénales ?
- Nantes 2012° : Sclérose vasculaire du transplant CMV-induite en transplantation rénale : arguments histologiques.
- Montpellier 2011° : Importance pronostique des facteurs de progression néphrologiques sur le cours évolutif des rejets chroniques à médiation humorale et inefficacité d'une stratégie d'intervention immunologique par rituximab et immunoglobulines polyvalentes.
- Montpellier 2011\* : Corrélation entre DSA caractérisés en identification Single Antigen Beads LUMINEX® et résultats de crossmatch.
- Montpellier 2011\* : Facteurs de risque et impact pronostique des pyélonéphrites aiguës du greffon et des pneumopathies posttransplantation.
- Montpellier 2011\* (+ Société Néphrologie-SN§ Bordeaux 2011\*) : Caractérisation, incidence et impact des anticorps dirigés contre le donneur présents dans les éluats de biopsies de greffons par une technique d'identification en Single Antigen Beads LUMINEX.
- Genève 2010\* (+ SN§ Bordeaux 2011\*) : Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  V $\delta$ 2 (-) pourraient faire le lien entre infection à CMV et dysfonction du greffon chez les patients immunisés avec DSA.
- Genève 2010\* (+ SN§ Bordeaux 2011\*) : Une infection à CMV dans la 1<sup>ère</sup> année post greffe est associée à une moins bonne fonction du greffon à 1 an, 3 ans et 5 ans.
- Nice 2009\* : Hauts niveaux d'expression du CD16 par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  induits par le cytomegalovirus chez les patients transplantés rénaux : Implication du CD16 dans la réponse allogénique.

### ◆ Société Néphrologie et Dialyse :

- Lyon. 2007\* : Insuffisance rénale aiguë et Chikungunya virus. Société de Néphrologie.
- Lyon 2007\* : Epidémie à Chikungunya : étude descriptive chez 81 patients hémodialysés.

### ◆ Symposium Braun (Bordeaux 2012) : Particularités immunologiques du sujet âgé.

### ◆ Réunion des Coordinations Hospitalières (La Réunion. 2007) : Les patients greffés et le Chikungunya.

### ◆ Société Française de Pathologie Tropicale (La Réunion. 2006) : Rein et Chikungunya.

### ◆ Symposium Gambro « REIN et VIRUS » (Tours 2006)\* : Le néphrologue et le Chikungunya.

## PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

1. Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. Couzi L, Araujo C, Guidicelli G, **Bachelet T**, Moreau K, Morel D, Robert G, Wallerand H, Moreau JF, Taupin JL, Merville P. *Transplantation*. 2011 Mar 15;91(5):527-35.
2. Anti-Cw donor-specific alloantibodies can lead to positive flow cytometry crossmatch and irreversible acute antibody-mediated rejection. **Bachelet T**, Couzi L, Guidicelli G, Moreau K, Morel D, Merville P, Taupin JL. *Am J Transplant*. 2011 Jul;11(7):1543-4.
3. High incidence of Anti-CMV Drug Resistance among D+R- Kidney Transplant Recipients receiving Preemptive Therapy. Couzi L, Helou S, Garrigue I, **Bachelet T**, Moreau K, Martin S, Morel D, Alain S, Lafon ME, Merville P. *Am J Transplant*. 2012 Jan;12(1):202-9.
4. Transplantation with pathologic kidneys to improve the pool of donors: an example of shunt nephritis. Guerville F, Lepreux S, Morel D, **Bachelet T**, Moreau K, Merville P, Couzi L. *Transplantation*. 2012 Apr 27;93(8).
5. Quantitative Elastography of Renal Transplants Using Supersonic Shear Imaging: A Pilot Study. Grenier N, Poulain S, Hubrecht R, Lepreux S, Gennisson JL, Dallaudiere B, Lebras Y, Bavu E, Servais A, Meas-Yedid V, Piccoli M, **Bachelet T**, Tanter M, Merville P, Couzi L. *Eur Radiol*. 2012 Oct;22(10):2138-46.
6. Preemptive therapy versus valgancyclovir prophylaxis in cytomegalovirus-positive kidney transplant recipients receiving antithymocyte globulin induction. Couzi L, Helou S, **Bachelet T**, Martin S, Moreau K, Morel D, Lafon ME, Garrigue I, Merville P. *Transplant Proc*. 2012 Nov;44(9):2809-13.
7. The complement interference phenomenon as a cause for sharp fluctuations of serum anti-HLA antibody strength in kidney transplant patients. Guidicelli G, Anies G, **Bachelet T**, Dubois V, Moreau JF, Merville P, Couzi L, Taupin JL. *Transpl Immunol*. 2013 Sep 20.
8. Hepatitis E virus infection as a new probable cause of de novo membranous nephropathy after kidney transplantation. Taton B, Moreau K, Lepreux S, **Bachelet T**, Trimoulet P, De Ledinghen V, Pommereau A, Ronco P, Kamar N, Merville P, Couzi L. *Transpl Infect Dis*. 2013 Sep 18.
9. Kidney intragraft DSA detection implements the definition of antibody-mediated lesions and is associated with a poor prognosis of the graft. **Bachelet T**, Couzi L, Lepreux S, Legeret M, Pariscoat G, Guidicelli G, Anies G, Merville P, Taupin JL. *Am J Transplant*. 2013 Sep 18.
10. Cytomegalovirus-induced  $\gamma\delta$  T cell: A novel cell effector in the antibody-mediated microcirculation lesions. **Bachelet T**, Couzi L, Pitard V, Sicard X, Rigotherier C, Lepreux S, Moreau JF, Taupin JL, Merville P, Déchanet-Merville J. *JASN*. Submitted.
11. Effect of a CMV infection on the subsequent Banff phenotype. Highlighting the CMV-induced transplant vascular sclerosis in kidney allograft. Bouielh A, Lepreux S, Marlin R, Couzi L, Déchanet-Merville J, Merville P, **Bachelet T**. *Clin Transplant*. In preparation.
12. Treatment of Transplant Glomerulopathy during Chronic Antibody-Mediated Rejection with Intravenous Immunoglobulins and Rituxumab. **Bachelet T**, Nodimar C, Taupin JL, Lepreux S, Moreau K, Morel D, Guidicelli G, Couzi L, Merville P. *Clin Transplant*. In preparation.
13. Chapitre CMV. *Textbook Transplantation Rénale 2010*. Coordination Christophe Legendre.

# VII. SERVICES RENDUS

**Thomas BACHELET**

N° d'inscription à l'ordre 33/13955

N° RPPS 10100073146

## **FONCTIONS HOSPITALIERES**

Chef de Clinique Assistant des Hôpitaux (2009-2011) :

Département Néphrologie. Transplantation rénale. CHU Bordeaux.

Internat DES Néphrologie (2004-2008) :

- mai 2008 à octobre 2008 : Immunologie biologique (Pr MOREAU CHU Bordeaux).
- novembre 2007 à mai 2008 : Néphrologie-Dialyse (Pr COMBE CHU Bordeaux).
- novembre 2006 à octobre 2007 : Néphrologie -Dialyse (Dr Guiserix. GHSR St Pierre).
- mai 2006 à octobre 2006 : Réanimation Médicale (Dr Campinos. GHSR St Pierre).
- novembre à mai 2006 : Néphrologie- Hémodialyse- Transplantation (Dr Bourgeon. CHD St Denis).
- mai à octobre 2005 : Néphrologie-Transplantation (Pr Merville.CHU Bordeaux).
- novembre à mai 2005: Médecine Interne- Maladies infectieuses (Pr Beylot.CHU Bordeaux).
- été 2004 : Faisant Fonction Interne en Pneumologie-Transplantation (Pr PISON. CHU Grenoble).

Externat (2001-2004) :

- Stages de médecine : neuro-radiologie, médecine interne, pédiatrie, cardiologie, néphrologie.
- Stages de chirurgie : infantile, orthopédique, viscérale, gynéco-obstétrique.
- Missions d'information et de prévention sur le SIDA et les MST (conseil général des Hauts de Seine).

## **FONCTIONS D'ENSEIGNEMENT**

- Participation à l'enseignement de la néphrologie aux élèves de l'institut de formation en soins infirmiers de Saint-Denis (2006)
- Participation au programme de préparation de l'université Bordeaux II à l'Examen National Classant : « Dernier tour » Néphrologie (2010).
- Participation à l'enseignement de sémiologie (Pr Quinton) :
  - Rédaction de la partie néphrologie du polycopié de sémiologie de 2010.
  - Rédaction vignettes cas cliniques néphrologie pour ED-SEMIO Jeux de Rôle.
  - Animation groupes ED sémiologie : URO-GYNECO 2010, Jeux de rôle 2011.
  - Encadrement de 6 groupes de sémiologie de 5 étudiants stage hospitalier.
- Participation à l'enseignement universitaire de néphrologie :
  - Cours néphrologie DCEM3.
  - Lecture Critique d'Articles.
  - Encadrement d'externes.

## **ENCADREMENT DE TRAVAUX**

- Mémoire de DES Charlie Martinez septembre 2013 : Etude rétrospective concernant le rôle pathogène des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur de type anti-Cw et anti-DP en transplantation rénale.
- Thèse de médecine Hiba Bachir avril 2013 : Impact du parcours migratoire sur l'accès et les résultats de la transplantation rénale.
- Mémoire de DES Céline Nodimar novembre 2011: Etude rétrospective sur l'efficacité du traitement du rejet humoral chronique.
- Mémoire de DES Maud Legeret avril 2011: Incidence des DSA dans les biopsies et le serum de patients ayant présenté un rejet stade II, IV ou V de la classification de Banff. Etude de la survie du greffon a 30 mois chez ces patients.
- Poster Charlie Martinez Société Néphrologie Bruxelles 2010: Méningoencéphalite à EBV chez une patiente transplantée rénale.

## **VIII. ANNEXE**

# Kidney Intragraft Donor-Specific Antibodies as Determinant of Antibody-Mediated Lesions and Poor Graft Outcome

T. Bachelet<sup>1,2,3</sup>, L. Couzi<sup>1,3</sup>, S. Lepreux<sup>4</sup>,  
M. Legeret<sup>1</sup>, G. Pariscoat<sup>2</sup>, G. Guidicelli<sup>2</sup>,  
P. Merville<sup>1,3</sup> and J.-L. Taupin<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology, Dialysis and Transplantation, CHU Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>2</sup>Laboratory of Immunology and Immunogenetics, CHU Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>3</sup>UMR 5164, CNRS and University Bordeaux Segalen, Bordeaux, France

<sup>4</sup>Laboratory of Pathology, CHU Bordeaux, Bordeaux, France

\*Corresponding author: Jean-Luc Taupin,  
jean-luc.taupin@chu-bordeaux.fr

Allograft pathology, antibody–tissue interaction as demonstrated by C4d deposition and serological evidence of donor-specific antibodies (DSA) are the cardinal diagnostic features of antibody-mediated lesions (AML) in kidney transplantation. However, discrepancy between histological and serological findings is common, and more reliable diagnostic tools are called for. Here, we asked whether the *in situ* detection of DSA could serve as marker for AML. To that end, we applied the anti-HLA single antigen flow bead assay to eluates from 51 needle core graft biopsies performed for cause. Intragraft antibody profiles were correlated to serum DSA (sDSA), histological data and transplant outcome. The prevalence and the mean number of intragraft DSA (gDSA) were lower than that of sDSA (15/51 gDSA+ vs. 37/51 sDSA+ patients; 1.64 gDSA vs. 2.24 sDSA per patient). DSA were detected in all anti-HLA antibody-positive biopsies (15/15). The presence of gDSA was significantly associated with (1) microcirculation lesions taken individually (g, cg) and analyzed in functional clusters (ptc + g + cg > 0, cg + mm > 0), (2) C4d positivity and (3) a worse short-term transplant outcome (p = 0.05). These associations were not found for patients presenting only sDSA. Taken together, these results indicate that gDSA is a severity marker of antibody-mediated pathogenic process.

**Keywords:** Anti-HLA antibodies, antibody-mediated lesions, donor-specific antibodies, graft elution, kidney transplantation

**Abbreviations:** AAMR, acute antibody-mediated rejection; ABMR, antibody-mediated rejection; ACMR, acute cell-mediated rejection; AML, antibody-mediated

lesions; CAMR, chronic antibody-mediated rejection; cg, glomerulopathy; DSA, donor-specific antibodies; eGFR, estimated glomerular filtration rate; g, glomerulitis; gDSA, intragraft DSA; IFTA, interstitial fibrosis and tubular atrophy; isDSA, immunodominant serum DSA; KTR, kidney transplant recipients; ptc, peritubular capillaritis; SAFB, single antigen flow bead; sDSA, serum DSA;  $\sum$ sDSA-MFI, sum of the mean fluorescence intensity of the different circulating DSA

Received 07 January 2013, revised 17 May 2013 and accepted for publication 03 June 2013

## Introduction

In recent years, the humoral anti-HLA response has been increasingly recognized as contributing to the majority of kidney graft failures (1). As specified in the Banff classification (2,3), the definition of antibody-mediated rejection (ABMR) relies on three cardinal features: (i) allograft pathology, (ii) antibody–tissue interaction as evidenced by peritubular C4d deposition and (iii) serologic anti-HLA donor-specific antibodies (DSA) (4). Recently, the diagnostic criteria of antibody-mediated lesions (AML) or injuries have been refined and extended to renal microcirculation deterioration (3,5), transplant glomerulopathy (6), *de novo* transplant microangiopathy (7) and accelerated arteriosclerosis (8). In this setting, peritubular capillary C4d deposition was demonstrated to be a specific but not a sensitive marker for all of these lesions, leading to the misclassification of nearly 50% of ABMR (9,10).

During the same time, the use of multiplex solid-phase assays for the detection and identification of anti-HLA antibodies spread widely due to their high sensitivity and specificity (11). These assays, especially the single antigen flow bead (SAFB) assay, have provided unprecedented possibilities for the characterization of anti-HLA allosensitization at the epitope level. However, the interpretation of circulating serum DSA (sDSA) by such approaches remains a matter of intense debate, as this huge improvement in technical performance is not necessarily associated with a support in clinical decision making (12,13). This is particularly true for determining the clinical significance of low levels of anti-HLA antibodies. On the one hand, a growing literature suggests that very low sDSA levels are detrimental to graft function or survival, either for

performed or for *de novo* sDSA (14–18). On the other hand, it has been demonstrated that sDSA at a low concentration may promote *in vitro* cell survival by activating the PI3K/Akt cascade and up-regulating expression of anti-apoptotic proteins in endothelial cells (19).

An alternative to sDSA detection would be to directly look for DSA into the transplant. This approach, which was attempted for the first time almost 40 years ago (20,21), has been mainly applied to surgically removed kidney grafts using complement-dependent cytotoxicity, the only available assay at the time. Recently, the more sensitive ELISA and flow cytometry FlowPRA<sup>®</sup> assays and, ultimately, the SAFB techniques have convincingly confirmed the presence of anti-HLA DSA in explanted kidney transplants (22–24). However, until now, very little work has been done on the small tissue samples represented by needle core biopsies of functioning transplants. In a limited number of patients, Martin et al. (25,26) have indeed detected the presence of plasma cells, C4d and intragraft DSA (gDSA) on serial biopsies from kidney transplant recipients (KTR) with chronic graft dysfunction. However, no correlation with graft outcome was performed, due to the small number of patients and/or the insufficient resolution of the assay used, which was not able to identify in all cases the antigenic specificities recognized by the anti-HLA alloantibodies detected.

Based on these data, we assessed the putative interest of needle core graft biopsy to evidence the presence of gDSA, using the SAFB assay. The goals of our study were to describe (i) the incidence of gDSA, (ii) the association between gDSA and histological lesions and (iii) the impact of gDSA on graft outcome.

## Materials and Methods

### Patients

This is a retrospective study of 51 KTR who underwent needle core graft biopsy for cause (generally for unexplained increase in serum creatinine, proteinuria or circulating sDSA) between December 2004 and August 2010, and had blood samples drawn on the same day as the biopsy. The available data on HLA sensitization status, graft conditions and immunosuppressive regimen on the day of the biopsy as well as those on graft functional status at 15 months postbiopsy were collected. Graft function was estimated by calculating estimated GFR (eGFR) using the MDRD formula. The study was approved by the institutional review board and did not interfere with standard patient clinical management.

### Histopathology

Graft cortical biopsies were performed with a 16-gauge biopsy needle guided by ultrasound. Each biopsy was examined by light microscopy, as follows: The biopsy core was fixed, embedded in paraffin, sectioned at 2  $\mu$ m and stained with Masson's trichrome, hematoxylin-eosin and periodic acid Schiff. Histological analyses were performed by one pathologist (SL) and graded according to the updated semi-quantitative Banff classification, including the concept of suspicious ABMR (27). A second biopsy sample was collected and frozen sections were stained with anti-IgA, -IgG, -IgM, -C3

(Binding Site, Birmingham, UK) and -C4d (Quidel, San Diego, CA) antibodies. Samples with C4d staining at more than 50% of peritubular capillaries were considered as positive for C4d deposition. One patient was excluded from the histological analysis because the biopsy did not allow a clear diagnosis according to the Banff criteria, despite a C4d-positive staining. The Banff cv and ah score could not be evaluated in four patients and the C4d staining was not available in one patient.

### Biopsy elution

Graft biopsies were processed as previously described (23), using the Acid Elution kit (Elukit II; Gamma Biologicals, Inc., Houston, TX). Briefly, the remnant of the nonfixed frozen biopsy core used for the immunofluorescence analysis was thawed at room temperature, minced, resuspended in 1.5 mL of phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 3000 rpm for 2 min. This washing procedure was performed three times to remove the recipient's biological fluids. After the last centrifugation step, the pellet was resuspended in 0.1 mL of PBS and centrifuged again. The supernatant was collected for further antibody analysis (negative control testifying for the efficacy of the washing steps in removing the recipient's blood and extracellular fluids), while the cell pellet was resuspended in 0.1 mL of acid elution buffer (glycine solution at pH=2.1), incubated for 10 min at room temperature and centrifuged at 6000 rpm for 2 min. The eluate was recovered and neutralized to pH=6.5 using 0.1 mL of buffering solution (tris[hydroxymethyl]aminomethane solution at pH=8.5) and stored at -80°C until analysis. The supernatant recovered after the last washing step was tested when the biopsy eluate was found positive. This control was performed to confirm the specific action of the elution process on the graft-bound antibody. All were found negative (results not shown). The same person (GP) performed all the experiments. In experiments not shown, we demonstrated that the acid buffer + neutralizing solution mix did not trigger denaturation of the HLA antigens on the Class I and Class II SAFB. We also demonstrated, using serum samples from patients included in this study, that acid treatment, then neutralization, did not lead to the denaturation of anti-HLA antibodies, which would have prevented their detection in the biopsy eluates with the SAFB assays. Therefore, the differences that we observed for DSA between serum and biopsy eluates could not be attributed to denaturing effects toward anti-HLA antibodies or antigens, caused by the elution procedure.

### Anti-HLA antibody testing

Anti-HLA Class I and II antibodies were detected and identified in the serum and the biopsy eluates, with the LabScreen LS1A04 and LS2A01 SAFB assay (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA) on a Luminex 100<sup>®</sup> analyzer (Luminex, Austin, TX), according to the manufacturer's recommendations, using SAFB lots 6 and 8, respectively. The same person (GP) performed all the experiments. Donor HLA typing (Class I HLA-A, -B, -Cw and Class II HLA-DR, -DR51/52/53, -DQ and -DP) was performed on cell aliquots stored frozen at the time of the transplant by using the high-resolution reverse SSO-PCR assay (LabType, One Lambda, Inc.). The positivity thresholds were set at a normalized mean fluorescence intensity (MFI)  $\geq 500$  using the baseline calculation mode (HLA Fusion software; One Lambda, Inc.), for the serum, and at a normalized MFI  $\geq 100$  for the biopsy. The latter value was determined from two kinds of preliminary experiments. First, we used biopsy eluates from three surgically removed kidneys from nontransplanted patients and the acid + neutralizing solution as a negative control matrix. Second, we relied on the MFI value provided by the HLA-negative control bead of the SAFB assay performed for each serum/eluate pair, which was found fivefold lower for the biopsy eluate than for the serum, in Class I and in Class II. Given the cutoff set at 500 for the serum, a positivity threshold at 100 for the biopsy was therefore retained, which also corresponded to a mean + 5 SD value as defined by the first approach. Such a stringent cutoff favored specificity of antibody detection in biopsy eluates (results not

shown). Results are expressed either as the sum of the sDSA-MFI ( $\sum$ sDSA-MFI) or as the immunodominant sDSA-MFI (isDSA-MFI).

**Statistical analysis**

Analyses were performed using conventional statistical methods. The MacNemar chi-square test was used for qualitative variables; the Student's t-test and the Mann-Whitney U-test were used when appropriate. The variables potentially associated with the occurrence of gDSA were subjected to univariate analysis. Kaplan-Meier analysis was used to construct graft survival curves. Comparisons were made using the log-rank test. Analyses were performed with JMP 10 IN software (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

**Results**

**Study population**

The study included 51 KTR who underwent a graft biopsy between December 2004 and August 2010, for whom a nonfixed frozen biopsy core and a serum sample collected on the same day were available. All graft biopsies were performed for cause and categorized according to the Banff criteria into acute antibody-mediated rejections (AAMR, n = 12), suspicious for AAMR (n = 4), chronic antibody-mediated rejections (CAMR, n = 8), suspicious for CAMR (n = 8), acute cell-mediated rejections (ACMR) without capillaritis (n = 9), interstitial fibrosis and tubular atrophy lesions (IFTA, n = 6), normal profiles (n = 3) and unclassified (n = 1; see Materials and Methods section). The mean time since kidney transplantation was 3.4 ± 4.8 years, and 26 out of the 51 patients (51%) had an early biopsy (<12 months after transplantation). In accordance with inclusion criteria, at biopsy, mean patient age was 47.4 ± 14.6 years, 72% were male, and renal graft function was already impaired, as illustrated by a mean creatininemia of 295 μM, related to a mean MDRD-based eGFR of 27.6 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> and a mean proteinuria of 0.7 g/L. The baseline demographic and clinical characteristics at the time of transplant and biopsy are summarized in Table 1.

**Characterization of sDSA and gDSA**

In the serum, 46 patients (90%) exhibited anti-HLA Class I and/or II antibodies. Among these, 40 patients (78%) exhibited Class I antibodies and 41 patients (80%) Class II antibodies. At least one sDSA was present in 68% (27/40) and 71% (29/41) of the patients positive for anti-HLA Class I and/or II antibodies, respectively. The mean ± SD number of sDSA per patient was 2.24 ± 1.5, and the locus distribution of the HLA specificities targeted by the sDSA was as follows: 12, 14, 18, 10, 5, 16 and 9 cases for A, B, Cw, DR, DR 51/52/53, DQ and DP antigens, respectively (Table 2 and Figure S1).

In the biopsy, 15 patients (29%) exhibited at least one anti-HLA antibody. Seven patients (14%) exhibited Class I antibodies and 13 (25%) had Class II antibodies. The intragraft anti-HLA antibodies were always DSA (7/7 and 13/13 in Class I and Class II, respectively). The mean ± SD

number of gDSA per patient was lower than in the serum (1.64 ± 0.9, p = 0.01; Table 2) but showed a similar distribution of HLA specificities (p = 0.93; Figure S1). There was a strong association between the presence of sDSA and gDSA, considering Class I (p = 0.007), Class II (p = 0.003) and Class I and/or II sensitization (p = 0.005) (Table S1). While 40.5% of sDSA+ patients had gDSA, gDSA was never detected in sDSA- patients (Table S1). However, in two cases, the anti-HLA Class II gDSA antigenic specificity (HLA DQ9 and HLA DP3) was different from the one identified for the sDSA (Table 2, in bold). The MFI strength (±SD) of DSA was significantly higher in the serum of gDSA+ than gDSA- patients ( $\sum$ sDSA-MFI of 13 464 ± 11 852 vs. 3270 ± 7527, p < 0.0001 and isDSA-MFI of 7369 ± 4932 vs. 2158 ± 3694, p < 0.0001) (Figure 1A and B).

**gDSA and Banff histological analysis**

In our cohort, gDSA was mostly found in biopsies exhibiting AML, whereas it could not be found in any biopsies either normal or with IFTA lesions and was absent from 89% of biopsies with ACMR (Table 3). The Banff histological items were investigated in 50 patients both individually (i, t, ptc, g, ci, ct, cg, mm, cv, ah and v) and in functional clusters according to the recent report from the Edmonton group (with ptc+g+cg referring to microcirculation lesions, ptc+g to microcirculation inflammation, cg+mm to microcirculation deterioration, i+t to tubulointerstitial inflammation and ci+ct to tubulointerstitial scarring, considered severe when >2) (1,28–30). To analyze the

**Table 1:** Demographic and clinical characteristics of the patient cohort

	N = 51
Sex (M/W)	37/14
At kidney transplantation	
Induction immunosuppressive treatment	
Thymoglobulin/anti-interleukin 2 receptor/none	21/24/6
Intravenous immunoglobulins	14
Donor	
Age (years ± SD)	45.5 ± 16.2
Expanded criteria donor	16 (31.4%)
Risk factors for HLA sensitization	
Previous kidney transplantation	15 (29.4%)
Transplant removal	6 (11.8%)
Blood transfusion	24 (47.1%)
Pregnancy	10
At biopsy	
Age (years ± SD)	47.4 ± 14.6
Time since transplantation (years ± SD)	3.4 ± 4.8
Maintenance immunosuppressive treatment	
Cyclosporine A/tacrolimus/none	12/36/0
Mycophenolate Mofetil/Azathioprine/none	42/5/0
Steroids	32
Graft function	
Proteinuria (g/L)	0.7 ± 0.9
Creatininemia (μmol/L)	295 ± 250
MDRD-based eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	27.6 ± 14

**Table 2:** By-patient distribution of anti-HLA antibodies and HLA antigenic specificities of DSA in the graft eluate and in the serum

Patient	Intragraft anti-HLA Ab	Biopsy: gDSA					Serum anti-HLA Ab	Serum: sDSA							
		Class I HLA Ag		Class II HLA Ag				Class I HLA Ag			Class II HLA Ag				
1-5	No	0	0	0	0	0	No	0	0	0	0	0	0	0	
6-14	No	0	0	0	0	0	Yes	0	0	0	0	0	Q	0	
15	No	0	0	0	0	0	Yes	0	0	0	0	DQ5	0	0	
16	No	0	0	0	0	0	Yes	0	0	0	0	DQ7	0	0	
17	No	0	0	0	0	0	Yes	A1	0	0	0	0	0	0	
18	No	0	0	0	0	0	Yes	C15	0	0	0	0	J	0	
19	No	0	0	0	0	0	Yes	A68	0	0	0	0	8	0	
20	No	0	0	0	0	0	Yes	C5	0	0	0	0	o	0	
21	No	0	0	0	0	0	Yes	A1	0	0	0	0	8	0	
22	No	0	0	0	0	0	Yes	0	0	0	0	DQ7	0	0	
23	No	0	0	0	0	0	Yes	0	0	0	0	DQ5	0	0	
24	No	0	0	0	0	0	Yes	C7	0	0	0	0	0	0	
25	No	0	0	0	0	0	Yes	C12	0	0	0	0	DP14	0	0
26	No	0	0	0	0	0	Yes	A26	B35	0	0	0	0	0	
27	No	0	0	0	0	0	Yes	C6	0	0	0	0	DP4	0	0
28	No	0	0	0	0	0	Yes	0	0	0	0	DR7	DP4	0	
29	No	0	0	0	0	0	Yes	B56	0	0	0	0	DQ4	0	0
30	No	0	0	0	0	0	Yes	B51	0	0	0	0	DQ9	0	0
31	No	0	0	0	0	0	Yes	C12	0	0	0	0	DP4	0	0
32	No	0	0	0	0	0	Yes	A24	0	0	0	0	DR16	DQ8	0
33	No	0	0	0	0	0	Yes	B49	0	0	0	0	DR15	DR51	0
34	No	0	0	0	0	0	Yes	C12	B38	0	0	0	DR13	a	0
35	No	0	0	0	0	0	Yes	C5	B44	C7	0	0	DR11	0	0
36	No	0	0	0	0	0	Yes	C8	0	0	0	0	DR53	DQ2	DR7
37	Yes	0	0	DQ6	0	0	Yes	0	0	0	0	0	DQ6	0	0
38	Yes	0	0	DP3	0	0	Yes	0	0	0	0	0	DQ8	0	0
39	Yes	0	0	DQ9	0	0	Yes	0	0	0	0	0	DQ9	0	0
40	Yes	0	0	DP14	0	0	Yes	0	0	0	0	0	DP14	0	0
41	Yes	0	0	DQ9	0	0	Yes	A29	0	0	0	0	0	0	0
42	Yes	A2	0	0	0	0	Yes	A2	0	0	0	0	DR51	0	0
43	Yes	0	0	DQ7	0	0	Yes	B45	A29	0	0	0	DQ7	0	0
44	Yes	0	0	DR53	0	0	Yes	0	0	0	0	0	DR7	DR53	DQ5
45	Yes	0	0	DQ7	0	0	Yes	C5	B27	0	0	0	DQ7	0	0
46	Yes	A23	0	DQ5	0	0	Yes	A23	0	0	0	0	DQ8	0	0
47	Yes	A68	0	DP3	0	0	Yes	A6S	0	0	0	0	DP3	0	0
48	Yes	0	B38	DR13	0	0	Yes	C12	B38	A26	B49	0	DR13	0	0
49	Yes	C17	C6	0	0	0	Yes	C17	C6	B57	B41	0	DP2	DP4	0
50	Yes	A1	B13	DP4	0	0	Yes	A1	B13	C6	C16	0	DP4	DR7	0
51	Yes	C6	0	DR53	DR4	DQ8	Yes	C6	C10	0	0	0	DR53	DR4	DQ8

DSA, donor-specific antibodies; gDSA, intragraft DSA; sDSA, serum DSA.

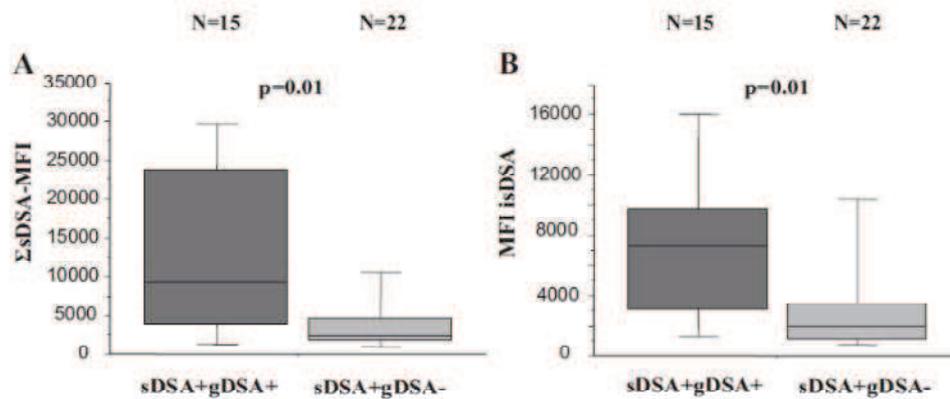
DSA are listed by decreasing MFI value for Class I and Class II separately.

Two gDSA from two different patients and biopsies with AAMR were directed against donor HLA antigens not targeted by the sDSA (HLA

performance of gDSA, and because of the absence of sDSA- gDSA+ patients in our cohort, we focused on the comparison of the sDSA+ gDSA+ patients (n = 15) with the sDSA+ gDSA- (n = 21) patients (Figure 2).

The sDSA+ gDSA+ biopsies exhibited AML more frequently than the sDSA+ gDSA- biopsies, as evidenced for the g and cg items taken individually (g > 0 in 33% of sDSA+ gDSA+ [n = 5] vs. 6% of sDSA+ gDSA- patients [n = 1], p = 0.02; cg > 0 in 60% of sDSA+ gDSA+ [n = 9] vs. 17% of sDSA+ gDSA- patients [n = 3], p = 0.01), although the ptc item did not reach significance (ptc > 0 in 53% of sDSA+ gDSA+ [n = 8] vs. 26% of sDSA+ gDSA- patients

[n = 6], p = 0.1) (Figure 2A). Of note, vascular lesions were also overrepresented in sDSA+ gDSA+ patients either for cv or v (cv > 0 in 67% of sDSA+ gDSA+ [n = 10] vs. 29% of sDSA+ gDSA- patients [n = 6], p = 0.03; v > 0 in 20% of sDSA+ gDSA+ [n = 3] vs. 0 in sDSA+ gDSA-, p = 0.03). Cluster analysis (Figure 2B) showed similar results for ptc + g + cg > 0 (in 93% of sDSA+ gDSA+ [n = 14] vs. 38% of sDSA+ gDSA- patients [n = 8], p = 0.001) and for cg + mm > 0 (in 75% of sDSA+ gDSA+ [n = 10] vs. 19% of sDSA+ gDSA- patients [n = 4], p = 0.004) with ptc + g > 0 very close to statistical significance (60% of sDSA+ gDSA+ [n = 9] vs. 29% of sDSA+ gDSA- patients [n = 6], p = 0.06). On the contrary, no association was found for



**Figure 1: DSA MFI levels.** MFI levels of  $\Sigma$ sDSA (A) and isDSA (B) for sDSA+ gDSA+ and sDSA+ gDSA- patients. Data are expressed as median (horizontal line in the box), first/third quartile range (boundaries of the box) and full-range distribution (whisker line) for the whole population. Differences between sDSA+ gDSA+ and sDSA+ gDSA- patients were evaluated using the Mann-Whitney U-test.  $\Sigma$ sDSA-MFI, sum of the mean fluorescence intensity (MFI) of the different circulating donor-specific antibodies (DSA); sDSA, serum DSA; gDSA, intragraft DSA; isDSA, immunodominant serum DSA.

i+t>0 (in 53% of sDSA+ gDSA+ [n=8] vs. 62% of sDSA+/gDSA- patients [n=13], p=0.6), nor for ci+ct>2 (in 40% of sDSA+ gDSA+ [n=6] vs. 29% of sDSA+/gDSA- patients [n=6], p=0.5).

When considering the Banff criteria as quantitative variables, the cg item occurred individually significantly more frequently in sDSA+ gDSA+ than in sDSA+ gDSA- patients (mean  $\pm$  SD 1.0  $\pm$  1.1 vs. 0.4  $\pm$  1.1, p=0.04) (Figure 2C). When analyzed as clusters (Figure 2D), ptc+g+cg (2.3  $\pm$  1.4 vs. 0.8  $\pm$  1.5, p=0.003) and cg+mm scores (1.3  $\pm$  1.4 vs. 0.8  $\pm$  1.7, p=0.04) were significantly higher in sDSA+ gDSA+ than in sDSA+ gDSA- patients, respectively. The ptc+g score was very close to significance (1.3  $\pm$  1.3 vs. 0.4  $\pm$  0.8, p=0.06).

The presence of C4d deposits in peritubular capillaries (n=26 among the 50 interpretable biopsies) was significantly associated with gDSA (p=0.01) but not with sDSA

(p=0.3), with 80% (n=12) of gDSA+ biopsies displaying C4d deposition (Figure 2A and B).

No significant association was observed when comparing sDSA+ with sDSA- patients for any of the individual Banff criteria considered as qualitative or as quantitative variables. In accordance with previously published results (10,29,30), a qualitative cluster analysis showed that ptc+g+cg>0 lesions occurred more frequently in sDSA+ than in sDSA- patients (61% [n=24] vs. 29% [n=4], respectively; p=0.04), and no significant difference was noticed for any of the other clusters or Banff scores (results not shown).

**Risk factors associated with the presence of gDSA**

In univariate analysis, g>0 (OR=8.25, p=0.02), cg>0 (OR=7.25, p=0.004), C4d+ (OR=6.0, p=0.01) and  $\Sigma$ sDSA-MFI (OR=1.06 for each increase of 500 MFI

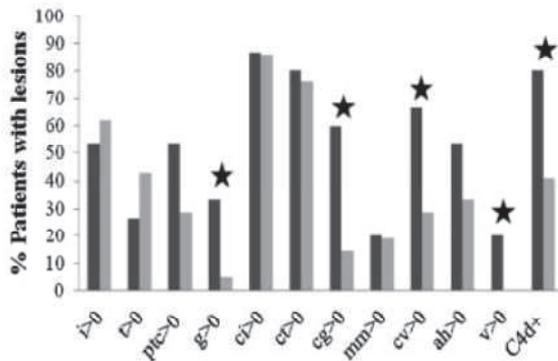
**Table 3:** Distribution of gDSA and/or sDSA according to patients' histologically defined Banff categories

Banff classification	AAMR	Suspicious for AAMR	CAMR	Suspicious for CAMR	ACMR	IFTA	Normal	p	Total
Number of patients	12	4	8	8	9	6	3		
Class I and/or II sDSA+*	12 (100)	0 (0)	8 (100)	7 (88)	7 (78)	0 (0)	2 (66)	<0.001	36
Class I and/or II gDSA+*	7 (58)	0 (0)	5 (63)	2 (25)	1 (11)	0 (0)	0 (0)	0.01	15

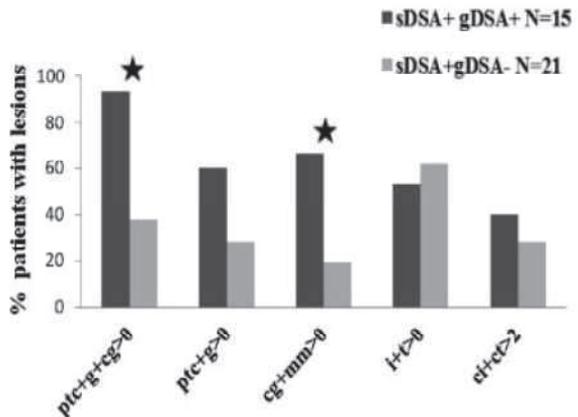
AAMR, acute antibody-mediated rejection: C4d+, presence of circulating anti-donor antibodies, morphologic evidence of acute tissue injury; Suspicious for AAMR, suspicious for acute antibody-mediated rejection: C4d (in the presence of antibody) or alloantibody (C4d+) not evidenced despite the presence of morphologic evidence of acute tissue injury; CAMR, chronic antibody-mediated rejection: C4d+, presence of circulating anti-donor antibodies, morphologic evidence of chronic tissue injury, such as glomerular double contours and/or peritubular capillary basement membrane multi-layering and/or interstitial fibrosis/tubular atrophy and/or fibrous intimal thickening in arteries; Suspicious for CAMR, suspicious for chronic antibody-mediated rejection: C4d (in the presence of antibody) or alloantibody (C4d+) not evidenced despite morphologic evidence of chronic tissue injury; ACMR, acute cell-mediated rejection: interstitial infiltration (i  $\geq$  1) and tubulitis (t  $\geq$  1) without any signs of capillaritis (ptc+g=0); IFTA, interstitial fibrosis and tubular atrophy: interstitial fibrosis (ci  $\geq$  1) and tubular atrophy (ct  $\geq$  1), no evidence of any specific etiology; Normal, none of the previous lesions.

\*Number (and percentage) of patients of the corresponding Banff category with the indicated DSA.

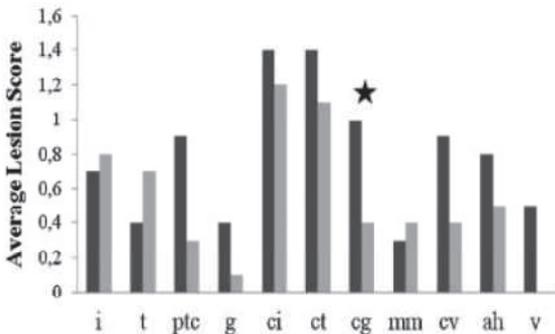
**A individual qualitative Banff analysis**



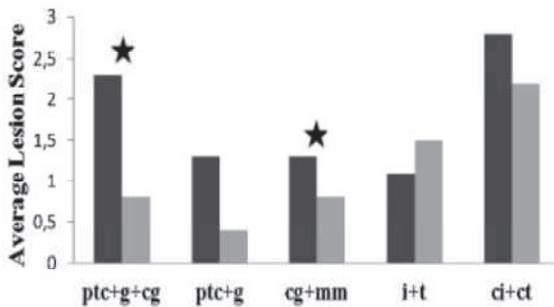
**B cluster qualitative Banff analysis**



**C individual quantitative Banff analysis**



**D cluster quantitative Banff analysis**



**Figure 2: Histological analysis of intragraft DSA (gDSA) among serum DSA (sDSA).** The Banff histologic items are considered either individually (i, t, g, ptc, ci, ct, cg, mm, cv, ah and v) (A and C) or in functional clusters (ptc + g + cg referring to microcirculation lesions, ptc + g to microcirculation inflammation, cg + mm to microcirculation deterioration, i + t to tubulointerstitial inflammation and ci + ct to tubulointerstitial scarring, considered severe when >2) (B and D), either as qualitative (A and B) or quantitative (C and D) variables. Data are presented as mean, with analysis by the MacNemar chi-square-test and Mann-Whitney U-test. The stars depict  $p < 0.05$ .

units,  $p=0.01$ ) were found to be the only factors significantly associated with the presence of gDSA, whereas  $ptc > 0$  (OR = 3.3,  $p=0.06$ ) and proteinuria (OR = 1.96 for each 1g/L increase,  $p=0.06$ ) showed borderline significance (Table 4). In a multivariate analysis including ptc, g, cg, C4d,  $\sum$ sDSA-MFI and proteinuria, we found that the only parameter still independently associated with gDSA was  $\sum$ sDSA-MFI (OR = 1.05 for each increase of 500 MFI units,  $p=0.02$ ; Table 4).

The presence of a gDSA was statistically significantly associated ( $p=0.02$ ) with a  $\sum$ sDSA-MFI above 3820, which is the median value for our sDSA+ patients. Of note, we found similar results when considering an MFI for the isDSA above the median value of 3110 ( $p=0.02$ ). Positive and negative predictive values, sensitivity and specificity were 61%, 79%, 73% and 68%, respectively, for both.

**gDSA and short-term transplant outcome**

The median time of follow-up after biopsy was 15.3 months. No significant difference in graft function was detected between sDSA+ gDSA+, sDSA+ gDSA- and no DSA patients on the day of the biopsy (mean  $\pm$  SD): creatinemia of  $376 \pm 346$ ,  $254 \pm 247$  and  $272 \pm 97 \mu\text{mol/L}$  respectively,  $p=0.1$  (result not shown) and eGFR of  $24.5 \pm 17$ ,  $32 \pm 15$  and  $24 \pm 9 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ , respectively,  $p=0.2$  (Figure 3A). No difference was detected 15 months later, although there was a trend toward a worse outcome for the sDSA+ gDSA+ patients: creatinemia of  $466 \pm 450$ ,  $293 \pm 302$  and  $272 \pm 190 \mu\text{mol/L}$  ( $p=0.2$ ), and eGFR of  $24.1 \pm 20$ ,  $33.4 \pm 22$  and  $33.2 \pm 22 \text{ mL/min/1.73 m}^2$  ( $p=0.3$ ) (Figure 3A). Nevertheless, 30 months after the biopsy, 15 of the 51 patients had progressed to end-stage renal disease. Graft survival was lower in the sDSA+ gDSA+ ( $n=15$ ) than in the sDSA+ gDSA- patient group ( $n=22$ ) (53% vs. 77%,  $p=0.1$ ). This difference was

**Table 4:** Factors associated with the occurrence of gDSA

	OR	CI 95%	p
<b>Univariate analysis</b>			
Sex	0.67	[0.18–2.48]	0.54
At graft biopsy			
Age <sup>1</sup>	1.00	[0.96–1.05]	0.93
Time since transplantation <sup>1</sup>	1.00	[0.99–1.01]	0.56
Maintenance immunosuppressive treatment			
Cyclosporine A vs. Tacrolimus	2.20	[0.4–11.8]	0.36
Mycophenolate Mofetil vs. Azathioprine	0.24	[0.04–1.61]	0.14
Steroids vs. no steroids	1.27	[0.4–4.5]	0.71
Histologic data			
i > 0	1.10	[0.3–3.7]	0.90
t > 0	0.70	[0.2–2.7]	0.60
ptc > 0	3.30	[0.9–11.7]	0.06
g > 0	8.25	[1.4–49.2]	0.02
ci > 0	0.84	[0.1–5.2]	0.85
ct > 0	1.00	[0.2–4.5]	0.99
cg > 0	7.25	[1.9–28.1]	0.004
mm > 0	0.74	[0.3–2.1]	0.99
cv > 0	2.43	[0.7–8.8]	0.17
ah > 0	1.67	[0.5–5.7]	0.40
v > 0	8.00	[0.8–84.6]	0.08
C4d+	6.00	[1.4–25.2]	0.01
Serum DSA			
sDSA	–	–	0.96
ΣsDSA-MFI <sup>2</sup>	1.059	[1.01–1.11]	0.01
Graft function			
Creatininemia <sup>3</sup>	1.10	[0.99–1.11]	0.17
MDRD-based eGFR <sup>4</sup>	0.98	[0.94–1.02]	0.32
Proteinuria <sup>5</sup>	1.96	[0.97–3.9]	0.06
At kidney transplantation			
Induction immunosuppressive treatment			
Thymoglobulin/anti-interleukin 2 receptor/none	1.50	[0.43–5.2]	0.53
IVIg vs. no IVIg	2.33	[0.64–8.54]	0.20
Risk factors for HLA sensitization			
Previous kidney transplantation	1.73	[0.5–6.1]	0.39
Transplantectomy	7.00	[0.7–70.8]	0.10
Blood transfusion	3.00	[0.8–10.7]	0.90
Pregnancy	2.00	[0.1–26.7]	0.60
Expanded criteria donor	1.01	[0.3–3.8]	0.99
<b>Multivariate analysis</b>			
Proteinuria <sup>5</sup>	1.15	[0.4–3.2]	0.78
ΣsDSA-MFI <sup>2</sup>	1.05	[1.006–1.092]	0.02
ptc > 0	1.15	[0.1–11.9]	0.9
g > 0	4.7	[0.3–74.5]	0.27
cg > 0	6.9	[0.7–71.7]	0.1
C4d+	1.5	[0.1–21.5]	0.76

ΣsDSA-MFI, sum of the mean fluorescence intensity (MFI) of the different circulating donor-specific antibodies (DSA); sDSA, serum DSA; gDSA, intragraft DSA; eGFR, estimated GFR.

IVIg, intravenous immunoglobulins.

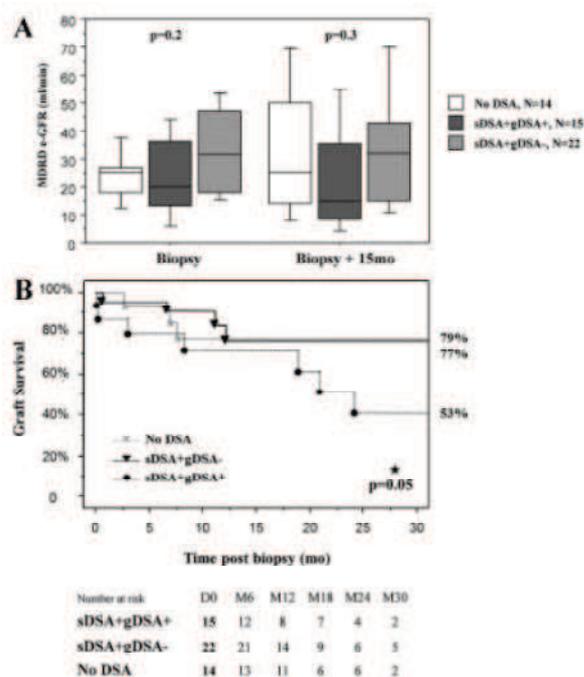
<sup>1</sup>For each additional year.

<sup>2</sup>For each additional 500 MFI units.

<sup>3</sup>For each additional μmol/L.

<sup>4</sup>For each additional mL/min/1.73 m<sup>2</sup>.

<sup>5</sup>For each additional g/L.



**Figure 3: Graft function outcome according to the presence or absence of gDSA or sDSA at the time of the biopsy and at distance postbiopsy.** Graft function was estimated by the MDRD-based eGFR (A) and the death-censored graft survival (B). When comparing the gDSA+ patients to all the gDSA- patients (sDSA+gDSA- and no DSA) patients, the p was significant (\*p=0.05). DSA, donor-specific antibodies; sDSA, serum DSA; gDSA, intragraft DSA; eGFR, estimated GFR.

yet not significant, in all likelihood because of the small number of patients and/or a too limited duration of follow-up. The presence of gDSA in comparison with the gDSA- group (sDSA+ gDSA- and no DSA) was associated with a worse short-term outcome since the death-censored graft survival was 53% in the gDSA+ versus 78% in the gDSA- patients' groups (p=0.05) (Figure 3B).

### Discussion

Our study indicates that gDSA can be easily detected and identified in eluates from needle core biopsies using the SAFB assay. In this cohort of sensitized KTR, (i) no gDSA was detected in the absence of sDSA, (ii) the antibody-positive biopsies always contained at least one DSA and (iii) sDSA MFI strength was the best parameter associated to the occurrence of gDSA. Interestingly, we found that gDSA, but not sDSA, was strongly correlated with AML, and was also associated with a poor transplant outcome. Taken together, our results suggest that gDSA could represent a valuable biomarker of severe antibody-mediated pathogenic processes. However, our study has several limitations: It

is a single-center, retrospective and nonrandomized study on a limited cohort of 51 patients. The kidney graft function deterioration was often at an advanced stage at the time of the biopsy, and as a consequence, the results shown here cannot be used to estimate the role of gDSA in the early phase of ABMR. Still, to our knowledge, this study is the first to get into the prospect of clinical application, as we focused on eluates extracted from needle core biopsies sampled before graft failure and used the powerful SAFB technology. As biopsy processing takes less than 1 h, the whole procedure can easily be performed within a working day. One criticism would be to state that gDSA are in fact sDSA that have not been removed correctly during the washing procedure. However, we can argue, first, that the supernatant of the last washing step can be used as a negative control to demonstrate that all antibodies not bound to tissue cells have been removed, and second, that no non-DSA were found in the eluates, unless they displayed crossreactivity with a donor antigen (results not shown, and (31) for a reported case). Therefore, the exclusive presence of DSA in eluates reflected the reliability of this approach. Interestingly, for two patients we were able to detect two gDSA, which were directed against donor HLA antigens not targeted by the sDSA that were detected. Both of these patients were undergoing an acute rejection episode. These DSA were not evidenced in the serum before the biopsy. For one patient only, the DSA became detectable in the serum after the biopsy (DQ9, at 5 weeks). Biopsy elution could thus increase the sensitivity of DSA detection in these patients.

Our study shows that the prevalence of gDSA remained lower than that of sDSA, a feature that may have several explanations. First, professional phagocytes such as tissue macrophages could contribute through their Fc-gamma receptors, to the clearance of the gDSA involved in immune complexes with the alloantigen. Second, the sensitivity of the assay may be insufficient given the smallness of the tissue sample (25). Third, a single needle core biopsy specimen is most probably not representative of a whole kidney. Last, the SAFB assay MFI cutoff value for the biopsy eluate was set to favor specificity of antibody detection, but this could have occurred to the detriment of sensitivity, and thus will need to be refined with larger cohorts, keeping in mind that the SAFB assay was released as a qualitative assay, and suffers from insufficient intra- and inter-laboratory reproducibility that impedes its use as a quantitative test, as recalled recently (32). In experiments not shown, we ruled out the possibility that the acid elution procedure could have irreversibly altered the antigen-binding capacity of some antibodies, thereby preventing them from further binding to the relevant SAFB. Therefore, taken together, our results suggest that the SAFB identification of anti-HLA alloantibodies directly into the graft tissue was technically feasible, but did not perform better than in the serum, although this could have been expected from the commonly accepted hypothesis that the graft could act as a "sponge trap" for circulating antibodies.

In this cohort, anti-HLA antibodies specific for HLA-Cw, -DP or -DR51/52/53 antigens were frequently identified, both as sDSA and more importantly as gDSA. These findings are in favor of a pathogenic role for allosensitization against these antigens, as is being increasingly reported for HLA-Cw (33) and -DP (34). Of note, these HLA antigens are not integrated in most of the organ allocation algorithms and, similarly, are not considered in a vast majority of published reports analyzing the role of circulating DSA in organ transplant outcome (15,30,35).

In our cohort, the risk factors traditionally associated with HLA sensitization were not associated with the occurrence of gDSA. In contrast, markers of AML (i.e. g, cg, C4d and  $\Sigma$ sDSA-MFI) were in univariate analysis. In multivariate analysis, only the MFI of sDSA was still associated with gDSA. Such a correlation has not yet been demonstrated for *de novo* posttransplant sDSA, although high MFI sDSA have been associated with poor outcome (15). In this perspective, the detection of gDSA could help stratifying the immunological risk.

We confirm the results recently reported by the Edmonton group (30), according to which microcirculation lesions analyzed as functional clusters ( $ptc + g + cg > 0$ ) were associated with the presence of sDSA. We demonstrate here that the detection of gDSA in sDSA+ recipients is also associated with C4d staining, and with microcirculation lesions analyzed as functional clusters ( $ptc + g + cg > 0$  and  $cg + mm > 0$ ). So far, only a statistical association between sDSA and microcirculation lesions had been demonstrated. With the present work, the detection of DSA in biopsy eluates, that is directly into a functioning transplant, represents a new argument of causality for their pathogenesis in AML.

To further investigate the clinical relevance of gDSA, we analyzed the patient outcome after the graft biopsy. The KTR included in this study displayed a high immunological risk, as most were HLA-sensitized and displayed circulating sDSA. At the time of the biopsy, their graft function was already altered, as illustrated by their mean creatininemia and eGFR, and there was also a trend to a worse creatininemia and eGFR for the sDSA+ gDSA+ patients when compared to the sDSA+ gDSA-. Taken together, these results suggest that gDSA indicates an active pathogenic process, which cannot be predicted by detecting solely a sDSA. Then, the presence of gDSA appears as an interesting biomarker to identify KTR at risk of poor graft outcome.

In conclusion, this study highlights the interest of analyzing the presence or absence of DSA in eluates from needle core biopsies. Based on these results, we believe that gDSA could help quantifying the severity of an active antibody-mediated pathogenic process, and as such could be used as a surrogate endpoint in future studies to guide therapeutic intervention and monitoring.

*American Journal of Transplantation* 2013; XX: 1–10

## Acknowledgments

We thank Catherine Rio for her help as a nurse coordinator. We also acknowledge the technicians from the Laboratory of Immunology and Immunogenetics at Bordeaux University Hospital for their significant contribution to this study. There was no study sponsor.

## Disclosure

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

## References

1. Einecke G, Sis B, Reeve J, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 2009; 9: 2520–2531.
2. Sis B, Mengel M, Haas M, et al. Banff '09 meeting report: Antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 2010; 10: 464–471.
3. Mengel M, Sis B, Haas M, et al. Banff 2011 meeting report: New concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2012; 12: 563–570.
4. Archdeacon P, Chan M, Neuland C, et al. Summary of FDA antibody-mediated rejection workshop. *Am J Transplant* 2011; 11: 896–906.
5. Cosio FG, Lager DJ, Lorenz EC, Amer H, Gloor JM, Stegall MD. Significance and implications of capillaritis during acute rejection of kidney allografts. *Transplantation* 2010; 89: 1088–1094.
6. Issa N, Cosio FG, Gloor JM, et al. Transplant glomerulopathy: Risk and prognosis related to anti-human leukocyte antigen class II antibody levels. *Transplantation* 2008; 86: 681–685.
7. Satoskar AA, Pelletier R, Adams P, et al. De novo thrombotic microangiopathy in renal allograft biopsies—role of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2010; 10: 1804–1811.
8. Hill GS, Nochy D, Bruneval P, et al. Donor-specific antibodies accelerate arteriosclerosis after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 975–983.
9. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 2009; 9: 2312–2323.
10. Loupy A, Hill GS, Suberbielle C, et al. Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). *Am J Transplant* 2011; 11: 56–65.
11. Bray RA, Gebel HM. Strategies for human leukocyte antigen antibody detection. *Curr Opin Organ Transplant* 2009; 14: 392–397.
12. Vlad G, Ho EK, Vasilescu ER, et al. Relevance of different antibody detection methods for the prediction of antibody-mediated rejection and deceased-donor kidney allograft survival. *Hum Immunol* 2009; 70: 589–594.
13. Couzi L, Araujo C, Guidicelli G, et al. Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. *Transplantation* 2011; 91: 527–535.
14. Cooper JE, Gralla J, Chan L, Wiseman AC. Clinical significance of post kidney transplant *de novo* DSA in otherwise stable grafts. *Clin Transpl* 2011; 359–364.

15. Gloor JM, Winters JL, Cornell LD, et al. Baseline donor-specific antibody levels and outcomes in positive crossmatch kidney transplantation. *Am J Transplant* 2010; 10: 582–589.
16. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by Luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation* 2009; 87: 1505–1513.
17. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1398–1406.
18. Ntokou IS, Iniotaki AG, Kontou EN, et al. Long-term follow up for anti-HLA donor specific antibodies postrenal transplantation: High immunogenicity of HLA Class II graft molecules. *Transpl Int* 2011; 24: 1084–1093.
19. Jindra PT, Zhang X, Mulder A, et al. Anti-HLA antibodies can induce endothelial cell survival or proliferation depending on their concentration. *Transplantation* 2006; 82: S33–S35.
20. Jeannet M, Lambert PH. Immunological studies on eluates from human kidney grafts. *Clin Immunol Immunopathol* 1975; 4: 478–488.
21. Metzgar RS, Seigler HF, Ward FE, Rowlands DT Jr. Immunological studies on eluates from human renal allografts. *Transplantation* 1972; 13: 131–137.
22. Heinemann FM, Roth I, Rebmann V, et al. Immunoglobulin isotype-specific characterization of anti-human leukocyte antigen antibodies eluted from explanted renal allografts. *Hum Immunol* 2007; 68: 500–506.
23. Martin L, Guignier F, Mousson C, Rageot D, Justrobo E, Rife G. Detection of donor-specific anti-HLA antibodies with flow cytometry in eluates and sera from renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2003; 76: 395–400.
24. Zou Y, Heinemann FM, Grosse-Wilde H, et al. Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. *Hum Immunol* 2006; 67: 230–237.
25. Martin L, Guignier F, Bocrie O, et al. Detection of anti-HLA antibodies with flow cytometry in needle core biopsies of renal transplants recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2005; 79: 1459–1461.
26. Martin L, Charon-Barra C, Bocrie O, et al. Detection of plasma cells, C4d deposits and donor-specific antibodies on sequential graft biopsies of renal transplant recipients with chronic dysfunction. *Transpl Immunol* 2010; 22: 110–114.
27. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: Updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 8: 753–760.
28. Einecke G, Reeve J, Sis B, et al. A molecular classifier for predicting future graft loss in late kidney transplant biopsies. *J Clin Invest* 2010; 120: 1862–1872.
29. Sis B, Einecke G, Chang J, et al. Cluster analysis of lesions in nonselected kidney transplant biopsies: Microcirculation changes, tubulointerstitial inflammation and scarring. *Am J Transplant* 2010; 10: 421–430.
30. Sis B, Jhangri GS, Riopel J, et al. A new diagnostic algorithm for antibody-mediated microcirculation inflammation in kidney transplants. *Am J Transplant* 2012; 12: 1168–1179.
31. Bachelet T, Couzi L, Guidicelli G, et al. Anti-Cw donor-specific alloantibodies can lead to positive flow cytometry crossmatch and irreversible acute antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2011; 11: 1543–1544.
32. Tait BD, Susal C, Gebel HM, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 2013; 95: 19–47.
33. Duquesnoy RJ, Marrari M. Detection of antibodies against HLA-C epitopes in patients with rejected kidney transplants. *Transpl Immunol* 2011; 24: 164–171.
34. Jolly EC, Key T, Rasheed H, et al. Preformed donor HLA-DP-specific antibodies mediate acute and chronic antibody-mediated rejection following renal transplantation. *Am J Transplant* 2012; 12: 2845–2848.
35. Lefaucheur C, Antoine C, Suberbielle C, Glotz D. Mastering the risk of HLA antibodies in kidney transplantation: An algorithm based on pretransplant single-antigen flow bead techniques. *Am J Transplant* 2011; 11: 1592–1598.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

**Figure S1: Locus distribution of the HLA antigenic specificities targeted by the DSA detected into the graft eluate (A) or in the serum (B).** The locus distribution of the HLA specificities targeted by the DSA was not different between serum samples and biopsy eluates for the A, B, C, DR, DR51/52/53, DQ and DP loci ( $p = 0.93$ ).

**Table S1:** Distribution of the patients according to the presence or absence of anti-HLA Class I and/or Class II DSA in the serum or in the graft.