



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)



Présentée et soutenue par :

Arnaud Del Bello

le 16 Décembre 2021

Titre :

Caractériser l'épuisement lymphocytaire T global ou donneur-spécifique après transplantation rénale: analyse phénotypique et fonctionnelle

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Immunologie



Unité de recherche :

INFINITY: Institut Toulousain des maladies infectieuses et inflammatoires

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr Emmanuel TREINER

Jury :

Pr Nassim Kamar (Président)

Dr Nuala Mooney (Rapporteuse)

Pr Gilles Blancho (Rapporteur)

Pr Alexandre Hertig (Examinateur)

Dr Emmanuel Treiner (Directeur de Thèse)

Résumé

Caractériser l'épuisement lymphocytaire T global ou donneur-spécifique, après transplantation rénale : analyse phénotypique et fonctionnelle

L'utilisation d'une immunosuppression (IS) au long cours reste indispensable après transplantation, même si le phénotype des rejets se modifie avec le délai de greffe. Cependant, les complications liées à la sur-IS (néoplasies, infections...), ou sous-IS (rejet aigu ou chronique) réduisent toujours la survie des patients ou des greffons. Améliorer la compréhension des mécanismes lymphocytaires impliqués dans les modifications des réponses allo-spécifiques ou non spécifiques après greffe est importante pour individualiser la prescription des immunosuppresseurs et limiter leurs complications.

Une altération des fonctions lymphocytaires T peut survenir au cours des mécanismes allo-immuns, ou sous traitement immunosuppresseur au long cours. L'épuisement lymphocytaire T (ELT) caractérise un état de dysfonction affectant les lymphocytes T mémoires, dans des situations de stimulation chronique avec persistance de l'exposition à un antigène. Cet état est caractérisé par une baisse des capacités prolifératives ou fonctionnelles de ces cellules, et la co-expression de récepteurs inhibiteurs (RIs). Bien que des modèles murins aient récemment souligné le rôle de l'ELT dans le rejet de greffe, cet état dysfonctionnel reste peu étudié.

Dans une première étude, nous avons analysé l'expression de 3 RIs classiquement associés à l'ELT (2B4 (CD244), Programmed cell Death protein (PD)-1), et CD160, au cours du traitement par anti-PD1 (nivolumab) de 3 transplantés rénaux présentant une leucoencéphalopathie multifocale progressive. L'analyse des RIs dans les CD4+ et CD8+ a montré des taux élevés d'expression de 2B4, PD-1, et CD160 avant traitement, suggérant un ELT. Après traitement, seule l'expression de PD-1 diminuait, alors que les autres RIs n'étaient pas affectés par l'utilisation du traitement, suggérant la persistance de cet dysfonction lymphocytaire.

Par la suite, nous avons cherché par une étude transversale à caractériser l'ELT dans une population de patients exposés à de forts niveaux d'IS, les patients greffés avec anticorps spécifiques du donneur préformés (greffes HLA incompatibles, HLAi). Ces patients recevaient tous une induction par sérum anti-lymphocytaire et rituximab, ainsi qu'un traitement de maintenance par tacrolimus, acide mycophénolique, et corticoïdes. Afin de comparer l'expression des RIs (PD-1, Tigit, 2B4) et les capacités de production cytokinique (IFN γ , TNF α , IL2) de ces patients, nous avons utilisé un groupe de patients greffés en incompatibilité ABO (greffes ABOi) recevant un traitement d'induction et de

maintenance similaire, mais exposé à un antigène dont la réponse est T-indépendante. Nous avons pu observer une augmentation de la co-expression des récepteurs inhibiteurs dans le groupe de patients HLAi en comparaison aux patients ABOi. Particulièrement, Tigit présentait un niveau d'expression dans les CD4 et CD8 du groupe HLAi plus élevé comparativement aux ABOi. De plus, alors que Tigit était négativement corrélé aux capacités fonctionnelles des LT du groupe ABOi, toute corrélation était perdue dans le groupe HLAi. Ces données suggèrent que l'ELT au cours de la reconstitution lymphocytaire serait plus important après greffe HLAi, ce qui est cohérent avec le niveau élevé de complications infectieuses et néoplasiques décrites après ce type de greffe.

Dans une deuxième étude transversale portant sur des patients transplantés rénaux, libres de toute complication infectieuse, néoplasique, allo-immune, et sous traitement immunosuppresseur standard, nous avons montré une corrélation positive entre le délai de greffe et l'expression de Tigit dans les CD4 mémoires, alors que la proportion de cellules CD4+ TIGIT-CD226+ diminuait. L'analyse fonctionnelle de ces cellules nous a permis de montrer une dysfonction de l'axe Tigit/CD226 au cours du temps dans les CD4 mémoires. Dans les CD8 mémoires, nous avons pu montrer un profil dysfonctionnel de ces cellules, associé à une augmentation d'expression des cellules CD8+PD-1+Tigit+. La réponse allo-spécifique (approchée par réaction lymphocytaire mixte) était diminuée en comparaison à la réponse non-spécifique, et corrélée au pourcentage de cellules mémoires CD4+Tigit+CD226+Tim3-PD-1-2B4- avant stimulation.

Enfin, nous avons étudié les différences immunologiques T et B au cours de formes modérées et graves du COVID-19 chez des patients transplantés d'organe solide, et montré des différences immunologiques majeures au sein des différents compartiments entre les deux groupes.

Par ces différents travaux nous avons montré que l'ELT pourrait être impliqué dans la diminution progressive des rejets T-médiés après greffe. La caractérisation d'une signature d'ELT post greffe pour limiter les complications liées à l'IS paraît utile pour améliorer les résultats post-transplantation.

Abstract

Global and donor-specific T cell exhaustion after kidney transplantation: Phenotypic and functional analyses

Kidney transplantation requires the long-term use of immunosuppressive therapy (IT) even if a modification of rejections phenotype with time was previously noted. However, patient and graft survival remain entailed by over-IT (e.g cancer and infections), or under-IT (e.g acute or chronic rejections) complications. A better comprehension of immune mechanisms involved in changes concerning global or allo-specific responses is a key point to improve the individualization of IT and decrease IT-related complications.

Several dysfunctional states could occur during allo-immune response, or on long-term immunosuppressive therapy. T cell exhaustion (TCE) is a dysfunctional state affecting memory T cells during chronic stimulation due to the persistent exposure of a high load of foreign antigen. This state is characterized by a decrease proliferative capacity, reduced production of cytokines, and is associated with co-expression of inhibitory receptors (IRs) expression. Murine models of solid organ transplantation suggested a role for T cell exhaustion. However, until now this dysfunctional state is barely studied after transplantation.

We first analyzed the expression of 3 IRs classically associated with T cell exhaustion (2B4 (CD244), Programmed cell Death protein (PD)-1), and CD160), in 3 kidney transplant recipients treated with anti-PD1 (nivolumab) therapy for progressive multifocal leukoencephalopathy. Before treatment, we observed a high-level expression of IRs in both CD4 and CD8+ T cells, suggesting T cell exhaustion. After treatment, PD-1 expression, but not of others IRs, decreased, suggesting the persistence of this dysfunctional state, strengthened by the absence of clinical improvement.

We next investigated TCE in a cross-sectional study in a highly immunocompromised population, patients with preformed donor-specific antibodies (HLA incompatible, HLAi). All included patients received anti-lymphocyte globulins and anti-20 antibodies (rituximab), followed by a maintenance therapy (tacrolimus, mycophenolic acid, and steroids). We compared IRs expression (PD-1, Tigit, 2B4) and cytokine production (IFN γ , TNF α , IL2) of these patients to ABO incompatible recipients that received the same induction and maintenance therapy, but was exposed to a T-independent response antigen. We observed an increased co-expression of IRs in the HLAi group comparing with ABOi. Especially, Tigit expression was expressed in higher levels by CD4+ and CD8+ T

cells in HLAi comparing with ABOi. Moreover, while Tigit was as expected negatively correlated with functional capacities in ABOi patients, we did not observe any correlation between Tigit expression and function in HLAi recipients. These data suggest that TCE during reconstitution of HLAi patients would be more important than in ABOi recipients, which is consistent with the higher rate of infectious and neoplastic complications previously reported in this group.

Thereafter, we performed a second cross-sectional study a living-donor kidney transplant recipients, free from infectious, neoplastic, alloimmune complications, and receiving a standard immunosuppressive maintenance therapy (no induction, maintenance with tacrolimus, mycophenolic acid, steroids). We observed a positive correlation between time post transplantation and Tigit expression in memory CD4⁺ T cells, while the proportion of CD4⁺Tigit-CD226⁺ decreased. Functional analysis of these cells revealed a dysfunctional state of Tigit/ CD226 axis with time post transplantation in memory CD4. In memory CD8⁺ T cells, we observed a dysfunctional profile of these cells with time post transplantation, associated with an increased proportion of CD8⁺PD-1⁺Tigit⁺ cells. Donor-specific response, investigated by the mean of mixed lymphocyte reaction, was reduced comparing with third-parties responses, and was correlated to the percentage of CD4⁺Tigit⁺CD226⁺Tim3-PD-1-2B4⁻ before stimulation.

Finally, we studied T and B cells differences during moderate and severe forms of COVID-19 in solid organ transplant recipients. We observed accurate immunological differences between mild and severe forms (lower CD3⁺ and CD8⁺ T cells number, higher proportion of activated CD4⁺ T cells and lower proportion of regulatory T cells, NK cells, and transitional B cells in severe forms).

This work suggests that TCE could be involved in the progressive decrease of T cell rejection post transplantation. Characterizing a post-transplant TCE signature to reduce immunosuppression-related complication appears to be useful to improve post-transplant outcomes.

PLAN

I. Introduction : L'épuisement lymphocytaire T en transplantation rénale	
1. Problématique actuelle en transplantation rénale.....	1
2. Définition de l'épuisement lymphocytaire T.....	6
3. Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules présentant un épuisement lymphocytaire T	15
3.1 Altérations fonctionnelles.....	15
3.2 Expression simultanée de molécules inhibitrices	17
3.2.1 Les principaux récepteurs inhibiteurs	18
3.2.2 Régulation de l'expression des récepteurs inhibiteurs	23
3.2.3 Mécanismes de régulation négative	27
3.3 Perte de la capacité à survivre de manière indépendante de la présence de l'antigène.....	30
3.4 Altération du métabolisme cellulaire	30
3.5 Facteurs de transcription et modifications épigénétiques impliqués dans l'ELT	33
4. Epuisement lymphocytaire dans différentes situations cliniques	36
4.1 Epuisement lymphocytaire T dans les infections chroniques	36

- modèles murins	36
- au cours des infections chez l'homme	38
4.2 Epuisement lymphocytaire T en cancérologie	42
4.3 Epuisement lymphocytaire T en auto-immunité	45
4.4 Epuisement lymphocytaire T en transplantation d'organes solides	46
4.4.1 Epuisement lymphocytaire T dans les modèles murins	47
4.4.2 Epuisement lymphocytaire T en transplantation chez l'homme	50
4.4.3 Evaluation de l'ELT chez l'homme : contexte spécifique de la transplantation rénale	52
4.4.3.1 Identification des cellules la réponse allo-spécifique	53
4.4.3.1 Rôle du traitement immunosuppresseur	56

I. Introduction :

Epuisement lymphocytaire T en transplantation rénale

1. Problématique actuelle en transplantation rénale

La transplantation rénale représente le traitement de référence de l'insuffisance rénale chronique au stade ultime¹. Les progrès réalisés dans la gestion des immunosuppresseurs ces 30 dernières années ont considérablement amélioré le pronostic à long terme des patients transplantés^{2,3}. Toutefois, la gestion de l'immunosuppression délivrée au patient est très imparfaite. Celle-ci est guidée par une évaluation du risque du rejet, elle-même basée sur les antécédents du patients et des cibles globales issues d'études de cohortes³. Les complications liées à la sur-immunosuppression (infections et néoplasies) représentent toujours une cause majeure de décès après greffe, alors que d'autres patients recevant une immunosuppression dans les cibles usuelles, vont présenter des complications de sous-immunosuppression (rejet de greffe)⁴. Il est donc important de développer des outils permettant une meilleure évaluation du niveau d'immunosuppression présenté par chaque patient au fil du temps post greffe.

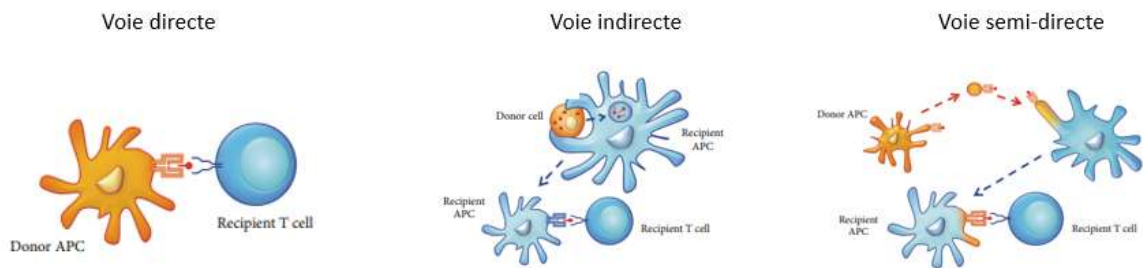
L'individualisation de la prescription des immunosuppresseurs, afin de réduire le risque de rejet passe par une meilleure connaissance de la réponse allo-immune. Les mécanismes en jeu dans la menace immunologique sur le greffon rénal impliquent l'ensemble du système immunitaire, et commencent avant même l'implantation du greffon par les mécanismes inflammatoires liés à la mort cérébrale du donneur et au prélèvement⁵. Les

DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) sont issus de molécules intra-cellulaires (High Mobility Group Box protein-1, Heat Shock Protein ou purines, habituellement cachées au système immunitaire) libérées dans la circulation par les agressions cellulaires, mais aussi provenant de produits de dégradation de la matrice extra-cellulaire (fragments de fibronectine, biglycane, héparine sulfate, hyaluronanes) induits par l'inflammation⁶. L'interaction des DAMPs avec de multiples Toll-Like Récepteurs (TLRs), exprimées par les cellules dendritiques permet une maturation et une activation de ces cellules ⁷. L'activation du système immunitaire inné va ensuite entraîner l'activation du système immunitaire adaptatif et ainsi amplifier l'inflammation et les lésions rénales de rejet⁷. D'autre part, le système du complément est activé, par la production locale de C3a et C5a qui ont la capacité d'activer les cellules présentatrices d'antigène^{8,9}. Certaines molécules du complexe majeur d'histocompatibilité comme les protéines MICA (Major histocompatibility complex Class-I peptide-related sequence A) présentent également une augmentation de leur expression à la surface des cellules endothéliales, ce qui peut directement activer les cellules NK ¹⁰.

L'immunité adaptative joue un rôle majeur dans le rejet de greffe. Quatre voies de reconnaissance allogénique sont décrites : directe, directe inversée, indirecte, et semi-directe (Figure 1). Dans la voie directe, les cellules T du receveur reconnaissent des épitopes du greffon via les molécules HLA intactes à la surface des cellules présentatrices du donneur. Tout récemment, a été décrit dans un modèle murin, une nouvelle voie de reconnaissance où les lymphocytes T du donneur pourraient directement interagir avec les lymphocytes B allospécifique du receveur via les molécules HLA de classe II, et ainsi entraîner la production d'anticorps spécifiques du donneur¹¹. Dans la voie indirecte, des peptides issus du donneur (le plus souvent issues des molécules HLA polymorphiques), sont présentés par les molécules HLA portées par des cellules présentatrices d'antigène du receveur. Dans la voie semi-directe, la

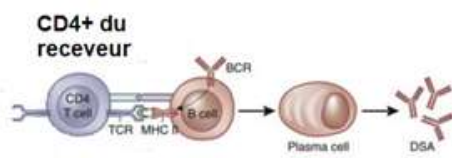
réponse allo-immune est initiée suite à la reconnaissance par un lymphocyte T du receveur, d'un complexe HLA du donneur porté par une cellule présentatrice d'antigène du receveur. Le mécanisme par lequel une cellule présentatrice du receveur porte une molécule HLA du donneur, passerait par les vésicules extra-cellulaires. L'importance de cette voie de reconnaissance allo-immune a été soulevée par des modèles murins, dans le rejet aigu précoce¹².

Figure 1. Les différentes voies de reconnaissance HLA allogéniques.

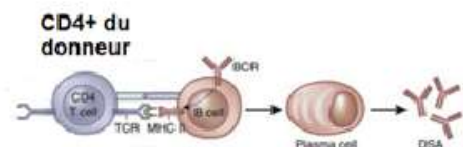


D'après Ruiz D, J Immunol Res 2013

Reconnaissance indirecte



Reconnaissance directe inversée



Bien que la voie directe ait été longtemps considérée comme prépondérante dans les rejets aigus des premiers jours post greffe, et la voie indirecte vue comme principale dans le rejet chronique, les études les plus récentes suggèrent que ces différentes voies pourraient persister tout au long de la greffe¹³. Le rejet aigu précoce est principalement conduit par les lymphocytes T cytotoxiques CD8+. Une fois activés, ces cellules peuvent cibler toutes les cellules du donneur via leur reconnaissance allogénique du CMH de classe I. Les CD4+ jouent un rôle d'assistant à l'activation des CD8+. La voie de reconnaissance indirecte des CD8+ semble peu pertinente en transplantation d'organes solides, et concerne surtout les modèles de rejets de peau¹⁴. Les modèles murins ont montré que la voie indirecte CD4+ peut être rapidement impliquée dans les rejets post greffe¹⁵, possiblement sans l'intervention des CD8+. Le rôle primordial dans le rejet des CD4+ passe par cette voie indirecte, permettant le développement d'une réponse B efficace (contribution à la commutation de classe des Ig) et ainsi le rejet anticorps médié. Ainsi, les rejets tardifs T médiés ainsi que les rejets anticorps médiés (aigus et chroniques, sans anticorps anti-HLA préformés) sont très largement médiés par la voie de reconnaissance indirecte des CD4+ dont les cibles sont les incompatibilités donneur/receveur des complexes majeurs et mineurs d'histocompatibilité¹⁶. Le rôle de l'activation CD4+ par la voie directe semble limité aux premières semaines post greffe, et corrélé à la durée de vie des fractions de cellules dendritiques du donneur^{17,18}. Par la suite, cette voie directe d'activation CD4+ laisserait la place à la reconnaissance de l'alloantigène porté par des cellules présentatrices du receveur (voie semi-directe, où les cellules présentatrices acquièrent la capacité à exprimer cet alloantigène via transfert de vésicules extra-cellulaires issues du donneur)¹⁹.

Le profil des rejets rencontrés évolue avec le délai de greffe. Alors que le rejet aigu T médié est majoritaire dans les premières semaines suivant la transplantation, son incidence diminue et devient extrêmement faible après quelques années. A l'inverse le rejet chronique médié par anticorps augmente progressivement pour devenir le diagnostic principal évoqué sur les biopsies réalisées pour dysfonction du greffon tardivement après la greffe^{20,21}. A ce jour, les mécanismes mis en jeu dans la modification phénotypique du rejet au cours du temps restent inconnus.

Nous avons posé l'hypothèse du développement d'un épuisement lymphocytaire T dans les modifications de l'allo-réactivité post greffe.

2. Définition de l'épuisement lymphocytaire T

L'épuisement lymphocytaire T (ELT) est un état dysfonctionnel concernant les cellules T effectrices, caractérisé par une diminution de leur capacité fonctionnelle, des capacités prolifératives, ainsi que par la co-expression de récepteurs inhibiteurs^{22,23}. En cela, l'ELT diffère des autres états dysfonctionnels classiquement décrits : la senescence cellulaire T est associée à un phénotype inflammatoire, une très faible prolifération, une production de médiateurs cytotoxiques importante, associée à une expression de récepteurs des cellules NK leur permettant de répondre au-delà de leur spécificité antigénique²⁴; l'anergie survient lorsque les cellules T naïves sont stimulées par de faibles signaux de co-stimulation, ou par de forts signaux co-inhibiteurs, et produisent peu ou pas d'IL-2 en réponse aux stimulations ultérieures²⁵ (Table 1).

Table 1. Présentation des causes, aspect fonctionnel et phénotypique associées à différents états dysfonctionnels (épuisement lymphocytaire, anergie, sénescence)

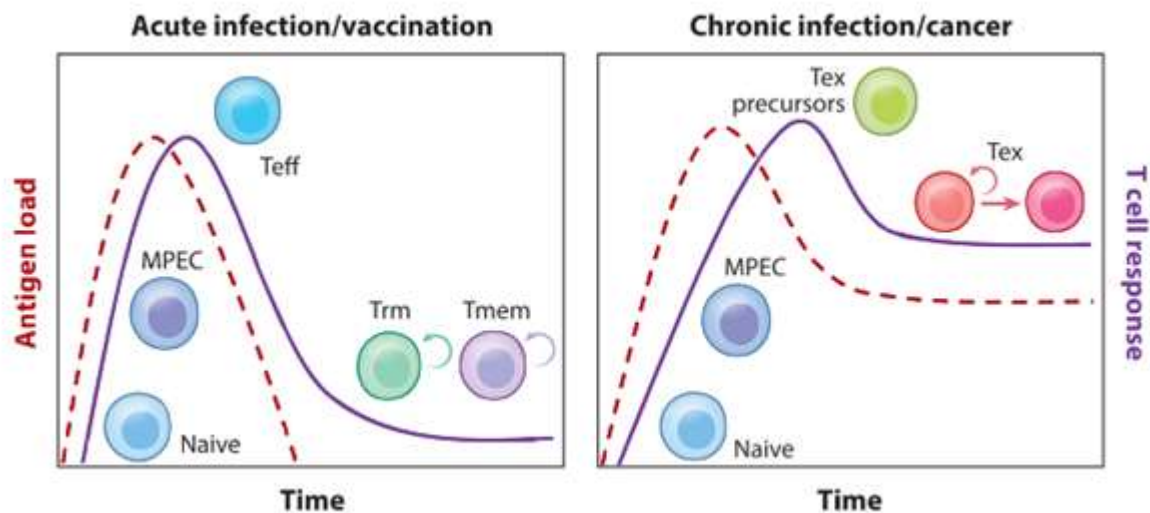
	Etat lymphocytaire dysfonctionnel		
	Epuisement	Anergie	Senescence
Cause	Persistance antigénique Environnement riche en IL-10, TGF- β ²²	Activation du premier signal, sans signal positif de costimulation suffisant, ou avec signal inhibiteur important ²⁵	Réduction des télomères suite à une prolifération excessive, ou à des lésions de l'ADN ^{25,26}
Fonction	Prolifération diminuée Moindre production de cytokines effectrices ²²	Prolifération diminuée Moindre production de cytokines effectrices (IL-2 au premier plan) ²⁵	Arrêt du cycle cellulaire Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (ex IL-1, IL-6, IL-8) ²⁵
Phénotype	Augmentation de l'expression de récepteurs inhibiteurs (ex PD-1, TIGIT, 2B4) ²²	Augmentation de CD73, LAG3, NRP1, 4-1BB, FR4 ²⁵	Augmentation de CD57, KLRG1, Tim-3 Diminution de CD27, CD28 ²⁵
Description en pratique clinique	- Infections virales chroniques	- Cancer ²⁵ <i>(rôle néfaste, favorise l'échappement immunologique)</i>	- Cancer <i>(rôle néfaste, favorise l'échappement immunologique)²⁵</i>

	<p><i>(contrôle de la charge virale sans disparition complète de celle-ci)²⁷</i></p> <p>- Cancer</p> <p><i>(pronostique plus sombre si ELT des lymphocytes infiltrant les tumeurs)²⁸</i></p> <p>- Maladies auto-immunes</p> <p><i>(pronostique meilleur si ELT avant tout traitement)²⁹</i></p> <p>- Transplantation</p> <p><i>(pronostic meilleur ?)³⁰</i></p>	<p>- Maladies auto-immunes</p> <p><i>(prévient leur développement)²⁵</i></p> <p>- Transplantation</p> <p><i>(induction et maintien de tolérance)³¹</i></p>	<p>- Transplantation</p> <p><i>(rôle néfaste, majoration du risque de rejet)³²</i></p>
--	---	--	---

Une charge antigénique élevée et persistante est considérée comme nécessaire au développement de l'ELT (Figure 2). Les différences de réponse antigénique, et de microenvironnement, n'ont pas permis jusqu'à présent d'établir une signature universelle d'ELT, ce qui oblige à l'étudier de manière ciblée sur chaque situation²³. L'ELT ne reflète pas une cellule non fonctionnelle, mais plus un processus de différenciation lymphocytaire T permettant de s'adapter et d'ajuster la réponse immunitaire à la nécessité d'une stimulation chronique³³. Outre la persistance de l'antigène, un état d'inflammation chronique amenant à un environnement riche en IL-10 ou en TGF- β favorise le développement de l'ELT (et à l'inverse, l'IL-2 ou l'IL-21 freine son développement)²⁸. De plus, l'adénosine ou la prostaglandine E2 favorisent également l'ELT²⁸.

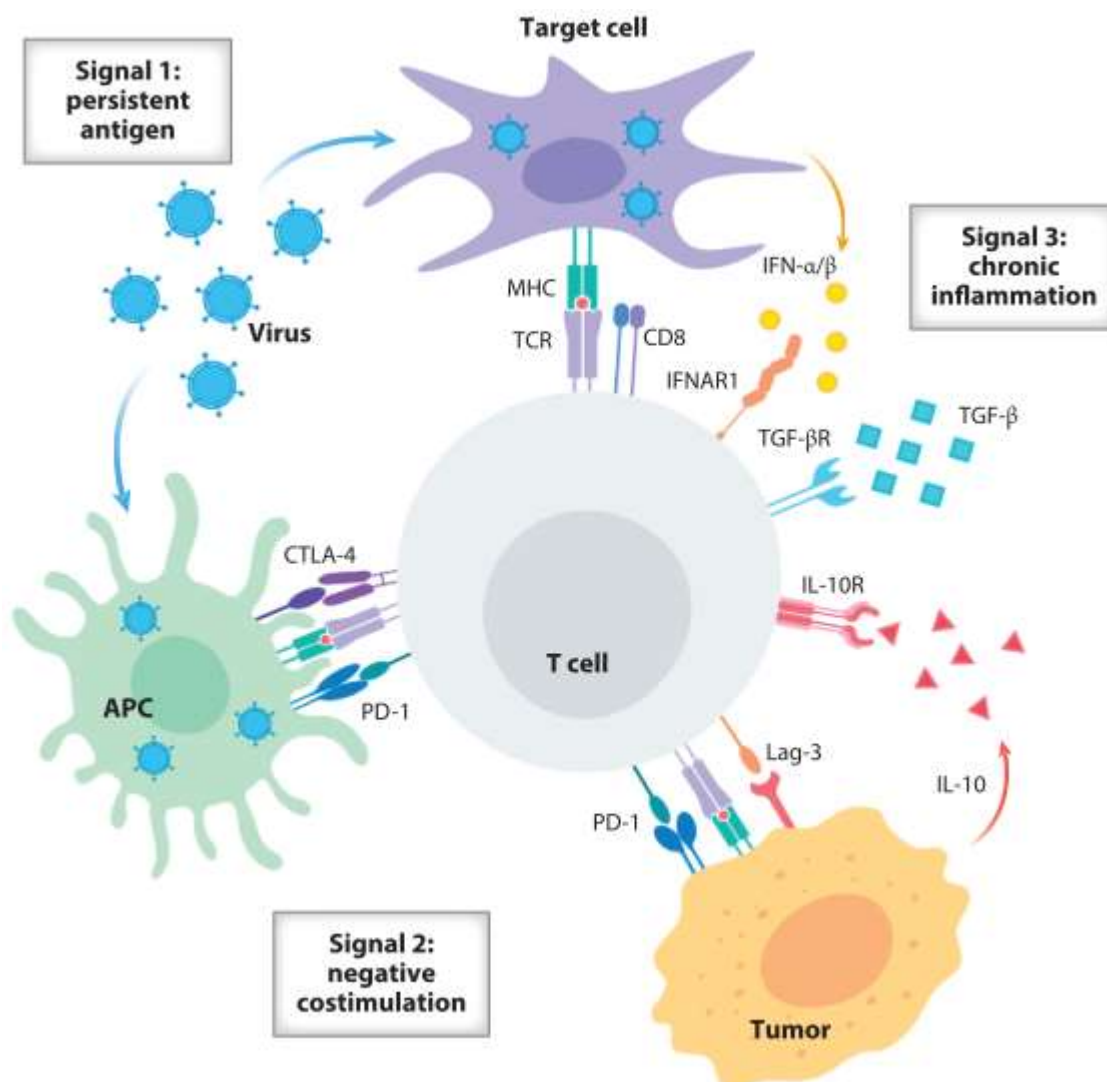
Figure 2 A-C. Développement de l'épuisement lymphocytaire T CD8+ au cours d'une stimulation antigénique chronique.

2A, gauche : Dans le cas d'une stimulation aiguë résolutive, après stimulation antigénique et activation du TCR, les cellules T CD8+ se différencient en cellules T CD8+ mémoire précurseur (MPEC) puis en T effectrices (Teff) ; la résolution de l'infection entraîne la disparition d'une grande partie des cellules T effectrices, les cellules restantes se différenciant en T résident mémoires (situées dans les différents organes d'intérêt), ou T mémoires patrouillant dans le système circulant, prêt à monter une nouvelle réponse en cas de ré-exposition à l'antigène. A droite, dans le cadre d'une stimulation chronique (infection, cancer), l'absence de contrôle total de l'infection par les T effecteur entraîne le développement de T épuisés au stade précoce qui progressivement vont acquérir un phénotype T épuisé terminal, non réversible.



D'après McLane et al, Annu Rev Immunol 2019

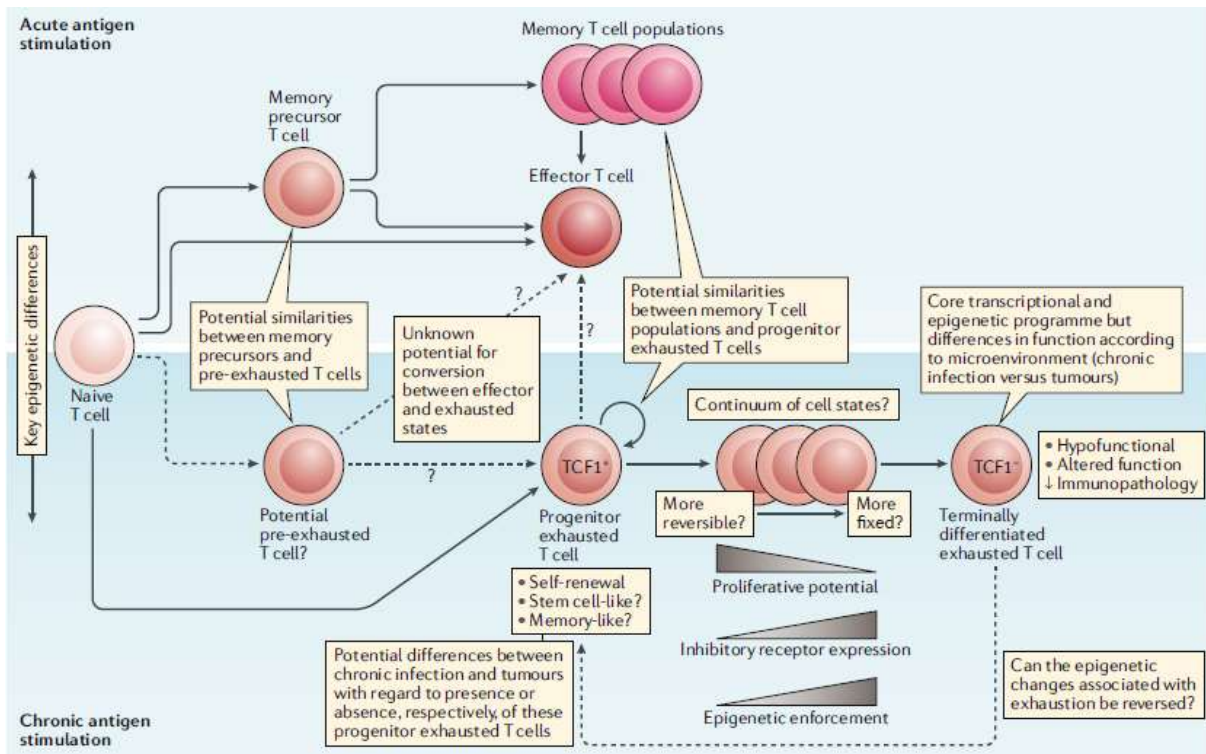
2B Trois signaux sont nécessaires au développement de l'épuisement lymphocytaire T. La persistance de l'antigène amène à une reconnaissance et activation continue par le TCR (signal 1), activation menant à une co-expression de multiples molécules d'inhibition, se liant à leurs ligands portés par les cellules présentatrices potentiellement infectées ou par les cellules cancéreuses (signal 2). Cette liaison entraîne une activation sous optimale lymphocytaire T. La présence de cellules infectées de manière chronique crée un microenvironnement inflammatoire responsable de la sécrétion par les cellules immunitaires et cellules présentatrices de TGF β et IL-10 (signal 3) qui vont participer au développement de signaux d'inhibition, et de l'épuisement.



D'après McLane et al, Annu Rev Immunol 2019

2C. Dans les premiers stades, l'épuisement lymphocytaire est considéré comme réversible.

Les cellules progénitrices épuisées TCF1⁺ présentent des similarités phénotypiques avec les cellules T mémoires. Plus la charge antigénique se maintient, plus le développement d'un épuisement terminal se constitue, avec la mise en place d'un programme épigénétique moins réversible.



D'après Blank et al, Nature 2019

Le concept d'épuisement lymphocytaire est issu des travaux portant sur les souris infectées de manière chronique par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV, clone 13), montrant in vitro la diminution des capacités d'expansion des cellules T spécifiques, au fil du temps³⁴. Cependant l'exploration plus fine de cet état a permis de montrer qu'il regroupe des états cellulaires très hétérogènes³³. Au cours d'une infection chronique, un continuum de différents états d'ELT pourront être décrits, de moins en moins réversibles au fil de l'évolution²³. L'expression du facteur de transcription T-Cell-Differentiation (TCF)-1, est considérée comme majeure pour différencier les cellules épuisées dans une phase précoce (TCF-1+) des cellules épuisées de manière irréversible (TCF1-)³⁵. A noter que le stade ultime de l'ELT est parfois représenté par la délétion physique (exemple du modèle LCMV chez la souris, pour la réponse spécifique CD8+ spécifique DbNP396- and KbGP34)³⁶.

L'ELT reste très majoritairement décrits dans les populations T CD8+²⁸. Toutefois, une lymphopénie CD4+ favorise l'ELT des CD8+, laissant supposer un rôle de régulation des CD4+ sur le développement de CD8+ au stade terminal de l'ELT²². Le rôle des LT helpers semble également différent lorsque l'antigène persiste. Alors que dans les contextes d'infection aiguë, les T helpers sont indispensables à l'obtention de LT mémoires, mais semblent peu impacter l'émergence de T effecteurs, la situation s'inverse en situation chronique où les progéniteurs ne sont pas altérés par la déplétion CD4+ à la différence des cellules en différenciation terminale³⁷. De plus, un phénotype CD4+ exprimant de nombreux récepteurs inhibiteurs, associé à une moindre production cytokinique, a été décrit aux cours d'infections chroniques³⁸⁻⁴⁰, plaidant pour la survenue également d'un épuisement CD4+ et CD8+. A noter également qu'un phénotype dysfonctionnel de T régulateurs a également été associé à des évolutions plus sévères au cours des pathologies chroniques virales ou néoplasiques⁴¹.

Toutefois, la possibilité d'appliquer les mêmes critères pour définir l'ELT CD4+ ou CD8+ reste encore incertain.

3. Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules présentant un ELT

Quel que soit leur stade, les cellules épuisées ne sont toutefois pas considérées comme inertes, et conservent les fonctions sous-optimales, mais cependant primordiales pour le maintien d'une activité anti-virale, ou antinéoplasique par exemple²². Les caractéristiques de l'ELT se développent de manière hiérarchique.

3.1 Altération fonctionnelle

L'altération des capacités fonctionnelles est une des premières caractéristique à se développer au cours de l'ELT²². Dans les lymphocytes T CD8+, pour lesquels le phénomène est le mieux décrit, la perte des capacités de production de l'IL-2 est précoce, suivie par la perte de production du TNF α ^{42,43}. L'ELT entraîne ainsi une diminution des capacités de prolifération après stimulation, spécifique ou non-spécifique⁴⁴. La perte de production de l'IFN- γ intervient à un stade plus tardif correspondant au stade terminal de l'ELT⁴³. Par ailleurs, l'ELT CD8+ se caractérise par une perte de la polyfonctionnalité en réponse à un stimulus chronique⁴⁵. Les capacités cytotoxiques persistent jusqu'à des stades avancés d'ELT (Table 2), et même au stade terminal, les cellules épuisées conservent des capacités de dégranulation^{44,46}.

Table 2. Perte hiérarchique des fonctions inflammatoire, prolifératives, cytotoxiques et majoration de l'apoptose durant le développement de l'épuisement lymphocytaire T CD8+

IFN γ	TNF α	IL-2	Perforine-Granzyme	Capacités prolifératives	Apoptose	Différenciation vers un ELT irréversible ↓
+++	++	+/-	++	++	-	
++	+	-	+	+	-	
+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	
+/-	-	-	-	-	++	
					+++	

D'après Wherry EJ, Nat Rev Immunol 2011

Abbreviations: IFN γ , Interferon gamma; TNF α , Tumor-Necrosis Factor alfa; IL-2, Interleukine 2; ELT, Epuisement lymphocytaire T.

3.2 Expression simultanée de molécules inhibitrices

Une co-expression intense et soutenue de récepteurs inhibiteurs est considérée comme la deuxième caractéristique à apparaître. Ces molécules, également nommées inhibiteurs du « points de contrôle » (checkpoint) immunitaire, assurent la régulation négative des différentes capacités fonctionnelles et prolifératives du lymphocyte T. Au cours d'une infection aiguë, l'expression des récepteurs inhibiteurs est transitoire durant l'activation T, afin de jouer leur rôle de « frein immunologique », et ce jusqu'à disparition de l'antigène. A l'inverse, les cellules présentant un ELT co-expriment de manière intense et persistante une large gamme de récepteurs inhibiteurs. Parmi ces molécules inhibitrices, certaines semblent particulièrement importantes, car exploitées par des virus ou certaines cellules néoplasiques pour échapper au système immunitaire.

De plus, certains récepteurs inhibiteurs (comme Tim-3, TIGIT, CTLA-4, NRP-1, ou PD-1) sont exprimés de manière préférentielle par les lymphocytes T régulateurs. Plusieurs observations permettent d'étayer le rôle majeur que jouent ici les récepteurs inhibiteurs. D'une part CTLA-4 et TIGIT sont des cibles transcriptionnelles de FOXP3⁴⁷. D'autre part, PD-1, TIGIT et NRP1 sont capables de réprimer la voie PI3K/AKT/mTOR, contribuant ainsi à la stabilité de fonction des lymphocytes T régulateurs⁴⁸⁻⁵⁰. La dérégulation d'expression de ces récepteurs dans les T régulateurs au cours des pathologies auto-immunes et des cancers reflète leur importance concernant le maintien de T régulateurs efficaces.

3.2.1 Les principaux récepteurs inhibiteurs

a) Programmed- cell Death (PD) -1 est exprimée par les lymphocytes T, B, NK, mais aussi par les monocytes. Il joue un rôle important dans l'inhibition de la sélection positive thymique⁵¹, ainsi que dans la tolérance périphérique⁵². PD-1 favorise l'induction de T régulateurs in vitro⁴⁸. Les souris déficientes en PD-1 peuvent développer des maladies auto-immunes tardives comme des atteintes arthritiques et rénales proches du lupus⁵³, ainsi que des cardiopathies dilatées auto-immunes⁵⁴ selon leurs caractéristiques génétiques. Deux ligands de PD-1 sont connus: PD-L1 (dont l'expression est inductible dans une grande variété de tissus hématopoïétiques ou non, dont l'endothélium vasculaire, et les cellules épithéliales) et PD-L2 (exprimé de façon plus restreinte par les cellules dendritiques, macrophages, les cellules mastocytaires dérivées de cellules souches hématopoïétiques, certains sous-types de lymphocytes B péritonéaux, ainsi que les cellules B du centre germinatif)⁵⁵. Les souris déficientes en PD-L1 et PD-L2 ne présentent pas d'atteinte spécifique. Cependant, les déficits en PD-L1 sont associés à une exacerbation de la maladie dans les modèles d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale⁵⁶, ainsi qu'à une diminution de la tolérance foeto-maternelle⁵⁷. Bien que PD-L1 et PD-L2 partagent PD-1 comme ligand, PD-L1 peut également lier le CD80 (B7-1) (lorsque les 2 molécules sont exprimées par la même cellule, en cis), aboutissant à un moindre signal négatif (1) par compétition vis-à-vis de la liaison avec PD-1, ou (2) lorsque PD-L1 et B7-1 lient le CD28, aboutissant à un signal positif⁵⁸. PD-L2 présente une affinité environ 3 fois supérieure à PD-L1 pour PD-1, mais sa faible expression contrebalance cet avantage d'affinité⁵⁸. La voie classique de liaison entre PD-1 et PD-L1 est une trans-activation (PD-1 exprimé par un lymphocyte T activé, alors que PD-L1 est exprimé par une cellule tumorale ou

une cellule présentatrice d'antigène). Il est également possible en contexte tumoral d'obtenir une cis-activation (lorsque PD-1 et PD-L1 sont exprimés simultanément par les cellules présentatrices ou cellules tumorales). Le développement d'antagonistes de la voie PD-1 /PDL1 ou 2 a permis des avancées majeures dans le traitement de certains cancers comme le mélanome⁵⁹.

b) 2B4 (également appelé CD244) est exprimé par les cellules T, NK et les monocytes. Un seul ligand lui est connu, le CD48 (exprimé de manière constitutionnelle par les cellules hématopoïétiques, mais dont l'expression peut augmenter au cours d'infections, cancers, ou d'allergies). Cette voie a particulièrement été étudiée dans les infections virales⁶⁰. L'expression du CD48 augmente sur les cellules B durant une infection à EBV⁶¹. Le rôle de cette voie de contrôle de la réponse immunitaire a pu être mis en évidence par l'étude de patients atteints du syndrome lymphoprolifératif de type 1 lié à l'X (mutation SH2D1A, codant pour l'adaptateur majeur SAP pour la signalisation 2B4 dans les cellules NK), dans lequel le défaut d'activation des cellules NK entraîne un défaut de cytotoxicité envers les cellules infectées par l'EBV⁶².

c) Tim-3 (T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3) est exprimé par les lymphocytes, les cellules NK, macrophages et cellules dendritiques²⁸. Ce récepteur peut lier la Galectin-9 et inhiber la réponse T⁶³. Cette liaison entre en compétition avec BAT3 qui diminue l'action de Tim-3⁶⁴. Chez l'homme les T régulateurs n'expriment Tim-3 qu'après activation. L'expression de Tim-3 par les T régulateurs semble associée à des fonctions immunosuppressives des réponses Th1 et Th17 supérieures aux lymphocytes T régulateurs n'exprimant pas Tim-3⁶⁵. Le rôle de Tim-3 a été principalement étudié dans les infections

virales chroniques comme le VIH⁶⁶. Toutefois ce récepteur inhibiteur a récemment montré son intérêt en cancérologie. Les souris déficientes en Tim-3 présentent une évolution plus favorable de leur néoplasie associée à une diminution du taux de lymphocytes T régulateurs⁶⁷. De plus Tim-3 pourrait être utilisé comme biomarqueur de résistance à une monothérapie par anti-PD-1⁶⁸. Cette molécule est également vue comme une potentielle cible thérapeutique (principalement dans le mélanome, le cancer du poumon ou encore le lymphome B folliculaire) en association à un agent inhibiteur de la voie PD-1⁶⁹.

d) LAG-3 (Lymphocyte activation gene 3) est une molécule exprimée par les lymphocytes T (conventionnels et T régulateurs), B et les NK²⁸, présentant une forte homologie avec le CD4. Comme le CD4, LAG-3 peut lier les molécules de CMH de classe II⁷⁰. Cependant de nombreuses études murines ont montré l'effet inhibiteur de la réponse T⁷¹. Le blocage concomitant de LAG-3 et PD-1 semble une voie prometteuse dans la stratégie thérapeutique anticancéreuse^{27,72}.

e) Le CD160 est exprimé à la surface des lymphocytes T (CD4+ et CD8+) et des cellules NK²⁸. Les voies de signalisation intracellulaire de ce récepteur restent mal connues. Le CD160 est modérément exprimé par les CD8+ (jusqu'à 40%), et par un faible pourcentage de CD4+ (environ 5%), mais ce pourcentage augmente, in vitro, aux temps tardifs après stimulation⁷³. La liaison du CD160 au CMH de classe I (classique et non classique) entraîne une majoration de l'activation T⁷⁴. Cependant la liaison du CD160 au HVEM inhibe la réponse T⁷³. HVEM peut lui-même également lier le récepteur activateur LIGHT⁷⁵. Le rôle du récepteur LIGHT a été suggéré dans un modèle de greffe cardiaque par une augmentation de survie chez les souris déficientes en ce récepteur⁷⁶. De plus, la liaison compétitive du CD160 au HVEM vis-à-vis du

récepteur activateur permet d'atténuer la réponse T⁷⁵. Les souris déficientes en HVEM présentent une susceptibilité accrue aux pathologies auto-immunes comme l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale⁷⁷.

f) Le CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Activated protein 4) est une molécule homologue au CD28, exprimée par les lymphocytes T (CD4+ et CD8+), mais exerçant des fonctions opposées. CTLA-4 lie le CD80 et CD86 (portées par les cellules B ou les cellules dendritiques), avec une plus grande affinité que le CD28. A l'inverse de ce dernier, l'interaction du CTLA-4 avec ses ligands entraîne une inhibition de la réponse T. Cette fonction inhibitrice de la réponse T se fait de manière directe, par compétition avec le CD28 (en liant les récepteurs CD80 et CD86), mais aussi par voie intracellulaire, via sa portion intracytoplasmique, activant la serine/threonine phosphatase PP2A et interférant ainsi avec la voie de la PI3K⁷⁸. Le rôle critique du CTLA-4 en tant que régulateur négatif de la réponse T, s'illustre par l'observation des souris déficientes en CTLA-4, qui meurent précocement de complications inflammatoires et de maladies lymphoprolifératives^{79,80}. Alors que le CD28 est constitutivement exprimé par les cellules T, le CTLA-4 est retrouvé à plus de 90% dans les vésicules intracellulaires des lymphocytes T régulateurs et des T conventionnels activés (en raison de l'endocytose du CTLA-4 à partir de la membrane cellulaire)⁸¹. Le cycle d'internalisation constante du CTLA-4 est principalement sous la dépendance du complexe d'adaptation AP2 à la clathrine, et permet son recyclage vers la membrane ou sa dégradation dans les lysosomes. Cette internalisation, puis dégradation du CTLA-4 permet également une élimination physique des ligands du CTLA-4 sur les cellules présentatrices d'antigène (procédé de transendocytose)⁸². L'importance de ce cycle a récemment été mise en évidence par l'identification de patients avec mutation du

gène LRBA (Lipopolysaccharide Responsive and Beige-Like Anchor protein), associé au développement d'un déficit immunitaire commun variable, dans lequel les cellules des patients présentent une augmentation de la dégradation du CTLA-4 (inhibition du recyclage du CTLA-4), amenant à des taux réduits de CTLA-4 dans les T régulateurs et les T conventionnels⁸³. Il a également été montré que CTLA-4 empêchait la délétion des T régulateurs dans le thymus et favorisait leur réponse suppressive de contact^{82,84}.

g) TIGIT (T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains) est une molécule inhibitrice principalement exprimée par les lymphocytes (T, B NK). Plusieurs ligands lui sont connus, principalement CD112 (dont l'expression est ubiquitaire) et surtout le CD155 (exprimé par les T, B, macrophages, et tissus non hématopoïétiques comme les reins, les cellules du système nerveux central et le tissu digestif), qui est son principal ligand⁸⁵. De plus TIGIT entre en compétition pour la liaison au CD155 avec le CD226 (puissant régulateur positif de l'activation T), mais aussi avec le CD96 (régulateur négatif de l'activation T)⁸⁵. Les mécanismes d'action de TIGIT sont multiples : d'une part la liaison de TIGIT et du CD155 induit un phénotype tolérogène des cellules dendritiques ainsi que des macrophages par production d'IL-10 et une diminution d'IL-12, entraînant une régulation négative lymphocytaire T (voie extracellulaire)⁸⁶. D'autre part, TIGIT induit une régulation négative T par voie intracellulaire, par compétition de liaison du CD155 avec son récepteur activateur le CD226, ainsi qu'en perturbant la cis-homodimérisation du CD226⁸⁷. TIGIT peut exercer directement son effet inhibiteur par signalisation intracellulaire via son domaine ITIM⁸⁸. Enfin TIGIT joue un rôle primordial dans les lymphocytes T régulateurs. TIGIT empêche la plasticité des T régulateurs⁵⁰ (c'est à dire la perte des capacités suppressives, au profit d'un profil pro-inflammatoire, via son rôle inhibiteur sur la voie PI3K), tout comme NRP1⁴⁹. De plus, les lymphocytes T

régulateurs exprimant TIGIT sont capables d'inhiber les réponses Th1 et Th17 (mais pas les réponses Th2), et sécrètent des quantités plus importantes de molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le Fgl2 (Fibrinogen-like protein 2), que les lymphocytes T régulateurs n'exprimant pas TIGIT^{89,90}. Dans les modèles murins, les souris TIGIT^{-/-} présentent une activation excessive après stimulation antigénique⁹⁰. Une augmentation de l'expression de TIGIT dans les lymphocytes infiltrant les tumeurs a également été décrite pour de nombreux cancers⁹¹, et des essais sur le blocage de TIGIT ont débuté. Plus récemment, une dysrégulation de l'axe TIGIT/CD226 a été mise en évidence dans certaines pathologies auto-immune comme le lupus, ou la dermatopolymyosite⁹².

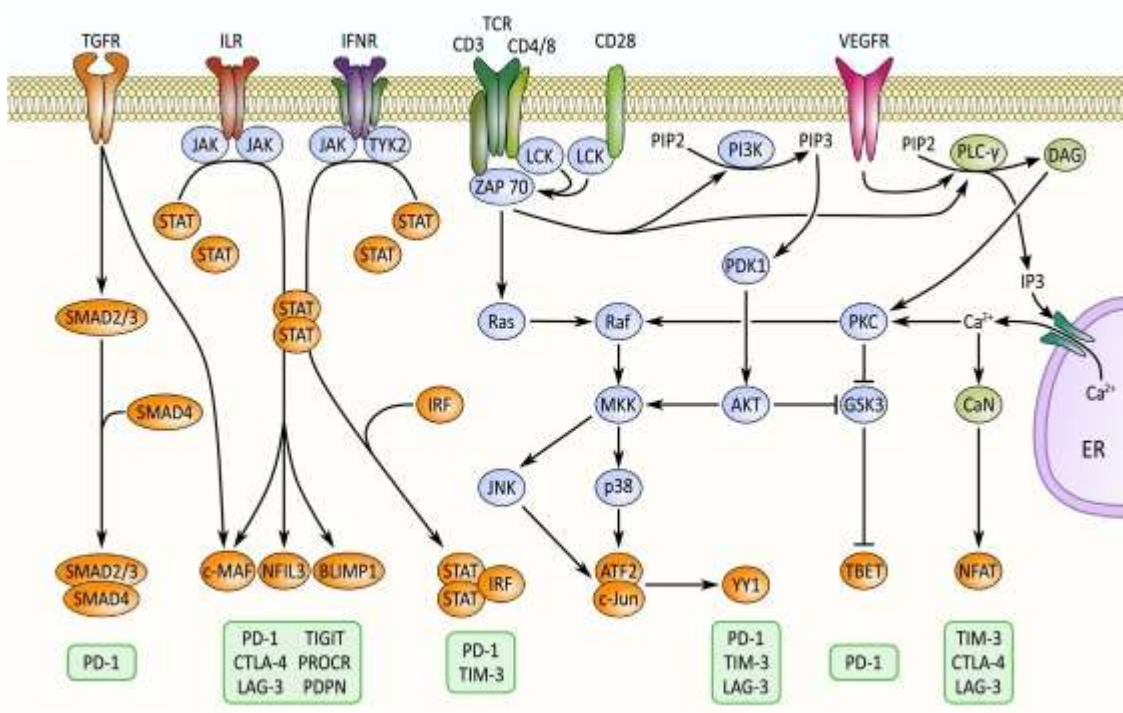
D'autres récepteurs inhibiteurs ont été décrits, par exemple, 4-1-BB, KLRG1, VISTA, FCγRIIB (décrits dans²⁸).

3.2.2 Régulation de l'expression des récepteurs inhibiteurs

L'expression de ces récepteurs passe par des voies et mécanismes de régulation différents, parfois multiples pour un même récepteur (Figure 3). Tout d'abord, certains récepteurs sont activés en « rétro-contrôle » par l'activation du TCR et de son corécepteur CD28. C'est ainsi le cas pour PD-1. Taylor et collègues⁹³ ont montré qu'après activation T par la voie du TCR et du CD28, une phosphorylation de la protéine glycogène synthase kinase (GSK) 3 induit son inactivation. Cette phosphorylation passe par la voie PI3K/AKT. La glycogène synthase kinase est une sérine/thréonine kinase qui contrôle le facteur de transcription Tbx21 (régulant T-bet), lui-même régulant la transcription du gène PDCD1 codant pour PD-1. D'autres voies de régulation ont été décrites pour PD-1, partagées par d'autres récepteurs

inhibiteurs. Balkhi et collègues⁹⁴ ont montré qu'après activation du TCR et du CD28, la voie p38/MAPK/JNK était activée par phosphorylations successives, aboutissant à l'activation du complexe c-Jun/ATF2, puis Yin-Yang 1 (YY1) elle-même régulant l'expression de PD-1, LAG-3 et Tim-3. PD-1 et Tim-3 sont également sous la dépendance de certaines cytokines, principalement IL-2, IL-7, IL-15, et IL-21. Ces cytokines induisent une activation des voies JAK (1 et 3) / STAT, amenant à leur tour une augmentation d'expression de ces récepteur^{95,96}. L'IL-27, via l'activation de STAT1⁹⁷ permet l'expression de plusieurs récepteurs inhibiteurs dont Tim-3, TIGIT, LAG-3, CTLA-4 et PD-1. De plus, L'IL-6, via l'activation de STAT3 et c-MAF, permet également l'expression de PD-1⁹⁸. Le TGF β est également impliqué dans l'augmentation d'expression de PD-1, via les facteurs de transcription SMAD2/3⁹⁹. Enfin, une augmentation d'expression de PD-1 est également sous la dépendance de l'activation de l'Interferon Responsive Factor 9 (IRF9) induite par l'interferon α ¹⁰⁰, et la production de kynurenine par l'interferon γ ¹⁰¹. A côté des récepteurs cytokiniques, d'autres récepteurs peuvent être impliqués dans la régulation de l'expression de ces récepteurs inhibiteurs. Dans la phase aigüe du choc septique, il a été rapporté que le récepteur Notch induit la transcription de PD-1 par les lymphocytes périphériques¹⁰². PD-1 peut également être induit par le récepteur aux glucocorticoides dans les cellules NK¹⁰³. Récemment, un mécanisme de régulation post transcriptionnel de PD-1, utilisant les granules de stress dépendant des microtubules et la kinésine 1, a été observé¹⁰⁴. Ce mécanisme semble être commun à plusieurs récepteurs inhibiteurs (TIGIT, BTLA, CTLA-4, Tim-3, LAG-3) mais pas aux récepteurs activateurs¹⁰⁴.

Figure 3. Mécanismes d'expression de différents récepteurs inhibiteurs



D'après Curdy N et al, Trends in Cell Biology 2019

Les cinétiques d'expression de ces différentes molécules inhibitrices sont différentes. Legat et collègues ont analysé l'expression de certains récepteurs inhibiteurs (dont PD-1, CTLA-4, LAG-3, ou CD160) in vitro après stimulation mitogénique sur des PBMCs issues de donneurs sains¹⁰⁵. Les auteurs ont pu ainsi montrer dans ces conditions que certaines molécules présentent une augmentation d'expression très précoces (moins de 8 heures), comme PD-1, CTLA-4 ou LAG-3. Après 24 heures de stimulation, plus de 60% des lymphocytes T CD8+ expriment ces récepteurs inhibiteurs. Le pourcentage de lymphocytes T CD8+ exprimant ces récepteurs continue d'augmenter à 48 et 72 heures de stimulation (près de 80% des lymphocytes les expriment après trois jours de stimulation). Cependant, il est à noter que les cinétiques d'expression peuvent varier selon les populations de T mémoires : alors que les niveaux d'expression semblent homogènes pour CTLA-4 et LAG-3 dans les lymphocytes T CD8+ centraux mémoires, effecteurs mémoires et T EMRA au cours de l'évaluation, le pourcentage d'expression de PD-1 dans les T EMRA augmente plus tardivement (après 48 heures), pour atteindre les mêmes niveaux d'expression que dans les effecteurs mémoires ou les centraux mémoires après 3 jours de stimulation. D'autres récepteurs inhibiteurs présentaient dans cette étude une augmentation d'expression plus lente, (comme Tim-3 ou CD160)^{44,105}. Le pourcentage de lymphocytes T CD8+ exprimant le CD160 augmente lentement et ne représente que 10% des lymphocytes CD8+ après 2 jours, et reste stable après trois jours. Le pourcentage de T CD8+ exprimant Tim-3 augmente après 24 heures de stimulation, et près de 90% des T CD8+ mémoires expriment ces récepteurs après trois jours de stimulation.

3.2.3 Mécanisme de régulation négative

Le mécanisme par lequel l'inhibition de la réponse immune est obtenue via les récepteurs inhibiteurs peut être effectuée par des motifs ITIM ou ITSM sur leur portion intracellulaire, capables de recruter des protéines SHP (ou éventuellement d'autres adaptateurs) qui viendront interférer avec la voie activatrice TCR/ costimulation (figure 4). C'est ainsi le cas pour les récepteurs inhibiteurs PD-1, ou 2B4. Certains récepteurs inhibiteurs (comme LAG-3 ou Tim-3) utilisent d'autres motifs intra-cellulaires (multiples motifs tyrosine non- ITIM, ITSM pour Tim-3 et motif KIEELE pour LAG-3) pour freiner la réponse positive.

D'autres molécules inhibitrices exercent leur effet par compétition vis-à-vis du même ligand que la molécule activatrice, comme le CD160 (compétition de liaison pour HVEM avec le récepteur LIGHT), ou le CTLA-4 (compétition de liaison pour B7-1 ou B7-2 avec le CD28).

Enfin, ces deux mécanismes peuvent être décrits pour certains récepteurs inhibiteur, comme TIGIT (inhibition de la réponse positive par des motifs ITIM activant SHP-1, et compétition avec le CD226 pour la liaison au CD155), (figure 4).

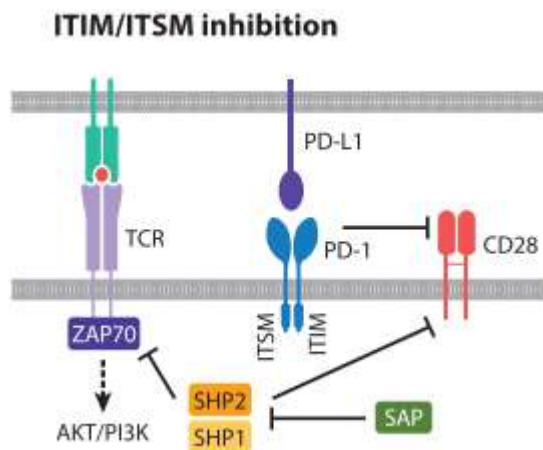
Figure 4 A-C. Les différents mécanismes décrits par lesquels les molécules inhibitrices exercent leur rôle.

A : Régulation négative par recrutement de protéines SHP (Proteine Thyrosine Phosphatase) 1 et 2 via motifs ITIM ou ITSM, ou autre (exemple motif KEELE pour LAG-3).

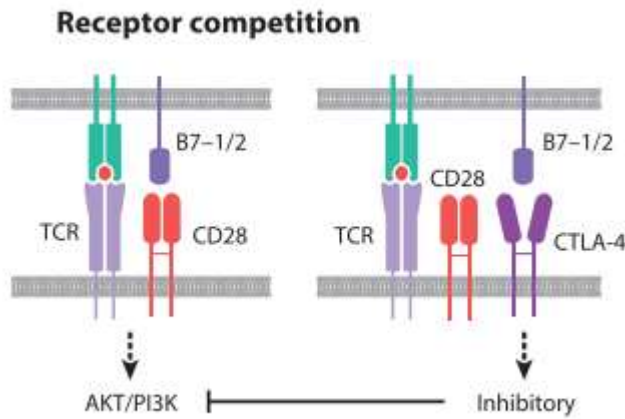
B : compétition pour la liaison d'un même ligand entre récepteur inhibiteur et récepteur activateur

C : Différentes molécules inhibitrices et leurs ligands respectifs.

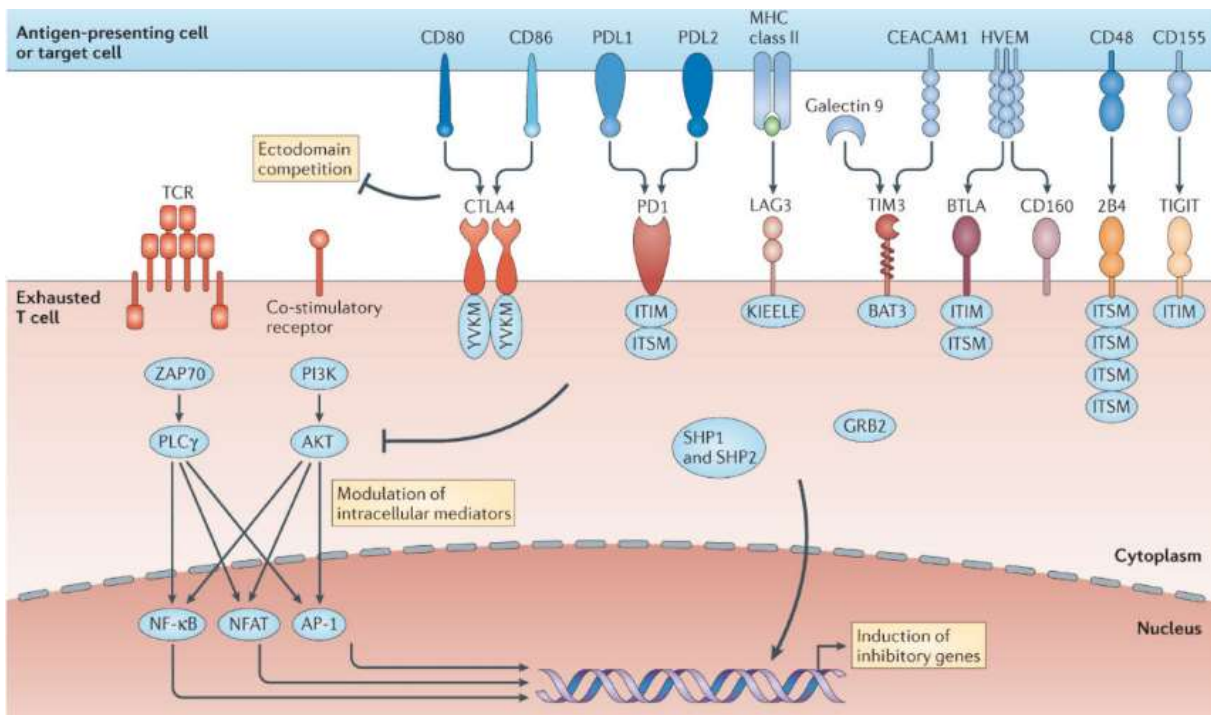
A



B



C



D'après McLane et al, Annu Rev Immunol 2019 et Wherry et al, Nat Rev Immunol 2015

3.3 Perte de la capacité à survivre de manière indépendante de la présence de l'antigène.

Les cellules T mémoires sont capables de survivre au long-cours, sans présence de l'antigène, par augmentation de l'expression des récepteurs IL7R α et IL-2/15R β . Ceci leur permet de maintenir un auto-renouvellement homéostatique¹⁰⁶. Cette caractéristique est perdue par les cellules T épuisées¹⁰⁷. De plus, la persistance de l'antigène est un point crucial à la prolifération de certaines cellules épuisées¹⁰⁸. Après résolution d'une pathologie virale comme le VHC, une grande partie des cellules T épuisées disparaît¹⁰⁹.

3.4 Altération du métabolisme

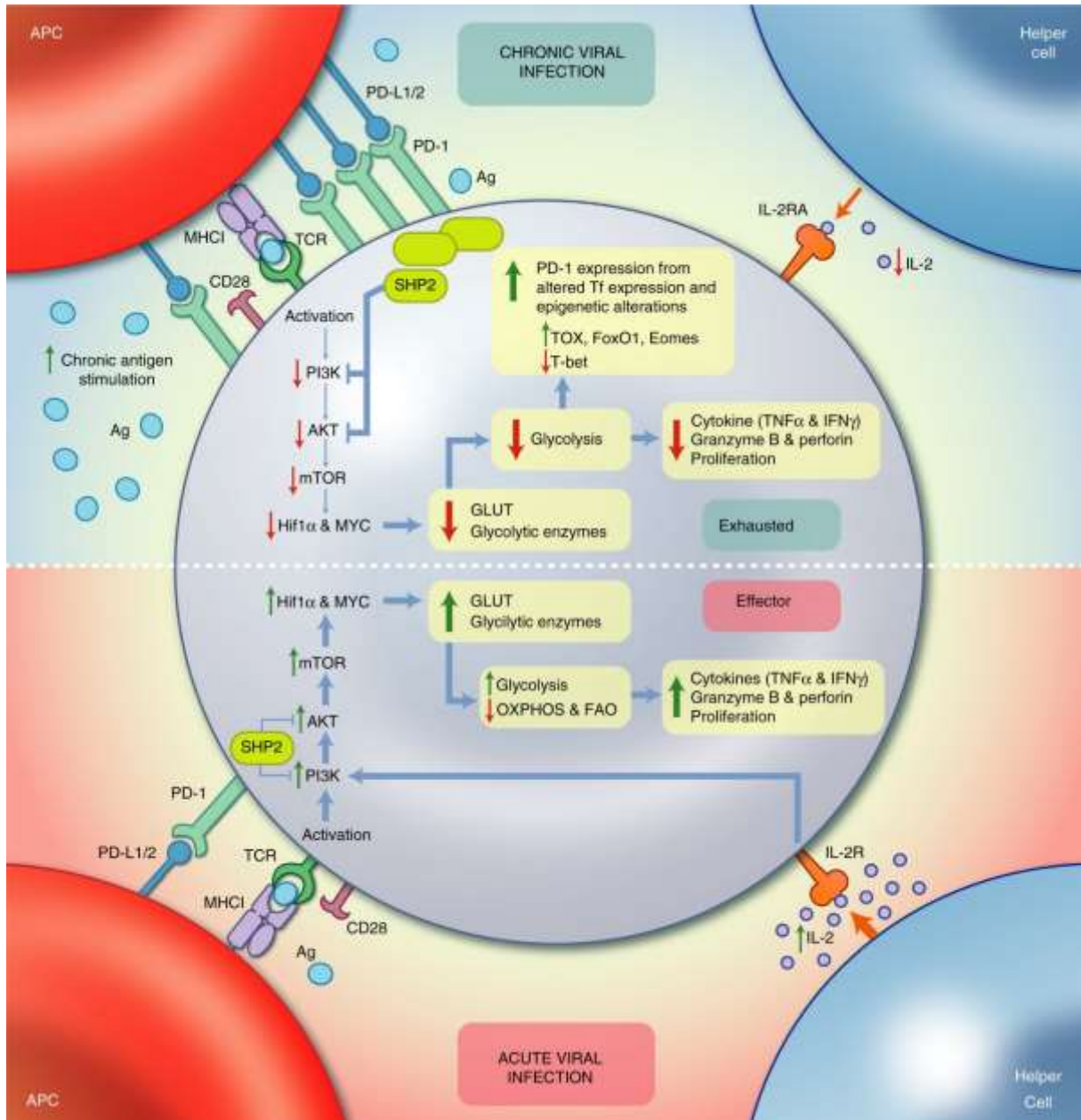
Comme dans toutes les cellules de l'organisme, l'adénosine triphosphate (ATP) nécessaire aux activités cellulaires des lymphocytes T peut être produit à partir du glucose et des acides gras par glycolyse, phosphorylation oxydative, et/ou l'oxydation des acides gras. Les lymphocytes naïfs utilisent de manière prépondérante la phosphorylation oxydative et l'oxydation des acides gras, pour couvrir leurs besoins énergétiques¹¹⁰. Cependant, bien que très efficaces, ces deux voies de production d'énergie sont incapables de répondre aux besoins élevés des lymphocytes activés¹¹¹. Les cellules lymphocytaires présentent une plasticité métabolique importante leur permettant de passer d'une phosphorylation oxydative mitochondriale au stade quiescent à une glycolyse permettant de répondre aux besoins importants des T effecteurs¹¹². En effet, la prolifération massive en réponse à une stimulation, permettant d'obtenir un nombre conséquent de cellules T spécifiques, est IL-2 dépendant, et

haute (et brutalement) consommatrice d'énergie. Ce bouleversement métabolique est renforcé par les actions des signaux de costimulation comme le CD28, aboutissant via la voie de phosphoinositol 3 kinase (PI3K), à une phosphorylation de la protéine kinase B (AKT), et entraînant une activation de la voie des mTORs, et renforçant l'activité de MYC, et HIF1 α ¹¹³. Ces différentes voies permettant aux cellules T d'augmenter la transcription des transporteurs membranaires du glucose et des enzymes de la glycolyse¹¹³.

Une dysrégulation métabolique a été observée pour les cellules T épuisées¹¹⁴. Les voies nécessaires au maintien de la glycolyse sont impactées par la stimulation chronique et amènent à augmenter la dépendance des cellules T à la phosphorylation oxydative et l'oxydation des acides gras. Ceci aura pour effet de diminuer les ressources énergétiques de la cellule, diminuant également les capacités prolifératives et fonctionnelles. Pour exemple, PD-1 impacte les voies PI3K, AKT et mTOR inhibant la glycolyse¹¹⁴ (Figure 5), créant une balance négative entre des besoins anaboliques majeurs et une limitation des capacités énergétiques. L'impact des autres récepteurs inhibiteurs sur les dysrégulations métaboliques reste mal connu.

Figure 5.

Modifications métaboliques observées au cours de l'épuisement lymphocytaire T en comparaison aux stimulations antigéniques aiguës et résolutive.



D'après Sears et al, Immunology 2021

Abbreviations : OXPHOS, phosphorylation oxydative ; FAO, oxydation des acides gras

3.5 Facteurs de transcription et modifications épigénétiques impliqués dans l'ELT.

Les cellules T épuisées présentent un programme transcriptionnel distinct des cellules T mémoires, et T effectrices, mais aussi des cellules T anergiques¹⁰⁹. Au-delà de profils d'expression différents, la connexion entre l'expression de certains facteurs de transcription et les réseaux transcriptionnels diffère de celle observée au sein des cellules T effectrices.

NFAT est un facteur classique associé à l'activation lymphocytaire. La balance NFAT-AP1 lorsqu'elle penche pour NFAT engendre la production de plusieurs récepteurs inhibiteurs comme PD1, LAG-3, Tim-3.

T-Bet et Eomes sont deux facteurs de transcription primordiaux de la famille T-box. Durant une infection aigue, ces deux facteurs présentent une augmentation d'expression après l'activation lymphocytaire : T-bet permettra de diriger les cellules vers des T effecteurs, alors que EOMES permettra la production de cellules mémoires¹¹⁵. Cependant lors d'une infection aigue, une réponse T peut être obtenue malgré l'absence de ces deux facteurs. A l'inverse, Ces deux facteurs de transcription sont indispensables pour obtenir des cellules T épuisées¹⁰⁹. Toutefois, le niveau d'expression de ces deux facteurs détermine des stades différents d'épuisement¹⁰⁹. Durant une infection virale chronique, T-bet est progressivement réprimé au sein des cellules T spécifiques du virus. Cette diminution d'expression est corrélée à la progression de la dysfonction lymphocytaire T CD8+¹¹⁵. A l'inverse, l'expression de EOMES dans les lymphocytes T CD8+ virus-spécifiques augmente au cours des infections chroniques¹⁰⁹, et est corrélée dans les modèles murins avec une diminution de la polyfonctionnalité IFN γ + TNF α alors que les capacités cytotoxiques sont maintenues au sein des LT CD8+ virus-spécifiques¹⁰⁹.

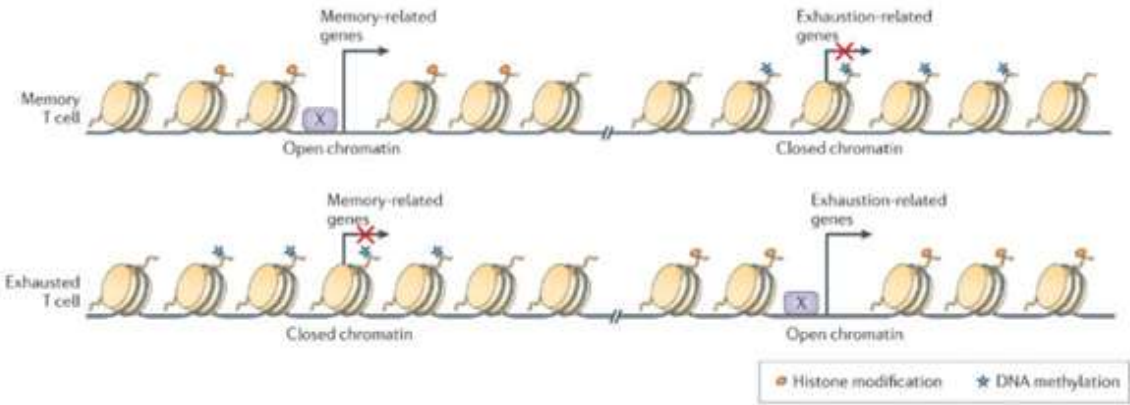
TCF-1 est un facteur de transcription impliqué aux stades initiaux de développement T dans le thymus, mais aussi dans l'homéostasie des T mémoires¹¹⁶. TCF-1 est également indispensable au maintien des capacités progénitrices des cellules épuisées¹¹⁷.

TOX (Thymocyte selection-associated High Mobility Group bOX, 1 et 2) s'est révélé récemment être un facteur de transcription majeur qui semble spécifique de l'ELT, pilier du remodelage épigénétique associé à cet état. TOX est activé via la stimulation chronique du TCR, et dépend de la calcineurine pour être induit, via NFAT. En l'absence de production de TOX, aucune cellule épuisée n'est détectée¹¹⁸. Cependant, les études chez l'homme ont montré que ce facteur de transcription n'est pas exclusivement exprimé par les cellules épuisées, mais aussi par les cellules T effectrices mémoires CD8+. Ainsi les LT CD8+ mémoires polyfonctionnels EBV ou CMV – spécifiques expriment également TOX¹¹⁹. Récemment Beltra et collègues¹²⁰ ont, à partir du modèle murin de LCMV et de lignées cellulaires tumorales murines et humaines, hiérarchisé 4 niveaux d'épuisement, par l'expression de TCF-1, du CD69, de SLAMF6, et de TOX. Deux profils de cellules T épuisées progénitrices TCF-1+ sont ainsi décrits, pouvant être réversible de l'un à l'autre : l'un quiescent et réside uniquement dans les tissus lymphoïdes (TOX^{hi}TCF1^{hi}CD69+SLAMF6+), l'autre est circulant et capable de divisions cellulaires (TOX^{hi}TCF1^{int}CD69-SLAMF6+). Ces dernières cellules sont capables de donner naissance à des cellules T épuisées dites « intermédiaires » (TOX^{int}TCF1-CD69-SLAMF6-), exprimant encore fortement T-bet, et présentant encore des capacités fonctionnelles et cytotoxiques modérées. Enfin, des cellules T épuisées de manière terminale et irréversible apparaissent (TOX^{hi}TCF1-CD69+SLAMF6-), incapables de se diviser, perdant définitivement l'expression de T-bet alors que l'expression d'EBV augmente. L'apparition de ces cellules épuisées de manière terminale et irréversible est sous la dépendance de TOX, via la répression d'expression de T-bet.

NR4a (Nuclear Receptor 4a) est également un facteur de transcription impliqué dans la mise en place d'un programme épigénétique d'ELT, sous la dépendance de l'activation chronique du TCR, et de NFAT. Une régulation positive entre TOX et NR4a a été décrite¹²¹.

Enfin, des modifications épigénétiques profondes et propres aux cellules T épuisées ont été mise en évidence (Figure 6). Tout au long du développement de l'ELT, des modifications progressives de l'architecture de la chromatine sont observées amenant à près de 6000 régions accessibles de chromatine différentes en comparaison au cellules T effectrices, ou T mémoires¹²². Ces marques épigénétiques sont par exemple bien visibles sur le gène codant pour PD-1 (*Pdcd 1*) qui devient totalement déméthylé permettant une large transcription, alors qu'elle ne l'est que très transitoirement lors de l'activation lymphocytaire T hors épuisement¹²³. Ces marques épigénétiques présentent des similitudes importantes entre les cancers et infections chroniques. De plus, elles permettent de différencier de manière plus précise les cellules pouvant répondre ou non à l'utilisation d'une immunothérapie par bloqueur de PD-1¹²⁴. En effet, Pauken et collègues avaient montré dans le modèle murin de LCMV chronique, que les marques épigénétiques étaient peu ou pas modifiées après utilisation d'un bloqueur de la voie PD-1. Ainsi après une amélioration très transitoire du caractère fonctionnel des cellules après blocage de la voie PD-1, on observait un retour à l'état d'épuisement précédent et donc une résistance à ce type de traitement utilisé seul¹²⁴.

Figure 6. Modifications épigénétiques au cours de l'épuisement lymphocytaire T.



D'après Wherry et al, Nat Rev Immunol 2015

4 ELT dans les différentes situations cliniques

4.1 ELT dans les infections chroniques

Dans les infections virales, l'incapacité des cellules T-spécifiques du virus à sécréter des cytokines effectrices est directement liée à la persistance au long cours de l'antigène¹²⁵. Ici l'ELT est vu comme jouant un rôle de régulation, permettant le maintien d'un contrôle continu de l'infection, tout en évitant au système immunitaire de créer des lésions délétères^{126,127}.

- Modèles murins

L'ELT a initialement été étudié dans un modèle murin d'infection chronique à LCMV¹²⁸. Afin de déterminer la signature moléculaire de L'ELT dans les infections chroniques, Wherry et collègues ont étudié le phénotype et la fonction des lymphocytes CD8+ au cours de l'infection à LCMV dans sa forme chronique (LCMV clone 13) et dans sa forme aiguë (LCMV Armstrong). Les auteurs ont pu ainsi montrer que les souris infectées par la forme chronique de LCMV présentent dans les premiers jours de l'infection une co-expression soutenue et importante de multiples récepteurs inhibiteurs (PD-1, LAG-3, TIGIT, CD160, Tim-3, 2B4), mais aussi des modifications profondes métaboliques (inhibition de la glycolyse amenant aux déficiences énergétiques), et un profil transcriptionnel unique, avec des altérations dans l'expression génique de régulateurs du chimiotactisme (augmentation d'expression de certains gènes comme CXCL10, diminution d'expression d'autres comme CD62L), de l'adhésion (augmentation d'expression du CD11c ou CD49c mais diminution d'ICAM2 par

exemple) et de la migration. De plus, des modifications dans certaines voies de signalisation intra-cellulaire étaient notées (comme la diminution d'expression de NFAT ou Lck).

L'importance de l'expression des récepteurs inhibiteurs dans le maintien d'un état d'épuisement a été souligné en bloquant ces voies de régulation. En effet, l'utilisation d'un anticorps anti-PD-1 ou anti-PD-L1 permet de lutter contre l'ELT et d'obtenir un meilleur contrôle de la charge virale^{129,130}. Ceci a permis de conclure au caractère potentiellement dynamique de l'état d'ELT, ainsi que l'intérêt d'envisager le blocage de ces voies inhibitrices en situation d'infection chronique. Cependant, l'absence de réponse au blocage unique de PD-1, à un stade plus tardif a fait apparaître l'irréversibilité de l'ELT lorsque les cellules ont mis en place un programme épigénétique spécifique d'ELT, et sont engagées définitivement dans un état d'épuisement^{131,132}. Ce modèle murin a également permis de montrer que le blocage de plusieurs molécules de co-inhibition (PD-1 + Tim-3, PD-1 + TIGIT, PD-1 + LAG-3) permettait un meilleur contrôle de la réponse virale en comparaison au blocage unique d'une voie^{129,133,134}.

D'autres modèles murins ont été décrits, comme le modèle murin d'infection chronique à gammaherpesvirus, ayant permis de souligner le rôle de LAG-3 dans la régulation négative de la réponse T⁷¹.

- Au cours des infections chez l'homme

Chez l'homme, cet état a été principalement étudié dans les pathologies virales chroniques (HIV, HBV, HCV). De manière générale, une surexpression de PD-1 par les T CD8+¹²⁵ est observée dans toutes les infections chroniques comparativement aux sujets sains, ainsi qu'aux patients ayant guéri de l'infection. On note également au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qu'une augmentation d'expression de Tim-3 dans les CD4+ et CD8+ est corrélée au maintien d'une charge virale élevée, mais aussi à la lymphopénie CD4+⁶⁶. De plus, la production d'IL-10 est augmentée dans ces pathologies virales chroniques (VIH, VHB, VHC)¹³⁵⁻¹³⁷.

Dans l'hépatite B, une expression plus importante des récepteurs inhibiteurs 2B4, CTLA-4 et PD-1, par les CD8+ spécifiques du virus, périphérique ainsi que intra-hépatiques, des patients infectés de manière chronique a été retrouvée, en comparaison aux patients en phase aiguë, ou après guérison^{138,139,140}. In vitro, le blocage de ces voies inhibitrices permet d'obtenir des réponses cytokiniques plus importantes^{138,139}. L'expression de PD-1 a été évaluée de manière dynamique au cours de l'infection à HBV. Au cours de l'infection aiguë, une augmentation de l'expression de PD-1 par les T CD8+ spécifiques du virus est observée, reflétant bien le rôle de régulation négative en rétrocontrôle à une stimulation positive du lymphocyte. Cette régulation est primordiale, car les patients présentant une expression diminuée ou retardée de PD-1 présentent un taux élevé de lésions hépatiques sévères aboutissant à l'insuffisance hépatique grave¹⁴⁰.

Dans l'hépatite C, une co-expression soutenue des récepteurs inhibiteurs PD-1, CTLA-4, CD160, TIGIT, 2B4 et Tim-3 a été observée par les T CD8+ spécifiques intra-hépatique des

patients présentant une infection chronique, en comparaison aux patients en réponse virale soutenue¹⁴¹⁻¹⁴⁴. In vitro, le caractère dysfonctionnel de ces cellules a été démontré, et peut être réversé par l'adjonction d'anticorps bloquant les voies PD-1 et CTLA-4. Il est à noter que cette surexpression est notée dans les lymphocytes intra-hépatiques, site de réplication du virus, mais non dans le sang périphérique (pour CTLA-4 et Tim-3)¹⁴².

Dans l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) une augmentation de l'expression de ces mêmes récepteurs inhibiteurs (PD-1, TIGIT, Tim-3, CD160, CTLA-4, 2B4) au sein des CD4+ et CD8+ a été observée dans le sang périphérique, en comparaison à des sujets non porteur du VIH^{145,146}. Une corrélation entre les proportions de T CD8+ exprimant TIGIT et TIGIT/PD-1 et la progression de la maladie a été rapportée. Par ailleurs, une autre population T épuisée exprimant fortement KLRG1, TIGIT et CD160 a été identifiée uniquement chez des patients VIH+ en comparaison à des témoins sains¹⁴⁷.

Une perte de poly-fonctionnalité dans les CD8+ spécifiques du CMV a également été associé à un moindre contrôle de l'infection^{148,149}.

Tout récemment, au cours des infections à COVID chez le patient transplanté d'organe solide, nous avons pu montrer une corrélation entre les taux circulants de CD4+ et de CD8+ conventionnels mémoires exprimant TIGIT et les taux de lymphocytes T régulateurs circulants. Nous avons également pu mettre en évidence une corrélation entre les taux circulants de lymphocytes T régulateurs et les mémoires conventionnels CD4+ exprimant le CD39 ainsi que les CD8+ exprimant PD-1. Il existait également une corrélation entre l'expression de TIGIT dans les CD4+ conventionnels et les fréquences de CD4+ produisant perforine/ Granzyme B¹⁵⁰.

Ces différentes avancées dans la compréhension de l'ELT ont amené au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans la leucoencéphalopathie

multifocale progressive, où les taux de CD4+ et CD8+ exprimant PD-1 sont parfois majeurs¹⁵¹, un traitement par antagonistes de PD-1 a permis de restaurer l'immunité anti-JC-virus, et ainsi de guérir certains patients^{152,153}. Cependant, nous avons montré qu'en situation de greffe rénale avec une immunosuppression soutenue au long cours, d'autres récepteurs inhibiteurs sont également fortement exprimés (comme 2B4 ou CD160), et ne sont pas impactés par l'utilisation d'un traitement par antagoniste de PD-1, ce qui limite l'efficacité de ce type de thérapeutique¹⁵⁴. Un essai thérapeutique est en cours pour évaluer la sécurité d'utilisation et l'efficacité d'un anti-PD-1 dans le VIH (NCT03367754). In vitro, le blocage de Tim-3 ou de KLRG1 permet de restaurer l'immunité anti-VIH^{66,147}, et des essais thérapeutiques pourraient commencer prochainement.

Le rôle de l'ELT est également en cours d'investigation dans le sepsis des patients en réanimation. Dans un modèle murin de sepsis chez des souris (ligature et perforation coecale), Brahmandam et collègues¹⁵⁵ ont montré une augmentation de l'expression de PD-1 dans les lymphocytes T CD4+ et CD8+ spléniques, dans les deux jours suivant le développement du sepsis. Cette augmentation d'expression de PD-1 est associée à une apoptose lymphocytaire majeure. L'utilisation d'un anticorps anti-PD-1 permettait de limiter cette apoptose et d'augmenter la survie des souris traitées. Plusieurs essais cliniques ont été initiés à la suite de ces observations afin de traiter les sepsis en réanimation. Notre groupe a rapporté récemment son expérience sur des patients septiques en réanimation¹⁵⁶. L'expression sur les lymphocytes T CD4+ et CD8+ de trois récepteurs inhibiteurs PD-1, 2B4, et CD160 ont été étudiés chez des patients atteints d'un sepsis et admis en réanimation à J1 et J3 de leur entrée en réanimation. Trois clusters de CD8+ principaux étaient retrouvés en analyse non supervisée (2B4^{low}PD1^{low}CD160^{low}, 2B4^{hi}PD1^{hi}CD160^{low}, 2B4^{hi}PD1^{low}CD160^{hi}). L'augmentation d'expression de ces clusters était corrélée au risque de décès.

4.2 ELT en cancérologie

Les cellules tumorales portent des altérations génétiques résultant de lésions de l'ADN (elles même induites par déficience de réparation de l'ADN, l'exposition chronique à des toxiques comme le tabac, ou l'exposition aux ultra-violets)¹⁵⁷. Ces altérations permettent de distinguer les cellules normales des cellules cancéreuses, et peuvent induire l'activation des lymphocytes T¹⁵⁸. La présence de lymphocytes infiltrant les tumeurs (en particulier les CD8) est un marqueur pronostic favorable dans de nombreuses tumeurs solides¹⁵⁹. Toutefois, les cellules immunitaires peuvent être incapables d'éliminer les cellules cancéreuses¹⁶⁰, suite à la réduction des fonctions effectrices T par le microenvironnement tumoral¹⁶¹. Les cellules T sont dépendantes des nutriments contenus dans le microenvironnement pour produire l'énergie qui leur est nécessaire lors de leur activation. En cas de balance négative entre besoins énergétiques et capacité de production, une adaptation avec hypo-fonction apparaît¹⁶². Dans le microenvironnement tumoral, de nombreuses modifications favorisent le développement de l'ELT. D'une part, les cellules tumorales détournent pour leurs besoins propre une grande partie du glucose présent localement. Dans un modèle murin de sarcome, le détournement du glucose par les cellules tumorales entraînait une diminution de la capacité des CD8+ à contrôler la tumeur¹⁶³. La déplétion du microenvironnement tumoral en certains acides aminés essentiels à l'activation T, comme la glutamine, participe à l'ELT local¹⁶⁴. Le métabolisme du triptophane par l'enzyme Indoléamine 2,3 Déoxygénase (IDO) sécrétée par certains cancers, entraîne outre la déplétion de cet acide aminé, une accumulation de kynurenine, elle-même responsable d'une augmentation de T régulateurs localement, et une augmentation d'expression de PD-1 par les lymphocytes infiltrant la tumeur¹⁶⁵. De plus la

sécrétion d'arginase par les cellules myéloïdes locales entraîne une diminution d'arginine¹⁶⁶. La diminution du pH, l'hypoxie, et l'augmentation des concentrations d'acide lactique participe également à l'ELT local¹⁶⁷⁻¹⁷⁰.

Dans un modèle murin de mélanome (tumeurs B16-OVA), Miller et collègues¹⁷¹ ont montré un profil commun (épigénétique, transcriptomique) d'épuisement des lymphocytes T CD8+ infiltrants les tumeurs, et des lymphocytes T CD8+ issus du modèle d'infection virale chronique, LCMV chronique (clone 13). Deux clusters différents ont pu être identifiés, entre lymphocytes T « progéniteurs épuisés » (Tcf1+Tim-3-) et T « épuisés de manière terminale » (Tcf1-Tim-3+), présentant des caractéristiques fonctionnelles différentes (perte de la polyfonctionnalité IFN γ +TNF α +IL-2+, diminution des capacités prolifératives, et majoration des capacités cytotoxiques (production de granzyme B) des cellules T épuisées de manière terminale), présentant des réponses différentes au blocage de la voie PD-1 (réversion des marqueurs d'épuisement des cellules T progénitrices épuisées, alors que les cellules T épuisées de manière terminale ne répondent pas). Cependant, des différences ont émergé récemment entre l'expression de certains récepteurs inhibiteurs (principalement KLRG1, CD160, LAG-3, et CTLA-4) au cours de l'infection chronique à EBV et du mélanome¹⁷², renforçant l'idée d'une expression de ces récepteurs dépendante du contexte.

Chez l'homme des clusters dysfonctionnels de lymphocytes infiltrant les mélanomes ou certains cancers du poumon ont été retrouvés, exprimant principalement PD-1, Tim-3, TIGIT et LAG-3^{173,174}. Les implications cliniques, par l'utilisation d'antagonistes CTLA-4, PD-1 ou PD-L1, sont maintenant indéniables dans de nombreux cancers, où ces traitements ont montré des résultats impressionnants (en particulier dans le mélanome¹⁷⁵, les tumeurs du

poumon non à petites cellules¹⁷⁶, le cancer du rein¹⁷⁷, les cancers urothéliaux¹⁷⁸, ainsi que les cancers ORL¹⁷⁹).

Le rôle de l'ELT dans les hémopathies est en cours d'investigation. Dans la leucémie aigue myéloïde (LAM) l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est le traitement de référence lorsqu'il est possible. L'efficacité de ce traitement passe en partie par la capacité des cellules T du donneur à éliminer les cellules tumorales résiduelles (effet du greffon contre la leucémie¹⁸⁰). Le rôle des inhibiteurs du checkpoint immun a été mis en lumière par l'utilisation avec succès d'un antagoniste du CTLA-4 (Ipilimumab) chez des patients allogreffés pour LAM, et présentant une rechute post greffe¹⁸¹. La même équipe a par la suite démontré des profils CD8+ différents selon la réponse aux immunothérapies : les patients ayant répondu au traitement présentaient une infiltration CD8+ des sites tumoraux plus importante que les patients n'ayant pas répondu ; alors que les patients ayant répondu présentaient un profil d'activation des CD8+ circulants plus important (comparables à celui observé chez les patients ayant présenté une maladie du greffon contre l'hôte après traitement), les patients non répondeurs présentaient un profil de CD8+ épuisé¹⁸². De plus, l'étude de patients allogreffés de moelle ayant rechuté a montré, en comparaison aux patients n'ayant pas rechuté, une augmentation d'expression de certains récepteurs inhibiteurs (principalement PD-1, Tim-3 et KLRG-1) au sein des lymphocytes T CD8+ (principalement dans les compartiments T souches mémoires et T centraux mémoires) infiltrant la moelle osseuse. De plus une signature permettant de prédire la rechute de ces patients (pourcentage élevé de cellules souches mémoires (TSM) CD8+PD1+Eomes+T bet-) a pu être établie¹⁸³.

Actuellement, les thérapeutiques visant à bloquer certaines voies inhibitrices ont révolutionné la prise en charge de certains cancers. En particulier, les traitements bloquant la

voie PD-1/PD-L1 sont indiqués dans le mélanome au stade métastatique, mais aussi dans le cancer du poumon non à petites cellules. D'autres molécules comme les anti-CTLA-4 font maintenant partie de l'arsenal thérapeutique, et de très nombreuses molécules sont en cours de développement (antagonistes TIGIT ou Tim-3). L'expression soutenue de plusieurs récepteurs inhibiteurs ouvre la voie à des associations actuellement en cours d'évaluation (comme anti-PD-1 + anti-CTLA-4 dans le mélanome (NCT0322076 et NCT02834013, NCT02408861), ou anti-PD-1 + anti-TIGIT (NCT03119428 et NCT03563716).

4.3 ELT en auto-immunité

A l'instar de ce qui est observé dans les infections chroniques ou les cancers, une stimulation chronique T s'installe dans l'auto-immunité, mais cette fois dirigée contre des antigènes du soi. Les cellules CD8+ présentant une forte affinité pour des antigènes du soi, ayant échappé à la première barrière de la sélection négative thymique, subissent normalement une sélection négative périphérique (procédé de tolérance croisée¹⁸⁴). Cependant, l'échappement à ces deux contrôles dans l'auto-immunité permet à la stimulation antigénique d'engendrer une expansion oligoclonale T, directement impliquée dans de nombreux processus dysimmunitaires, comme le diabète de type 1¹⁸⁵. Ici, les cellules T CD8+ auto-réactives sont directement responsables des lésions engendrées sur les organes, et expriment de hauts niveaux de cytokines effectrices¹⁸⁶. Cependant des marques d'ELT peuvent être observées et sont alors associées à des trajectoires favorables dans l'évolution de la pathologie. Dans le lupus érythémateux aigu disséminé ou les vascularites à ANCA par exemple, un profil transcriptomique associé à l'ELT dans les CD8+ associé à une faible

expression des molécules de costimulation dans les CD4+ est associé à de meilleures évolutions^{29,187}.

Dans cette situation, l'ELT semble ici jouer un rôle protecteur permettant de freiner le processus auto-immun. De potentiels biomarqueurs ou de nouvelles voies thérapeutiques pourraient découler de ces observations dans le futur.

4.4 ELT dans la transplantation d'organes

Actuellement la greffe rénale est le traitement de référence de l'insuffisance rénale chronique au stade terminal de la maladie. Toutefois, les résultats à long terme restent fortement impactés par les conséquences du maintien et de la gestion d'un traitement immunosuppresseur à long terme. Jusqu'à présent aucun biomarqueur (seul ou en combinaison) n'a pu prouver son utilité pour ajuster le traitement immunosuppresseur au long-cours, et ainsi limiter le risque de sous-immunosuppression (rejet aigu et chronique T ou anticorps-médié), ou de sur-immunosuppression (complications infectieuses et néoplasiques).

L'ELT en transplantation d'organes solides reste actuellement peu étudié. Cependant la persistance d'une charge antigénique élevée, constituée d'antigènes étrangers, et représentée par le greffon implanté, rapproche cette situation clinique des infections virales chroniques.

Toutefois, le concept d'ELT en transplantation se confronte à la multitude de cibles épitopiques potentielles que représente le greffon (notion de « diffusion épitopique »)¹⁵. La

réponse initiale dominante contre un épitope pourrait ainsi être maintenue par la survenue de réponses secondaires à d'autres antigènes du donneur. L'impact de la diffusion épitopique a précédemment été étudiée en transplantation cardiaque, où elle a montré une corrélation avec le rejet chronique¹⁸⁸.

4.4.1 ELT dans les modèles murins d'allogreffe

Des modèles murins ont ouvert la voie à l'étude de l'ELT dans cette situation. Le rôle de la masse antigénique dans le développement d'une diminution de la réponse T allo-spécifique a été observé de longue date dans des modèles murins de greffe hépatique¹⁸⁹ ou des modèles de double greffe de cœur ou de rein¹⁹⁰. De plus l'importance de la voie PD-1 / PD-L1 dans les capacités de développement du rejet a été observée dans des modèles murins d'allogreffe d'organe solide. Wang et collègues¹⁹¹⁻¹⁹³ ont rapporté une meilleure survie de greffons cardiaque et de peau après adjonction de PD-L1- Ig à une dose suboptimale de ciclosporine ou de rapamycine. Les souris déficientes pour PD-1 ou PD-L1, ainsi que les souris traitées par anti-PD-1 perdaient tout avantage à l'utilisation d'un bloqueur du second signal (anti- CD154, CTLA-4 Ig). Enfin les cellules allo-réactives CD4+ et CD8+ issues de souris déficientes pour PD-1 présentaient un profil plus agressif (augmentation des capacités prolifératives et de production cytokiniques) que les souris sauvages, suggérant un rôle important de la voie PD-1/ PD-L1 dans la survie des greffons à long terme.

Un profil dysfonctionnel CD4+ exprimant des molécules inhibitrices (dont PD-1) se développe après greffe, et est associé à la survie sans rejet. A partir d'un modèle murin de rejet chronique en greffe cardiaque (modèle bm12 à un seul mismatch classe II), Sarraj et

collègues ¹⁹⁴ont évalué le profil phénotypique et fonctionnel lymphocytaires, dans une situation où le système immunitaire se trouve dans l'incapacité de répondre par absence d'expression des ligands des sélectines (souris rendues KO pour FUT7, gène responsable de l'expression de la fucosyl-transferase 7, elle-même permettant la synthèse des ligands des différentes selectines). Les enseignements tirés de ce modèle étaient multiples. D'une part les souris n'exprimant pas de ligands pour les sélectines présentaient une survie nettement supérieure aux souris sauvages. L'infiltration leucocytaire, l'inflammation, ainsi que l'activation endothéliale au sein de l'organe greffé étaient significativement moindres pour les souris *Fut7*^{-/-}. D'autre part, les cellules T CD4⁺ spléniques présentaient un profil phénotypique d'ELT (avec des taux élevés d'expression de PD-1 mais aussi Tim-3 et KLRG1) ainsi que des capacités prolifératives diminuées. Enfin, le blocage de la voie PD-1/PD-ligands par un anticorps monoclonal anti-PD-1, efface tout avantage de survie pour les souris *Fut7*^{-/-}, entraînant un rejet aigu massif dans les jours suivant l'injection. Dans un autre modèle de transplantation cardiaque (souris présentant un mismatch HLA complet balb/c dans C5BL6), Wu et collègues ont analysé l'impact de l'Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4)¹⁹⁵. Les auteurs ont pu montrer que les souris déficientes en IRF4 présentaient une survie significativement plus importante que les souris sauvages. Cette augmentation de survie était associée à l'augmentation de l'expression du facteur de transcription Helios, et des récepteurs inhibiteurs PD-1 et CD160 sur les lymphocytes T CD4⁺ spléniques. Le gain de survie pouvait être effacé par l'administration d'un anticorps anti-PD-L1 ou par anti-CTLA-4 dans les premiers jours post greffe (seuls ou en combinaison), mais étaient inefficaces après 30 jours de greffe. Un profil CD8⁺ évoquant de l'ELT a également été retrouvé après transplantation d'organes solides.

Dans un modèle d'allogreffe de peau (souris males / femelles), Zou et collègues¹⁹⁶ ont étudié le rôle de la charge antigénique dans la survie des greffons. Les auteurs ont tout d'abord montré que seuls les greffons de peau importants présentaient une survie longue, et non les greffons de taille plus petite. En étudiant de manière spécifique les cellules allo-spécifiques dans ce modèle (lymphocyte T anti-male dans les souris femelles), les auteurs ont montré d'une part une disparition dans le sang périphérique de ces cellules avec des greffons importants, mais pas lorsque des greffons de petites tailles étaient utilisés. Dans la rate, à 28 jours de la greffe, les cellules allo-spécifiques des souris ayant reçu un greffon de taille importante étaient (comparativement aux cellules allo-spécifiques des souris ayant reçu un greffon de petite taille) en proportion plus faible, et présentaient un profil d'ELT (augmentation de l'expression de PD-1, Tim-3, LAG-3 et diminution de l'expression d'IFN γ , TNF α , et Perforin). Dans cet article, les auteurs ont également montré l'importance de la charge antigénique dans le développement de l'ELT CD4+. En étudiant le profil de cellules CD4+ CD45.1+ TEa après transfert adoptif dans deux situations (souris B6 recevant une greffe de peau à partir de souris Balb/c, ou dans des souris CB6F1 exprimant de fortes quantités de l'antigène I-E α), les auteurs ont pu montrer que seules les cellules 45.1+ Tea directement exposées dans les souris CB6F1 présentaient un profil d'ELT (diminution en fréquence, et expression plus importante de Tox, PD-1, LAG-3, Tim-3, TIGIT et diminution de production d'IFN- γ et TNF- α).

L'augmentation d'expression de Tim-3 et de son ligand Galectine-9 au cours du rejet a été rapportée dans un modèle de transplantation pulmonaire chez le rat, soulignant l'importance de cette voie de régulation dans le rejet¹⁹⁷. Dans un modèle murin d'allogreffe cardiaque, le blocage de la voie TIM-3 : Galectine-9 par un anticorps anti-Tim-3 (RMT3-23) a été décrit comme responsable d'un rejet accéléré, (avec augmentation de production

d'anticorps spécifiques du donneur, augmentation de la polarisation lymphocytaire vers des réponses Th1 et Th17 et diminution de fréquence des lymphocytaires T régulateurs)¹⁹⁸. De plus, l'administration de galectine-9 dans un modèle murin de greffe de peau et de cœur, ont montré un allongement de survie des greffons^{199,200}.

4.4.2 ELT en transplantation clinique chez l'homme

Chez l'homme, à ce jour, les données sont peu nombreuses. Cependant dès la fin des années 90, Thomas Starzl faisait le postulat d'un ELT permettant le succès de la greffe à long terme²⁰¹. Parmi les preuves indirectes, la diminution de la réponse allo-spécifique, est importante. Au fil du temps, le taux de rejet diminue, et les caractéristiques se modifient (quasi disparition du rejet T-médié, remplacé par les rejets chroniques anticorps-médiés)²¹. En greffe hépatique, des essais positifs visant à l'arrêt de tout traitement anti-rejet après 10 ans de greffe, plaide pour la délétion clonale allo-spécifique, pouvant être vue comme le stade ultime de l'épuisement. Par le séquençage de la chaîne β du TCR après réaction lymphocytaire mixte sur prélèvement recueilli avant greffe, Savage et collègues ont rendu plus consistante cette hypothèse. En effet, sur les 8 patients étudiés, les auteurs ont pu montrer une réduction des séquences allo-spécifiques (sans modification des séquences après stimulation par « third parties ») chez six patients²⁰². Une étude longitudinale sur les 6 premiers mois de transplantation rénale, a montré une augmentation progressive de la proportion de lymphocytes T CD4+ et CD8+ présentant des caractéristiques d'ELT³⁰ : par une analyse en cytométrie de masse, Fribourg et collègues ont montré une augmentation de différents clusters considérés comme épuisés car exprimant au moins un récepteur inhibiteur. Au sein

des cellules CD4+, cinq clusters épuisés étaient identifiés (PD-1+TIGIT+Tim-3-2B4-, PD-1+TIGIT+Tim-3+2B4-, PD-1+4-1BB+Tim-3+2B4+, Th1 épuisés, Th2 épuisés). Parmi ces clusters, PD1+TIGIT+Tim-3-2B4- était représenté de manière largement dominante au cours des 6 premiers mois de greffe. L'augmentation de proportion dans le sang périphérique des CD4+ épuisés était corrélée à la diminution des capacités de production d'ATP, concordant avec le statut épuisé de ces cellules. De plus, cette augmentation des populations épuisées était elle-même inversement corrélée à l'augmentation de la fibrose du greffon. Des résultats similaires ont été obtenus au sein des cellules T CD8+, où deux clusters épuisés étaient identifiés (PD1+TIGIT+2B4+Tim-3-4-1BB- et PD1+TIGIT+2B4+Tim-3+4-1BB+). Ici également, l'augmentation de ces populations T épuisées était corrélée à la diminution des capacités de production d'ATP, et inversement corrélée à l'augmentation de la fibrose du greffon rénal au cours des six premiers mois post greffe. Ceci laisserait supposer, comme dans l'auto-immunité un rôle positif de l'ELT dans la survie des greffons. Dans une étude transversale, nous avons étudié l'expression de certains récepteurs inhibiteurs (TIGIT, PD-1, Tim-3, 2B4, CD160) à différents temps post greffe (à 39 écart interquartile [25-75] (27 ; 71)), chez des patients tous transplantés à partir d'un donneur vivant, et recevant un traitement par anti-calcineurines et acide mycophénolique (article soumis). Nous avons pu noter une corrélation significative entre le délai de greffe et les fréquences de LT CD4+ mémoires exprimant TIGIT, ainsi que le ratio TIGIT/CD226. Des modifications fonctionnelles ont pu être notées avec une diminution des capacités de production cytokiniques des LT CD4+ TIGIT+CD226+ pour les délais les plus importants post greffe en comparaison aux patients testés à dans des délais proches de la greffe. La réponse T allo-spécifique CD4+ était plus faible chez les patients greffés, en comparaison aux réponses non spécifiques du donneur, et semblait impliquer l'axe

TIGIT/CD226. Dans les LT CD8+, une corrélation entre délai de greffe et pourcentage de LT CD8+ co-exprimant PD-1 et TIGIT.

A l'inverse la présence d'un ELT au long cours trop conséquent pourrait également favoriser la survenue de complications infectieuses opportunistes (comme la Leuco-Encéphalopathie Multifocale Progressive, LEMP) ou de cancers (en particulier viro-induits). A titre d'exemple, dans les désordres lymphoprolifératifs post transplantation (PTLD), les cellules T EBV-spécifiques des patients présentant un PTLD EBV induit présentent une expression significativement plus importante de marqueurs d'épuisement comparativement aux patients présentant un PTLD EBV-non induit²⁰³. De plus, les patients transplantés à partir d'un donneur contre lesquels ils possèdent des anticorps préformés (greffes dites HLA incompatibles), présentent plus de complications infectieuses post transplantation²⁰⁴. Nous avons étudié dans une étude transversale comparant l'expression de certains récepteurs inhibiteurs (TIGIT, PD1, 2B4) et les capacités fonctionnelles (production d'IFN- γ , IL-2, et TNF α) des LT conventionnels CD4+ et CD8+ de patients greffés ABO ou HLA incompatibles²⁰⁵. Nous avons pu montrer une augmentation des fréquences de LT CD4+ et CD8+ exprimant TIGIT dans le groupe de patients HLA incompatibles. De plus, alors que TIGIT était négativement corrélé aux capacités fonctionnelles des LT du groupe ABO incompatibles, toute corrélation était perdue dans le groupe de patients HLA incompatibles. Ces données nous ont amené à évoquer la possibilité du développement d'un ELT au cours de la reconstitution lymphocytaire, plus important chez les patients greffés avec anticorps spécifiques du donneur préformés.

Une dernière preuve indirecte du rôle de l'épuisement lymphocytaire T après transplantation d'organe solide a été soulevée par l'utilisation des inhibiteurs du checkpoint immun chez des patients greffés. Bien qu'actuellement peu prescrits dans cette situation,

certains patients greffés ont reçu un traitement par bloqueur du checkpoint immunitaire après une greffe. Moins d'une centaine de cas ont été rapportés à ce jour^{206,207}. De manière générale, une moindre efficacité est décrite chez les patients greffés d'organe solide, avec moins de 50% de réponse (partielle ou complète) sous ce type de traitement. Par ailleurs, près d'un tiers des patients transplantés présentent un rejet aigu après injection de ce type de traitement. Ces rejets surviennent également chez les patients très à distance de la greffe (voire même après perte de fonction, chez des patients repris en dialyse après greffe rénale²⁰⁸), et quel que soit l'organe greffé (y compris après greffe hépatique), ce qui plaide pour l'importance du maintien de l'expression de ces molécules inhibitrices dans la survie à long terme des greffons. Le rôle de la voie des mTOR dans le possible blocage de l'allo-réactivité tout en favorisant la levée de l'ELT a été évoquée par des modèles murins de greffe cardiaque²⁰⁹ et quelques retours d'expérience chez l'homme²¹⁰, mais reste très largement à confirmer.

4.4.3 Evaluation de l'ELT chez l'homme : contexte spécifique de la transplantation rénale

4.4.3.1 Identification des cellules allo-réactives

En transplantation, le pourcentage de cellules T circulantes considérées comme alloréactives est mal connu chez l'homme, et estimé grossièrement entre 1 et 10%^{211,212}. Plusieurs tests ont été développés afin d'étudier la réponse allo-spécifique (Figure 7) :

- Réaction lymphocytaire mixte (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR) :

Dans ce test, les cellules mononuclées de sang périphérique de deux individus sont mises en culture pour plusieurs jours. Les cellules du donneur sont inactivées par lyse (permettant de focaliser l'étude sur la présentation indirecte) ou irradiation (permettant une étude après présentation directe et indirecte), et la prolifération des cellules du receveur, considéré comme cellules répondeuses et marquées pour suivre la division cellulaire (par exemple marquage CFSE ou CTV), peut être quantifiée. En transplantation d'organe, les cellules allo-spécifiques et non spécifiques peuvent être analysées, en utilisant des cellules prélevées chez le donneur du greffon ou chez des donneurs non apparentés (« third parties »), respectivement. Ce test décrit depuis les années 60 a l'avantage d'être robuste, et de permettre l'analyse phénotypique des cellules ayant proliféré ou non. Cet avantage rend ce test particulièrement utile dans l'analyse de l'épuisement lymphocytaire T post greffe. Quelques études anciennes ont montré un lien entre les taux de prolifération obtenus in vitro

par MLR et le taux de rejet post greffe, ainsi que l'installation d'une hypo-réponse allo-spécifique post greffe^{213,214}.

La lourdeur de mise en place (temps de manipulation, conservation des cellules du donneur) ainsi que le délai dans l'obtention des résultats (temps de culture) ne permettent toutefois pas à cette technique d'être utilisée en routine pour le suivi des patients. A noter qu'un test (Pleximmune™) dérivé de la MLR a tenté d'outrepasser ces difficultés, en analysant les molécules d'activation lymphocytaire T exprimées de manière précoce (CD40Ligand), permettant de réduire à 24H le délai de rendu des résultats et de n'utiliser que 3 mL de sang du donneur. Cependant les preuves manquent pour son utilisation en routine.

- ELISPOT (Enzyme-like Immunospot)

Comme la réaction lymphocytaire mixte, cette technique est basée sur la culture des cellules du receveur en présence de cellules inactivées du donneur (ou de « third parties »), dans des puits de culture doublés de membrane recouverte par un anticorps dirigé contre la protéine sécrétée étudiée (dans cette situation, les cytokines IL-2 et IFN γ par les CD4+ et CD8+ principalement). Ensuite, après un temps de culture court (18 à 24H) et élimination des cellules, un anticorps de détection (reconnaissant un épitope différent de l'anticorps initial) est ajouté, ainsi que les agents nécessaires à la révélation du marquage (par exemple, anticorps secondaire biotinylé, dont le marquage est révélé par ajout de peroxydase de streptavidine + substrat)²¹⁵. L'intérêt de cette technique réside dans sa grande sensibilité²¹⁵. En pratique clinique, cette technique est actuellement en cours d'évaluation afin de mieux prédire le²¹⁶ risque initial de rejet de greffe rénale²¹⁷. Cependant, cette technique donne

seulement une information quant aux capacités fonctionnelles des cellules, et non sur l'analyse phénotypique, ce qui limite son utilisation pour l'étude de l'épuisement lymphocytaire.

Afin de déterminer la fréquence des cellules allo-réactives dans une population lymphocytaire T, plusieurs méthodes ont été développées. L'analyse en dilution limite a été décrite dans un modèle murin dès les années 1980²¹⁶. En réalisant les analyses de réactions lymphocytaires mixtes avec des dilutions successives des PBMCs du receveur, il est possible de calculer la fréquence de lymphocytes T allo-spécifiques (relation de Poisson entre le nombre de cellules répondeuses et le logarithme du pourcentage de cultures considérées négatives²¹⁸). La production d'IL-2 est classiquement utilisée pour analyser la fréquence des LT CD4+ allo-réactifs²¹⁹, et par cytotoxicité pour les LT CD8+²²⁰, ou encore par incorporation de thymidine pour l'évaluation de la prolifération²¹⁹. Cette méthode robuste, nécessite cependant un temps de manipulations important. Plus récemment, d'autres techniques de quantification ont été décrites, comme l'analyse des cellules T allo-réactives productrices d'interféron- γ par cytométrie de flux après réaction lymphocytaire mixte²²¹, ou encore par les méthodes de quantification par dilution de colorants en cytométrie, comme le Cell Trace Violet (CTV)²²². Cette dernière méthode offre la possibilité d'une analyse dynamique de la prolifération, ainsi qu'une analyse phénotypique en fonction du niveau de prolifération²²².

- Mesure de l'adénosine triphosphate (ATP) par les lymphocytes T CD4+.

Cette technique a été décrite afin d'évaluer les capacités fonctionnelles lymphocytaires à partir du sang périphérique des patients. Une mesure de l'activation lymphocytaire sur sang total après stimulation mitogénique par phytohemagglutinin (PHA), incubation (18H), détection des cellules CD4+ par séparation après introduction de billes magnétiques, lavage, et enfin lyse cellulaire puis mesure de l'ATP. Ici encore, cette technique a l'avantage de sa simplicité de mise en œuvre, et de sa standardisation. Des tests commerciaux (Immunknow[®], Cylex, Inc, Columbia, MD) ont été testés pour mesurer le niveau d'immunosuppression des patients²²³. Cependant, dans l'analyse de l'épuisement lymphocytaire post transplantation, aucune caractérisation phénotypique n'est possible. De plus, une stimulation est nécessaire (donc non donneur-spécifique) pour permettre d'obtenir une réponse suffisante.

4.4.3.2 Rôle du traitement immunosuppresseur

L'une des spécificités majeures de l'ELT en transplantation rénale en comparaison aux autres situations, réside dans l'utilisation au long cours de traitements immunosuppresseurs venant bloquer les capacités de réponse du système immunitaire. Ces traitements pourront avoir des effets différents quant à la promotion, ou l'inhibition de l'ELT. L'impact d'un traitement d'induction déplétant comme le sérum anti-lymphocytaire, sur l'expression de récepteurs inhibiteurs au cours de la reconstitution immunitaire avait jusqu'à présent été peu étudié. Comme nous le verrons, nous nous sommes intéressés à l'expression de TIGIT, 2B4, et PD-1 dans une population de patients ABO incompatibles ou greffés avec anticorps anti-HLA préformés ayant reçu ce traitement, et vu des différences d'expression entre les deux groupes, plaidant pour la présence d'un ELT global chez les patients greffés avec anticorps spécifiques du donneur. Fribourg et collègues avaient également retrouvé une augmentation des populations T épuisées chez les patients ayant reçu une induction²²⁴. Les inhibiteurs de la calcineurine sont un pilier majeur du traitement d'entretien anti-rejet actuellement. Il a précédemment été montré que TOX, facteur de transcription majeur de l'ELT, impliqué dans la mise en place des programmes transcriptionnels et épigénétiques spécifiques à l'ELT, était induit par un signal dépendant de la calcineurine au stades précoces de l'ELT (par la suite la boucle d'amplification devient calcineurine indépendante)¹¹⁸. On peut donc supposer qu'un traitement au long-cours initié dès le premier jour de greffe, pourrait empêcher la mise en place d'un ELT spécifique ou non du greffon. Dans une étude portant sur des patients ayant stoppé leur traitement par tacrolimus à distance de la greffe, une augmentation de fréquence

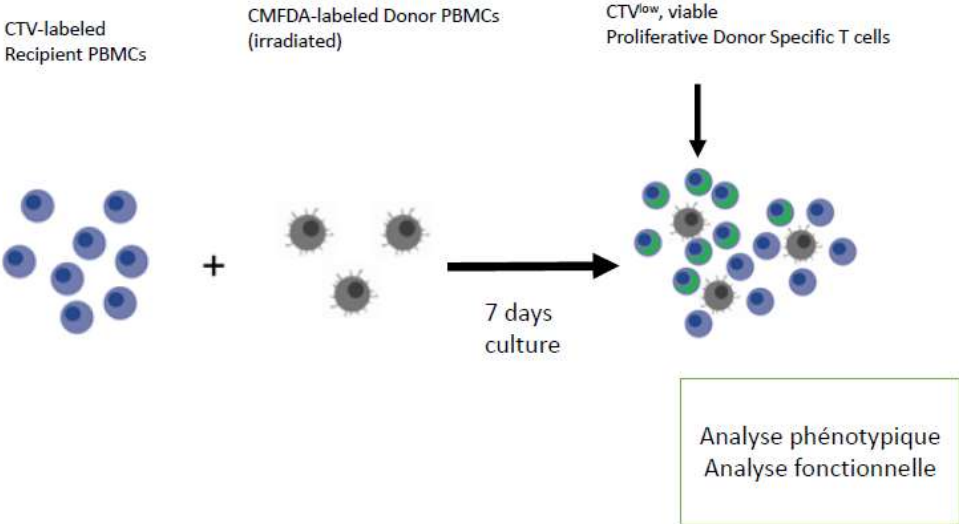
au cours du temps des LT CD4+ et CD8+ PD-1+ CD57- était notée, alors que les patients maintenus sous tacrolimus ne présentaient pas une telle augmentation²²⁵. De futures études sont nécessaires pour confirmer ou non cette hypothèse. Les inhibiteurs de la mTOR, par leur effet sur le métabolisme cellulaire et les fonctions mitochondriales pourraient promouvoir l'ELT. Au cours des pathologies virales chroniques, il a été montré que les lymphocytes T cytotoxiques antigène-spécifiques diminuaient leur activité mTORC1 et mTORC2²²⁶. L'utilisation d'un antagoniste PD-1 entraîne une réaugmentation de la voie de signalisation mTORC1 et mTORC2, et ainsi une augmentation des fonctions des lymphocytes T infiltrant les tumeurs, cet effet étant annulé par l'utilisation d'un inhibiteur de la mTOR²²⁶. Une partie de cette régulation pourrait passer par la régulation d'expression de PD-1 par le facteur de transcription FOXO1, lui-même sous la dépendance de l'axe mTORC2/AKT²²⁶. Cependant il a récemment été montré que l'administration d'un inhibiteur de la mTOR pouvait diminuer l'expression de certains récepteurs inhibiteurs comme TIGIT, PD-1, et PD-L1 sur des cellules T CD4+ stimulées par l'administration d'IL-7/IL-15 ou par anti-CD3/CD28²²⁷. De plus, la persistance de l'activation de la voie des mTOR, en contexte de privation d'énergie, au cours de l'activation lymphocytaire T pourrait être cruciale au développement des premiers stades de l'ELT. L'utilisation précoce d'un inhibiteur de la mTOR améliore les fonctions mitochondriales, mais abouti à des capacités lymphocytaires T cytotoxiques réduites²²⁸. L'impact exact des inhibiteurs de la mTOR sur le développement de l'ELT reste donc actuellement non résolu.

L'impact du belatacept sur le développement de l'ELT n'est à ce jour pas connu. Toutefois, il a récemment été signalé que le récepteur inhibiteur TIGIT était exprimé dans tous les sous-types de lymphocytes T mémoires associés au rejet greffe sous belatacept. In vitro l'utilisation d'un agoniste TIGIT permettait d'augmenter l'apoptose de ces cellules T mémoires²²⁹.

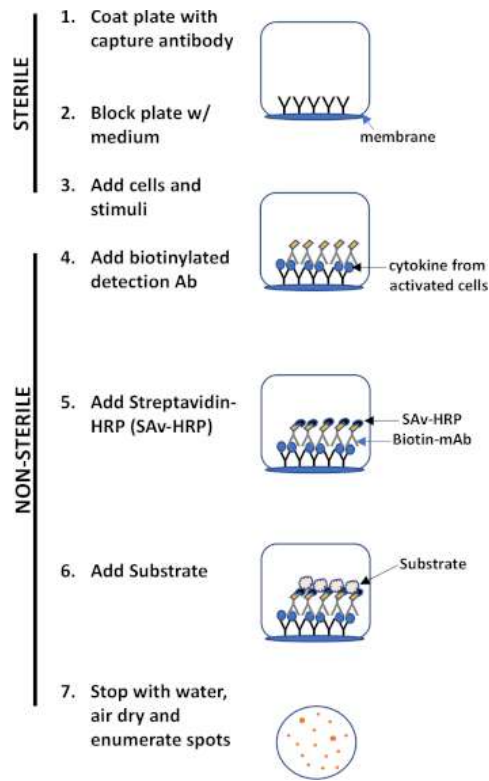
Aucune donnée robuste n'est disponible à ce jour concernant l'impact de l'acide mycophénolique ou de l'azathioprine.

Figure 7. Techniques d'analyse in-vivo des cellules allo-immunes

A. Réaction lymphocytaire mixte (MLR)

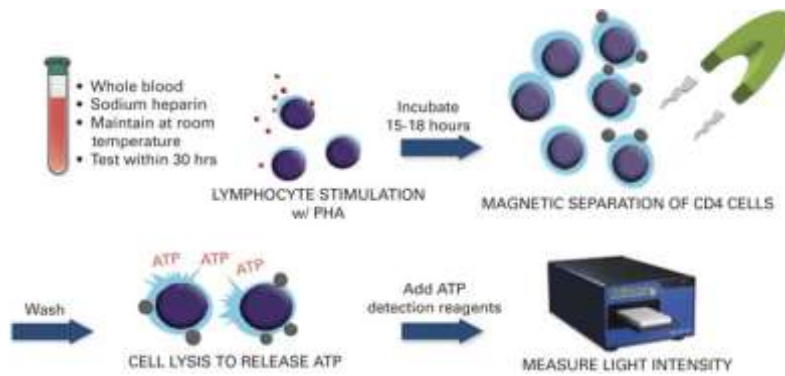


B. Enzyme-like Immunospot (ELISpot)



(D'après Webb T, Jove Science 2021)

C. Mesure de l'Adénosine Tryphosphate (ATP) produit par les T CD4+ après stimulation mitogénique



(D'après Gesundheit B, Bone Marrow Transplantation, 2009)

Références

1. Chadban SJ, Ahn C, Axelrod DA, et al. Summary of the Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Clinical Practice Guideline on the Evaluation and Management of Candidates for Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2020;104(4):708-714. doi:10.1097/TP.0000000000003137
2. Hariharan S, Israni AK, Danovitch G. Long-Term Survival after Kidney Transplantation. *N Engl J Med*. 2021;385(8):729-743. doi:10.1056/nejmra2014530
3. Lim MA, Kohli J, Bloom RD. Immunosuppression for kidney transplantation: Where are we now and where are we going? *Transplant Rev*. 2017;31(1):10-17. doi:10.1016/j.trre.2016.10.006
4. Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N Engl J Med*. 2018;379(12):1150-1160. doi:10.1056/nejmra1802677
5. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the Kidney Allograft. *N Engl J Med*. 2010;363(15):1451-1462. doi:10.1056/nejmra0902927
6. Yu L, Wang L, Chen S. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med*. 2010;14(11):2592-2603. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01127.x
7. Leventhal JS, Schröppel B. Toll-like receptors in transplantation: Sensing and reacting to injury. *Kidney Int*. 2012;81(9):826-832. doi:10.1038/ki.2011.498
8. Brown KM, Kondeatis E, Vaughan RW, et al. Influence of Donor C3 Allotype on Late Renal-Transplantation Outcome. *N Engl J Med*. 2006;354(19):2014-2023. doi:10.1056/nejmoa052825
9. Strainic MG, Liu J, Huang D, et al. Locally Produced Complement Fragments C5a and C3a

- Provide Both Costimulatory and Survival Signals to Naive CD4+ T Cells. *Immunity*. 2008;28(3):425-435. doi:10.1016/j.immuni.2008.02.001
10. Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MICA Antigens and Kidney-Transplant Rejection. *N Engl J Med*. 2007;357(13):1293-1300. doi:10.1056/nejmoa067160
 11. Charmetant X, Chen CC, Saison C, et al. Une nouvelle voie pour la génération d'anticorps spécifiques du donneur après transplantation d'organe solide : la reconnaissance directe inversée. *Néphrologie & Thérapeutique*. 2019;15(5):281. doi:10.1016/j.nephro.2019.07.047
 12. Hughes AD, Zhao D, Dai H, et al. Cross-dressed dendritic cells sustain effector T cell responses in islet and kidney allografts. *J Clin Invest*. 2020;130(1):287-294. doi:10.1172/JCI125773
 13. Bestard O, Nickel P, Cruzado JM, et al. Circulating alloreactive T cells correlate with graft function in longstanding renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(7):1419-1429. doi:10.1681/ASN.2007050539
 14. Valujskikh A, Zhang Q, Heeger PS. CD8 T Cells Specific for a Donor-Derived, Self-Restricted Transplant Antigen Are Nonpathogenic Bystanders after Vascularized Heart Transplantation in Mice. *J Immunol*. 2006;176(4):2190-2196. doi:10.4049/jimmunol.176.4.2190
 15. Lovegrove E, Pettigrew GJ, Bolton EM, Bradley JA. Epitope Mapping of the Indirect T Cell Response to Allogeneic Class I MHC: Sequences Shared by Donor and Recipient MHC May Prime T Cells That Provide Help for Alloantibody Production. *J Immunol*. 2001;167(8):4338-4344. doi:10.4049/jimmunol.167.8.4338
 16. Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Cook HT, Lechler RI. Loss of Direct and Maintenance of Indirect Alloresponses in Renal Allograft Recipients: Implications for the Pathogenesis of Chronic Allograft Nephropathy. *J Immunol*. 2001;167(12):7199-7206. doi:10.4049/jimmunol.167.12.7199
 17. Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Cook HT, Lechler RI. Loss of

- Direct and Maintenance of Indirect Alloresponses in Renal Allograft Recipients: Implications for the Pathogenesis of Chronic Allograft Nephropathy. *J Immunol*. 2001;167(12):7199-7206. doi:10.4049/jimmunol.167.12.7199
18. Ali JM, Negus MC, Conlon TM, et al. Diversity of the CD4 T Cell Alloresponse: The Short and the Long of It. *Cell Rep*. 2016;14(5):1232-1245. doi:10.1016/j.celrep.2015.12.099
 19. Liu Q, Rojas-Canales DM, Divito SJ, et al. Donor dendritic cell-derived exosomes promote allograft-targeting immune response. *J Clin Invest*. 2016;126(8):2805-2820. doi:10.1172/JCI84577
 20. Sellarés J, De Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: The dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant*. 2012;12(2):388-399. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03840.x
 21. Halloran PF, Chang J, Famulski K, et al. Disappearance of T cell-mediated rejection despite continued antibody-mediated rejection in late kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(7):1711-1720. doi:10.1681/ASN.2014060588
 22. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(8):486-499. doi:10.1038/nri3862
 23. Blank CU, Haining WN, Held W, et al. Defining 'T cell exhaustion.' *Nat Rev Immunol*. 2019. doi:10.1038/s41577-019-0221-9
 24. Covre LP, De Maeyer RPH, Gomes DCO, Akbar AN. The role of senescent T cells in immunopathology. *Aging Cell*. 2020;19(12). doi:10.1111/accel.13272
 25. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(2):214-221. doi:10.1016/j.coi.2012.12.003

26. Akbar AN, Henson SM, Lanna A. Senescence of T Lymphocytes: Implications for Enhancing Human Immunity. *Trends Immunol.* 2016;37(12):866-876. doi:10.1016/j.it.2016.09.002
27. Attanasio J, Wherry EJ. Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease. *Immunity.* 2016;44(5):1052-1068. doi:10.1016/j.immuni.2016.04.022
28. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu Rev Immunol.* 2019;37(1):457-495. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055318
29. McKinney EF, Lee JC, Jayne DRW, Lyons PA, Smith KGC. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature.* 2015;523(7562):612-616. doi:10.1038/nature14468
30. Fribourg M, Anderson L, Fischman C, et al. T-cell exhaustion correlates with improved outcomes in kidney transplant recipients. *Kidney Int.* 2019;96(2):436-449. doi:10.1016/j.kint.2019.01.040
31. Ng WF, Hernandez-Fuentes M, Baker R, Chaudhry A, Lechler RI. Reversibility with interleukin-2 suggests that T cell anergy contributes to donor-specific hyporesponsiveness in renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(12):2983-2989. doi:10.1097/01.ASN.0000042163.73539.D4
32. Crepin T, Carron C, Roubiou C, et al. ATG-induced accelerated immune senescence: Clinical implications in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2015;15(4):1028-1038. doi:10.1111/ajt.13092
33. Speiser DE, Utzschneider DT, Oberle SG, Münz C, Romero P, Zehn D. T cell differentiation in chronic infection and cancer: Functional adaptation or exhaustion? *Nat Rev Immunol.* 2014;14(11):768-774. doi:10.1038/nri3740
34. Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected

- immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature*. 1993;362(6422):758-761. doi:10.1038/362758a0
35. Wu T, Ji Y, Ashley Moseman E, et al. The TCF1-Bcl6 axis counteracts type I interferon to repress exhaustion and maintain T cell stemness. *Sci Immunol*. 2016;1(6). doi:10.1126/sciimmunol.aai8593
 36. Fuller MJ, Khanolkar A, Tebo AE, Zajac AJ. Maintenance, Loss, and Resurgence of T Cell Responses During Acute, Protracted, and Chronic Viral Infections. *J Immunol*. 2004;172(7):4204-4214. doi:10.4049/jimmunol.172.7.4204
 37. Kanev K, Wu M, Drews A, et al. Proliferation-competent Tcf1+ CD8 T cells in dysfunctional populations are CD4 T cell help independent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(40):20070-20076. doi:10.1073/pnas.1902701116
 38. Crawford A, Angelosanto JM, Kao C, et al. Molecular and Transcriptional Basis of CD4+ T Cell Dysfunction during Chronic Infection. *Immunity*. 2014;40(2):289-302. doi:10.1016/j.immuni.2014.01.005
 39. Aubert RD, Kamphorst AO, Sarkar S, et al. Antigen-specific CD4 T-cell help rescues exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(52):21182-21187. doi:10.1073/pnas.1118450109
 40. Dow C, Henderson R, Sette A, Mothé BR. CD4+ T-cell Inhibitory Ligands: A Tool for characterizing dysfunctional CD4+ T cells during Chronic Infection. *Immunology*. 2013;140(1):61-69. doi:10.1111/imm.12109
 41. Dominguez-Villar M, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Identification of T helper type 1-like, Foxp3 + regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat Med*. 2011;17(6):673-675. doi:10.1038/nm.2389
 42. Fuller MJ, Zajac AJ. Ablation of CD8 and CD4 T Cell Responses by High Viral Loads. *J Immunol*.

- 2003;170(1):477-486. doi:10.4049/jimmunol.170.1.477
43. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. *J Virol*. 2003;77(8):4911-4927. doi:10.1128/jvi.77.8.4911-4927.2003
44. Blackburn SD, Shin H, Freeman GJ, Wherry EJ. Wherry PNAS. 2008;2008. doi:10.1016/j.expneurol.2008.03.007
45. Wherry EJ, Barber DL, Kaech SM, Blattman JN, Ahmed R. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(45):16004-16009. doi:10.1073/pnas.0407192101
46. Paley MA, Kroy DC, Odorizzi PM, et al. NIH Public Access. 2013;338(6111):1220-1225. doi:10.1126/science.1229620.Progenitor
47. Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2000;192(2):295-302. doi:10.1084/jem.192.2.295
48. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2009;206(13):3015-3029. doi:10.1084/jem.20090847
49. 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;501(7466):252-256. doi:10.1038/nature12428
50. Lucca LE, Axisa PP, Singer ER, Nolan NM, Dominguez-Villar M, Hafler DA. TIGIT signaling restores suppressor function of Th1 Tregs. *JCI Insight*. 2019;4(3). doi:10.1172/jci.insight.124427

51. Keir ME, Latchman YE, Freeman GJ, Sharpe AH. Programmed Death-1 (PD-1):PD-Ligand 1 Interactions Inhibit TCR-Mediated Positive Selection of Thymocytes. *J Immunol.* 2005;175(11):7372-7379. doi:10.4049/jimmunol.175.11.7372
52. Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, Van Den Broek M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol.* 2005;6(3):280-286. doi:10.1038/ni1165
53. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity.* 1999;11(2):141-151. doi:10.1016/S1074-7613(00)80089-8
54. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science (80-).* 2001;291(5502):319-322. doi:10.1126/science.291.5502.319
55. Riella L V., Paterson AM, Sharpe AH, Chandraker A. Role of the PD-1 pathway in the immune response. *Am J Transplant.* 2012;12(10):2575-2587. doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04224.x
56. Keir ME, Liang SC, Guleria I, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med.* 2006;203(4):883-895. doi:10.1084/jem.20051776
57. Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, et al. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J Exp Med.* 2005;202(2):231-237. doi:10.1084/jem.20050019
58. Pauken KE, Torchia JA, Chaudhri A, Sharpe AH, Freeman GJ. Emerging concepts in PD-1 checkpoint biology. *Semin Immunol.* 2021. doi:10.1016/j.smim.2021.101480
59. Trojaniello C, Luke JJ, Ascierto PA. Therapeutic Advancements Across Clinical Stages in Melanoma, With a Focus on Targeted Immunotherapy. *Front Oncol.* 2021;11. doi:10.3389/fonc.2021.670726

60. McArdel SL, Terhorst C, Sharpe AH. Roles of CD48 in regulating immunity and tolerance. *Clin Immunol.* 2016;164:10-20. doi:10.1016/j.clim.2016.01.008
61. Thorley-Lawson DA, Schooley RT, Bhan AK, Nadler LM. Epstein-Barr virus superinduces a new human b cell differentiation antigen (B-LAST 1) expressed on transformed lymphoblasts. *Cell.* 1982;30(2):415-425. doi:10.1016/0092-8674(82)90239-2
62. Sayos J, Wu C, Morra M, et al. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature.* 1998;395(6701):462-469. doi:10.1038/26683
63. Cao E, Zang X, Ramagopal UA, et al. T Cell Immunoglobulin Mucin-3 Crystal Structure Reveals a Galectin-9-Independent Ligand-Binding Surface. *Immunity.* 2007;26(3):311-321. doi:10.1016/j.immuni.2007.01.016
64. Rangachari M, Zhu C, Sakuishi K, et al. Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion. *Nat Med.* 2012;18(9):1394-1400. doi:10.1038/nm.2871
65. Gautron AS, Dominguez-Villar M, de Marcken M, Hafler DA. Enhanced suppressor function of TIM-3+FoxP3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2014;44(9):2703-2711. doi:10.1002/eji.201344392
66. Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med.* 2008;205(12):2763-2779. doi:10.1084/jem.20081398
67. Liu JF, Wu L, Yang LL, et al. Blockade of TIM3 relieves immunosuppression through reducing regulatory T cells in head and neck cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1). doi:10.1186/s13046-018-0713-7
68. Pignon JC, Jegede O, Shukla SA, et al. Irrecist for the evaluation of candidate biomarkers of

- response to nivolumab in metastatic clear cell renal cell carcinoma: Analysis of a phase II prospective clinical trial. *Clin Cancer Res.* 2019;25(7):2174-2184. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-3206
69. Kim JE, Patel MA, Mangraviti A, et al. Combination therapy with anti-PD-1, anti-TIM-3, and focal radiation results in regression of murine gliomas. *Clin Cancer Res.* 2017;23(1):124-136. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1535
70. Huard B, Mastrangeli R, Prigent P, et al. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(11):5744-5749. doi:10.1073/pnas.94.11.5744
71. Workman CJ, Vignali DAA. Negative Regulation of T Cell Homeostasis by Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223). *J Immunol.* 2005;174(2):688-695. doi:10.4049/jimmunol.174.2.688
72. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity.* 2016;44(5):989-1004. doi:10.1016/j.immuni.2016.05.001
73. Cai G, Anumanthan A, Brown JA, Greenfield EA, Zhu B, Freeman GJ. CD160 inhibits activation of human CD4+ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol.* 2008;9(2):176-185. doi:10.1038/ni1554
74. Tsujimura K, Obata Y, Matsudaira Y, et al. Characterization of murine CD160+ CD8+ T lymphocytes. *Immunol Lett.* 2006;106(1):48-56. doi:10.1016/j.imlet.2006.04.006
75. El-Far M, Pellerin C, Pilote L, et al. CD160 isoforms and regulation of CD4 and CD8 T-cell responses. *J Transl Med.* 2014;12(1). doi:10.1186/s12967-014-0217-y
76. Ye Q, Fraser CC, Gao W, et al. Modulation of LIGHT-HVEM costimulation prolongs cardiac allograft survival. *J Exp Med.* 2002;195(6):795-800. doi:10.1084/jem.20012088

77. Wang Y, Subudhi SK, Anders RA, et al. The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell–mediated responses. *J Clin Invest*. 2005;115(3):711-717.
doi:10.1172/jci22982
78. Parry R V., Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al. CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2005;25(21):9543-9553.
doi:10.1128/mcb.25.21.9543-9553.2005
79. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 1995;3(5):541-547. doi:10.1016/1074-7613(95)90125-6
80. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CtlA-4. *Science (80-)*. 1995;270(5238):985-988.
doi:10.1126/science.270.5238.985
81. Linsley PS, Bradshaw J, Greene JA, Peach R, Bennett KL, Mittler RS. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*. 1996;4(6):535-543.
doi:10.1016/S1074-7613(00)80480-X
82. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: A molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science (80-)*. 2011;332(6029):600-603.
doi:10.1126/science.1202947
83. Lo B, Zhang K, Lu W, et al. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science (80-)*. 2015;349(6246):436-440.
doi:10.1126/science.aaa1663
84. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science (80-)*. 2008;322(5899):271-275. doi:10.1126/science.1160062

85. Harjunpää H, Guillerey C. TIGIT as an emerging immune checkpoint. *Clin Exp Immunol*. 2020;200(2):108-119. doi:10.1111/cei.13407
86. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009;10(1):48-57. doi:10.1038/ni.1674
87. Lozano E, Dominguez-Villar M, Kuchroo V, Hafler DA. The TIGIT/CD226 Axis Regulates Human T Cell Function. *J Immunol*. 2012;188(8):3869-3875. doi:10.4049/jimmunol.1103627
88. Liu S, Zhang H, Li M, et al. Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells. *Cell Death Differ*. 2013;20(3):456-464. doi:10.1038/cdd.2012.141
89. Fourcade J, Sun Z, Chauvin JM, et al. CD226 opposes TIGIT to disrupt Tregs in melanoma. *JCI insight*. 2018;3(14). doi:10.1172/jci.insight.121157
90. Joller N, Hafler JP, Brynedal B, et al. Cutting Edge: TIGIT Has T Cell-Intrinsic Inhibitory Functions. *J Immunol*. 2011;186(3):1338-1342. doi:10.4049/jimmunol.1003081
91. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, et al. The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8+ T Cell Effector Function. *Cancer Cell*. 2014;26(6):923-937. doi:10.1016/j.ccell.2014.10.018
92. Lee DJ. The relationship between TIGIT+ regulatory T cells and autoimmune disease. *Int Immunopharmacol*. 2020;83. doi:10.1016/j.intimp.2020.106378
93. Taylor A, Harker JA, Chanthong K, Stevenson PG, Zuniga EI, Rudd CE. Glycogen Synthase Kinase 3 Inactivation Drives T-bet-Mediated Downregulation of Co-receptor PD-1 to Enhance CD8+ Cytolytic T Cell Responses. *Immunity*. 2016;44(2):274-286. doi:10.1016/j.immuni.2016.01.018

94. Balkhi MY, Wittmann G, Xiong F, Junghans RP. YY1 Upregulates Checkpoint Receptors and Downregulates Type I Cytokines in Exhausted, Chronically Stimulated Human T Cells. *iScience*. 2018;2:105-122. doi:10.1016/j.isci.2018.03.009
95. Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, et al. The Common γ -Chain Cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 Induce the Expression of Programmed Death-1 and Its Ligands. *J Immunol*. 2008;181(10):6738-6746. doi:10.4049/jimmunol.181.10.6738
96. Mujib S, Jones RB, Lo C, et al. Antigen-Independent Induction of Tim-3 Expression on Human T Cells by the Common γ -Chain Cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 Is Associated with Proliferation and Is Dependent on the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *J Immunol*. 2012;188(8):3745-3756. doi:10.4049/jimmunol.1102609
97. DeLong JH, O'Hara Hall A, Rausch M, et al. IL-27 and TCR Stimulation Promote T Cell Expression of Multiple Inhibitory Receptors. *ImmunoHorizons*. 2019;3(1):13-25. doi:10.4049/immunohorizons.1800083
98. Niu Q, Huang Z chun, Wu X juan, et al. Enhanced IL-6/phosphorylated STAT3 signaling is related to the imbalance of circulating T follicular helper/T follicular regulatory cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1). doi:10.1186/s13075-018-1690-0
99. Park B V., Freeman ZT, Ghasemzadeh A, et al. TGF β 1-mediated SMAD3 enhances PD-1 expression on antigen-specific T cells in cancer. *Cancer Discov*. 2016;6(12):1366-1381. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1347
100. Terawaki S, Chikuma S, Shibayama S, et al. IFN- α Directly Promotes Programmed Cell Death-1 Transcription and Limits the Duration of T Cell-Mediated Immunity. *J Immunol*. 2011;186(5):2772-2779. doi:10.4049/jimmunol.1003208
101. Liu Y, Liang X, Dong W, et al. Tumor-Repopulating Cells Induce PD-1 Expression in CD8+ T Cells

- by Transferring Kynurenine and AhR Activation. *Cancer Cell*. 2018;33(3):480-494.e7.
doi:10.1016/j.ccell.2018.02.005
102. Pan T, Liu Z, Yin J, Zhou T, Liu J, Qu H. Notch signaling pathway was involved in regulating programmed cell death 1 expression during sepsis-induced immunosuppression. *Mediators Inflamm*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/539841
103. Quatrini L, Wieduwild E, Escaliere B, et al. Endogenous glucocorticoids control host resistance to viral infection through the tissue-specific regulation of PD-1 expression on NK cells. *Nat Immunol*. 2018;19(9):954-962. doi:10.1038/s41590-018-0185-0
104. Franchini DM, Lanvin O, Tosolini M, et al. Microtubule-Driven Stress Granule Dynamics Regulate Inhibitory Immune Checkpoint Expression in T Cells. *Cell Rep*. 2019;26(1):94-107.e7. doi:10.1016/j.celrep.2018.12.014
105. Legat A, Speiser DE, Pircher H, Zehn D, Fuertes Marraco SA. Inhibitory receptor expression depends more dominantly on differentiation and activation than “exhaustion” of human CD8 T cells. *Front Immunol*. 2013;4(DEC). doi:10.3389/fimmu.2013.00455
106. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *Immunity*. 2008;29(6):848-862. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.002
107. Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection. *J Virol*. 2004;78(11):5535-5545. doi:10.1128/jvi.78.11.5535-5545.2004
108. Shin H, Blackburn SD, Blattman JN, Wherry EJ. Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *J Exp Med*. 2007;204(4):941-949. doi:10.1084/jem.20061937
109. Paley MA, Kroy DC, Odorizzi PM, et al. Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science (80-)*. 2012;338(6111):1220-1225. doi:10.1126/science.1229620

110. Chang CH, Pearce EL. Emerging concepts of T cell metabolism as a target of immunotherapy. *Nat Immunol*. 2016;17(4):364-368. doi:10.1038/ni.3415
111. Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. Fuel feeds function: Energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(11):844-852. doi:10.1038/nri1710
112. Buck MD, O'Sullivan D, Pearce EL. T cell metabolism drives immunity. *J Exp Med*. 2015;212(9):1345-1360. doi:10.1084/jem.20151159
113. Menk A V., Scharping NE, Moreci RS, et al. Early TCR Signaling Induces Rapid Aerobic Glycolysis Enabling Distinct Acute T Cell Effector Functions. *Cell Rep*. 2018;22(6):1509-1521. doi:10.1016/j.celrep.2018.01.040
114. Patsoukis N, Brown J, Petkova V, Liu F, Li L, Boussiotis VA. Selective effects of PD-1 on Akt and ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Sci Signal*. 2012;5(230). doi:10.1126/scisignal.2002796
115. Kao C, Oestreich KJ, Paley MA, et al. T-bet represses expression of PD-1 and sustains virus-specific CD8 T cell responses during chronic infection. *Nat Immunol*. 2011;12(7):663-671. doi:10.1038/ni.2046.T-bet
116. Zhou X, Yu S, Zhao DM, Harty JT, Badovinac VP, Xue HH. Differentiation and Persistence of Memory CD8+ T Cells Depend on T Cell Factor 1. *Immunity*. 2010;33(2):229-240. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.002
117. Man K, Gabriel SS, Liao Y, et al. Transcription Factor IRF4 Promotes CD8+ T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection. *Immunity*. 2017;47(6):1129-1141.e5. doi:10.1016/j.immuni.2017.11.021
118. Khan O, Giles JR, McDonald S, et al. TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion. *Nature*. 2019;571(7764):211-218. doi:10.1038/s41586-019-1325-x

119. Sekine T, Perez-Potti A, Nguyen S, et al. TOX is expressed by exhausted and polyfunctional human effector memory CD8+ T cells. *Sci Immunol*. 2020;5(49).
doi:10.1126/sciimmunol.aba7918
120. Beltra JC, Manne S, Abdel-Hakeem MS, et al. Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity*. 2020;52(5):825-841.e8. doi:10.1016/j.immuni.2020.04.014
121. Seo H, Chen J, González-Avalos E, et al. TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8+ T cell exhaustion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(25):12410-12415. doi:10.1073/pnas.1905675116
122. Sen DR, Kaminski J, Barnitz RA, et al. The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science (80-)*. 2016;354(6316):1165-1169. doi:10.1126/science.aae0491
123. Youngblood B, Oestreich KJ, Ha SJ, et al. Chronic Virus Infection Enforces Demethylation of the Locus that Encodes PD-1 in Antigen-Specific CD8+ T Cells. *Immunity*. 2011;35(3):400-412.
doi:10.1016/j.immuni.2011.06.015
124. Pauken KE, Sammons MA, Odorizzi PM, et al. HHS Public Access reinvigoration by PD-1 blockade. *Science (80-)*. 2016;354(6316):1160-1165. doi:10.1126/science.aaf2807.Epigenetic
125. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med*. 2006;203(10):2281-2292. doi:10.1084/jem.20061496
126. Frebel H, Nindl V, Schuepbach RA, et al. Programmed death 1 protects from fatal circulatory failure during systemic virus infection of mice. *J Exp Med*. 2012;209(13):2485-2499.
doi:10.1084/jem.20121015
127. Doedens AL, Phan AT, Stradner MH, et al. Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8 + T cells to persistent antigen. *Nat Immunol*. 2013;14(11):1173-1182.
doi:10.1038/ni.2714

128. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med*. 1998;188(12):2205-2213.
doi:10.1084/jem.188.12.2205
129. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*. 2009;10(1):29-37.
doi:10.1038/ni.1679
130. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006;439(7077):682-687. doi:10.1038/nature04444
131. Ghoneim HE, Fan Y, Moustaki A, et al. De Novo Epigenetic Programs Inhibit PD-1 Blockade-Mediated T Cell Rejuvenation. *Cell*. 2017;170(1):142-157.e19. doi:10.1016/j.cell.2017.06.007
132. Alfei F, Kanev K, Hofmann M, et al. TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. *Nature*. 2019. doi:10.1038/s41586-019-1326-9
133. Jin HT, Anderson AC, Tan WG, et al. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(33):14733-14738.
doi:10.1073/pnas.1009731107
134. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, et al. The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8+ T Cell Effector Function. *Cancer Cell*. 2014;26(6):923-937.
doi:10.1016/j.ccell.2014.10.018
135. Clerici M, Wynn TA, Berzofsky JA, et al. Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Invest*. 1994;93(2):768-775. doi:10.1172/JCI117031
136. Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, et al. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8+ T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest*. 2004;113(7):963-972.
doi:10.1172/jci20515

137. Rico MA, Quiroga JA, Subirá D, et al. Hepatitis B virus-specific T-cell proliferation and cytokine secretion in chronic hepatitis B e antibody-positive patients treated with ribavirin and interferon alfa. *Hepatology*. 2001;33(1):295-300. doi:10.1053/jhep.2001.21147
138. Raziorrouh B, Schraut W, Gerlach T, et al. The immunoregulatory role of CD244 in chronic hepatitis B infection and its inhibitory potential on virus-specific CD8+ T-cell function. *Hepatology*. 2010;52(6):1934-1947. doi:10.1002/hep.23936
139. Schurich A, Khanna P, Lopes AR, et al. Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-prone CD8 T cells in persistent hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2011;53(5):1494-1503. doi:10.1002/hep.24249
140. Zhang Z, Zhang JY, Wherry EJ, et al. Dynamic Programmed Death 1 Expression by Virus-Specific CD8 T Cells Correlates With the Outcome of Acute Hepatitis B. *Gastroenterology*. 2008;134(7). doi:10.1053/j.gastro.2008.03.037
141. Kroy DC, Ciuffreda D, Cooperrider JH, et al. Liver environment and HCV replication affect human T-cell phenotype and expression of inhibitory receptors. *Gastroenterology*. 2014;146(2):550-561. doi:10.1053/j.gastro.2013.10.022
142. Nakamoto N, Cho H, Shaked A, et al. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog*. 2009;5(2). doi:10.1371/journal.ppat.1000313
143. Okwor CIA, Oh JS, Crawley AM, Cooper CL, Lee SH. Expression of Inhibitory Receptors on T and NK Cells Defines Immunological Phenotypes of HCV Patients with Advanced Liver Fibrosis. *iScience*. 2020;23(9). doi:10.1016/j.isci.2020.101513
144. Ackermann C, Smits M, Woost R, et al. HCV-specific CD4+ T cells of patients with acute and chronic HCV infection display high expression of TIGIT and other co-inhibitory molecules. *Sci Rep*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-47024-8

145. Buggert M, Tauriainen J, Yamamoto T, et al. T-bet and Eomes Are Differentially Linked to the Exhausted Phenotype of CD8+ T Cells in HIV Infection. *PLoS Pathog.* 2014;10(7). doi:10.1371/journal.ppat.1004251
146. Chew GM, Fujita T, Webb GM, et al. TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection. *PLoS Pathog.* 2016;12(1). doi:10.1371/journal.ppat.1005349
147. Wang S, Zhang Q, Hui H, Agrawal K, Karris MAY, Rana TM. An atlas of immune cell exhaustion in HIV-infected individuals revealed by single-cell transcriptomics. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):2333-2347. doi:10.1080/22221751.2020.1826361
148. Dekeyser M, Ladrière M, Audonnet S, Frimat L, De Carvalho Bittencourt M. An Early Immediate Early Protein IE-1–Specific T-Cell Polyfunctionality Is Associated With a Better Control of Cytomegalovirus Reactivation in Kidney Transplantation. *Kidney Int Reports.* 2017;2(3):486-492. doi:10.1016/j.ekir.2017.02.016
149. Choi YJ, Kim SB, Kim JH, et al. Impaired polyfunctionality of CD8+ T cells in severe sepsis patients with human cytomegalovirus reactivation. *Exp Mol Med.* 2017;49(9):e382. doi:10.1038/emm.2017.146
150. Del Bello A, Kamar N, Vergez F, et al. Adaptive lymphocyte profile analysis discriminates mild and severe forms of COVID-19 after solid organ transplantation. *Kidney Int.* June 2021. doi:10.1016/j.kint.2021.05.032
151. Tan CS, Bord E, Broge TA, et al. Increased program cell death-1 expression on T lymphocytes of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012;60(3):244-248. doi:10.1097/QAI.0b013e31825a313c
152. Rauer S, Marks R, Urbach H, et al. Treatment of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy with Pembrolizumab. *N Engl J Med.* 2019;380(17):1676-1677. doi:10.1056/nejmc1817193

153. Walter O, Treiner E, Bonneville F, et al. Treatment of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy with Nivolumab. *N Engl J Med*. 2019;380(17):1674-1676. doi:10.1056/nejmc1816198
154. Medrano C, Vergez F, Mengelle C, Faguer S, Kamar N, Bello A Del. Effectiveness of immune checkpoint inhibitors in transplant recipients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(11):2145-2147. doi:10.3201/eid2511.190705
155. Brahmamdam P, Inoue S, Unsinger J, Chang KC, McDunn JE, Hotchkiss RS. Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *J Leukoc Biol*. 2010;88(2):233-240. doi:10.1189/jlb.0110037
156. Guinault D, Nicolau-Travers M-L, Silva S, et al. Expression of Exhaustion Markers on CD8+ T-Cell Patterns Predict Outcomes in Septic Patients Admitted to the ICU*. *Crit Care Med*. 2021;49(9):1513-1523. doi:10.1097/ccm.0000000000005047
157. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-421. doi:10.1038/nature12477
158. Van Rooij N, Van Buuren MM, Philips D, et al. Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J Clin Oncol*. 2013;31(32). doi:10.1200/JCO.2012.47.7521
159. Fridman WH, Pagès F, Sauts-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298-306. doi:10.1038/nrc3245
160. Boon T, Coulie PG, Van Den Eynde BJ, Van Der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:175-208. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090733
161. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1-10. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012

162. Zheng Y, Delgoffe GM, Meyer CF, Chan W, Powell JD. Anergic T Cells Are Metabolically Anergic. *J Immunol.* 2009;183(10):6095-6101. doi:10.4049/jimmunol.0803510
163. Chang CH, Qiu J, O'Sullivan D, et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell.* 2015;162(6):1229-1241. doi:10.1016/j.cell.2015.08.016
164. Altman BJ, Stine ZE, Dang C V. From Krebs to clinic: Glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(10):619-634. doi:10.1038/nrc.2016.71
165. Julliard W, Fechner JH, Mezrich JD. The aryl hydrocarbon receptor meets immunology: Friend or foe? A little of both. *Front Immunol.* 2014;5(OCT). doi:10.3389/fimmu.2014.00458
166. Munder M, Choi BS, Rogers M, Kropf P. L-Arginine deprivation impairs Leishmania major-specific T-cell responses. *Eur J Immunol.* 2009;39(8):2161-2172. doi:10.1002/eji.200839041
167. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(12):717-734. doi:10.1038/nrclinonc.2017.101
168. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* 2013;14(10):1014-1022. doi:10.1038/ni.2703
169. Speiser DE, Ho PC, Verdeil G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(10):599-611. doi:10.1038/nri.2016.80
170. Zarour HM. Reversing T-cell dysfunction and exhaustion in cancer. *Clin Cancer Res.* 2016;22(8):1856-1864. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1849
171. Miller BC, Sen DR, Al Abosy R, et al. Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol.* 2019;20(3):326-336. doi:10.1038/s41590-019-0312-6
172. Baitsch L, Baumgaertner P, Devèvre E, et al. Exhaustion of tumor-specific CD8+ T cells in

- metastases from melanoma patients. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2350-2360.
doi:10.1172/JCI46102
173. Li H, van der Leun AM, Yofe I, et al. Dysfunctional CD8 T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma. *Cell*. 2019;176(4):775-789.e18.
doi:10.1016/j.cell.2018.11.043
174. Brummelman J, Mazza EMC, Alvisi G, et al. High-dimensional single cell analysis identifies stemlike cytotoxic CD8+T cells infiltrating human tumors. *J Exp Med*. 2018;215(10):2520-2535.
doi:10.1084/JEM.20180684
175. Robert C, Long G V., Brady B, et al. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. *N Engl J Med*. 2015;372(4):320-330. doi:10.1056/nejmoa1412082
176. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627-1639.
doi:10.1056/nejmoa1507643
177. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2015;373(19):1803-1813. doi:10.1056/nejmoa1510665
178. Balar A V., Galsky MD, Rosenberg JE, et al. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*. 2017;389(10064):67-76. doi:10.1016/S0140-6736(16)32455-2
179. Seiwert TY, Burtneß B, Mehra R, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(7):956-965.
doi:10.1016/S1470-2045(16)30066-3
180. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-Versus-Leukemia Reactions After Bone

- Marrow Transplantation. *Blood*. 1990;75(3):555-562. doi:10.1182/BLOOD.V75.3.555.555
181. Davids MS, Kim HT, Bachireddy P, et al. Ipilimumab for Patients with Relapse after Allogeneic Transplantation. *N Engl J Med*. 2016;375(2):143-153. doi:10.1056/nejmoa1601202
182. Penter L, Zhang Y, Savell A, et al. Molecular and cellular features of CTLA-4 blockade for relapsed myeloid malignancies after transplantation. *Blood*. 2021;137(23):3212-3217. doi:10.1182/blood.2021010867
183. Noviello M, Manfredi F, Ruggiero E, et al. Bone marrow central memory and memory stem T-cell exhaustion in AML patients relapsing after HSCT. *Nat Commun*. 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-08871-1
184. Redmond WL, Sherman LA. Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. *Immunity*. 2005;22(3):275-284. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.010
185. Clark M, Kroger CJ, Ke Q, Tisch RM. The Role of T Cell Receptor Signaling in the Development of Type 1 Diabetes. *Front Immunol*. 2021;11. doi:10.3389/fimmu.2020.615371
186. Amranl A, Verdaguer J, Serra P, Tafuro S, Tan R, Santamaria P. Progression of autoimmune diabetes driven by avidity maturation of a T- cell population. *Nature*. 2000;406(6797):739-742. doi:10.1038/35021081
187. McKinney EF, Lyons PA, Carr EJ, et al. A CD8+ T cell transcription signature predicts prognosis in autoimmune disease. *Nat Med*. 2010;16(5):586-591. doi:10.1038/nm.2130
188. Ciubotariu R, Liu Z, Colovai AI, et al. Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts. *J Clin Invest*. 1998;101(2):398-405. doi:10.1172/JCI1117
189. Steger U, Denecke C, Sawitzki B, Karim M, Jones ND, Wood KJ. Exhaustive differentiation of alloreactive CD8+ T cells: Critical for determination of graft acceptance or rejection. *Transplantation*. 2008;85(9):1339-1347. doi:10.1097/TP.0b013e31816dd64a

190. Sun J, Sheil AGR, Wang C, et al. Tolerance to rat liver allografts: IV. Acceptance depends on the quantity of donor tissue and on donor leukocytes. *Transplantation*. 1996;62(12):1725-1730. doi:10.1097/00007890-199612270-00005
191. Wang L, Han R, Hancock WW. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand PD-L1 are required for allograft tolerance. *Eur J Immunol*. 2007;37(10):2983-2990. doi:10.1002/eji.200737583
192. Özkaynak E, Wang L, Goodearl A, et al. Programmed Death-1 Targeting Can Promote Allograft Survival. *J Immunol*. 2002;169(11):6546-6553. doi:10.4049/jimmunol.169.11.6546
193. Lee I, Wang L, Wells AD, et al. Blocking the Monocyte Chemoattractant Protein-1/CCR2 Chemokine Pathway Induces Permanent Survival of Islet Allografts through a Programmed Death-1 Ligand-1-Dependent Mechanism. *J Immunol*. 2003;171(12):6929-6935. doi:10.4049/jimmunol.171.12.6929
194. Bara Sarraj, Junsheng Yeb, Ahmed Ibrahim Akl, Guodong Chen, Jiao-Jing Wang, Zheng Zhang FA, Michael Abecassis, Stephen D. Miller, Geoffrey S. Kans and MJA. Impaired selectin-dependent leukocyte recruitment induces T-cell exhaustion and prevents chronic allograft vasculopathy and rejection. *PNAS*. 2014;111(33):12145–12150.
195. Wu J, Zhang H, Shi X, et al. Ablation of Transcription Factor IRF4 Promotes Transplant Acceptance by Driving Allogenic CD4+ T Cell Dysfunction. *Immunity*. 2017;47(6):1114-1128.e6. doi:10.1016/j.immuni.2017.11.003
196. Zou D, Dai Y, Zhang X, et al. T cell exhaustion is associated with antigen abundance and promotes transplant acceptance. *Am J Transplant*. 2020;20(9):2540-2550. doi:10.1111/ajt.15870
197. Qiao X, Jiang K, Nie J, et al. Increased expression of tim-3 and its ligand Galectin-9 in rat allografts during acute rejection episodes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;445(3):542-

548. doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.167
198. Boenisch O, D'Addio F, Watanabe T, et al. TIM-3: A Novel Regulatory Molecule of Alloimmune Activation. *J Immunol*. 2010;185(10):5806-5819. doi:10.4049/jimmunol.0903435
199. He W, Fang Z, Wang F, et al. Galectin-9 significantly prolongs the survival of fully mismatched cardiac allografts in mice. *Transplantation*. 2009;88(6):782-790.
doi:10.1097/TP.0b013e3181b47f25
200. Wang F, He W, Yuan J, et al. Activation of Tim-3-Galectin-9 pathway improves survival of fully allogeneic skin grafts. *Transpl Immunol*. 2008;19(1):12-19. doi:10.1016/j.trim.2008.01.008
201. Starzl TE, Zinkernagel RM. Antigen Localization and Migration in Immunity and Tolerance. *N Engl J Med*. 1998;339(26):1905-1913. doi:10.1056/nejm199812243392607
202. Savage TM, Shonts BA, Lau S, et al. Deletion of donor-reactive T cell clones after human liver transplant. *Am J Transplant*. 2019. doi:10.1111/ajt.15592
203. Nakid-Cordero C, Choquet S, Gauthier N, et al. Distinct immunopathological mechanisms of EBV-positive and EBV-negative posttransplant lymphoproliferative disorders. *Am J Transplant*. 2021;21(8). doi:10.1111/ajt.16547
204. Ko Y, Yeon Kim J, Kim SH, et al. Acute rejection and infectious complications in abo- and hla-incompatible kidney transplantations. *Ann Transplant*. 2020;25:e927420-1-e927420-10.
doi:10.12659/AOT.927420
205. Del Bello A, Kamar N, Treiner E. T cell reconstitution after lymphocyte depletion features a different pattern of inhibitory receptor expression in ABO- versus HLA-incompatible kidney transplant recipients. *Clin Exp Immunol*. 2020;200(1). doi:10.1111/cei.13412
206. Ros J, Matos I, Martin-Liberal J. Immunotherapy in organ-transplanted cancer patients: efficacy and risk of organ rejection. *Ann Oncol*. 2019;30(7):1173-1177.

doi:10.1093/annonc/mdz129

207. Kumar V, Shinagare AB, Rennke HG, et al. The Safety and Efficacy of Checkpoint Inhibitors in Transplant Recipients: A Case Series and Systematic Review of Literature. *Oncologist*. 2020;25(6):505-514. doi:10.1634/theoncologist.2019-0659
208. Mejia CD, Frank AM, Singh P, Yadav A. Immune checkpoint inhibitor therapy-associated graft intolerance syndrome in a failed kidney transplant recipient. *Am J Transplant*. 2021;21(3):1322-1325. doi:10.1111/ajt.16326
209. Dang N, Waer M, Sprangers B, Lin Y. Intratumoral immunotherapy with anti-PD-1 and TLR9 agonist induces systemic antitumor immunity without accelerating rejection of cardiac allografts. *Am J Transplant*. 2021;21(1):60-72. doi:10.1111/ajt.16105
210. Tsung I, Worden FP, Fontana RJ. A Pilot Study of Checkpoint Inhibitors in Solid Organ Transplant Recipients with Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Oncologist*. 2021;26(2):133-138. doi:10.1002/onco.13539
211. Gudmundsdottir H, Turka LA. A Closer Look at Homeostatic Proliferation of CD4 + T Cells: Costimulatory Requirements and Role in Memory Formation. *J Immunol*. 2001;167(7):3699-3707. doi:10.4049/jimmunol.167.7.3699
212. Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the Frequency of Alloreactive T Cells In Vivo: New Answers to an Old Question. *J Immunol*. 2001;166(2):973-981. doi:10.4049/jimmunol.166.2.973
213. Ghobrial II, Morris AG, Booth LJ. Clinical significance of in vitro donor-specific hyporesponsiveness in renal allograft recipients as demonstrated by the MLR. *Transpl Int*. 1994;7(6):420-427. doi:10.1007/BF00346036
214. Tanaka Y, Tashiro H, Onoe T, Ide K, Ishiyama K, Ohdan H. Optimization of immunosuppressive therapy based on a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious

- complications and mortality in living donor liver transplant recipients. *Transplant Proc.* 2012;44(2):555-559. doi:10.1016/j.transproceed.2012.01.038
215. Mashishi T, Gray CM. The ELISPOT assay: An easily transferable methods for measuring cellular responses and identifying T cell epitopes. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40(9):903-910. doi:10.1515/cclm.2002.159
216. Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. I. Data analysis. *J Immunol.* 1981;126(4):1614-1619. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7009746/>. Accessed November 16, 2021.
217. Bestard O, Meneghini M, Crespo E, et al. Preformed T cell alloimmunity and HLA eplet mismatch to guide immunosuppression minimization with tacrolimus monotherapy in kidney transplantation: Results of the CELLIMIN trial. *Am J Transplant.* 2021;21(8):2833-2845. doi:10.1111/ajt.16563
218. Bonnefoix T, Bonnefoix P, Callanan M, Verdiel P, Sotto J-J. Graphical Representation of a Generalized Linear Model-Based Statistical Test Estimating the Fit of the Single-Hit Poisson Model to Limiting Dilution Assays. *J Immunol.* 2001;167(10):5725-5730. doi:10.4049/jimmunol.167.10.5725
219. Cattell EL, Cunningham AC, Bal W, Taylor RMR, Dark JH, Kirby JA. Limiting dilution analysis: quantification of IL-2 producing allospecific lymphocytes after renal and cardiac transplantation. *Transpl Immunol.* 1994;2(4):300-307. doi:10.1016/0966-3274(94)90006-X
220. Reader JA, Burke MM, Counihan P, et al. Noninvasive monitoring of human cardiac allograft rejection. *Transplantation.* 1990;50(1):29-33. doi:10.1097/00007890-199007000-00006
221. Fischer M, Leyking S, Schäfer M, et al. Donor-specific alloreactive T cells can be quantified from whole blood, and may predict cellular rejection after renal transplantation. *Eur J Immunol.* 2017;47(7):1220-1231. doi:10.1002/eji.201646826

222. Brinke A Ten, Marek-Trzonkowska N, Mansilla MJ, et al. Monitoring T-cell responses in translational studies: Optimization of dye-based proliferation assay for evaluation of antigen-specific responses. *Front Immunol*. 2017;8(DEC). doi:10.3389/fimmu.2017.01870
223. Ling X, Xiong J, Liang W, et al. Can immune cell function assay identify patients at risk of infection or rejection? A meta-analysis. *Transplantation*. 2012;93(7):737-743. doi:10.1097/TP.0b013e3182466248
224. Fribourg M, Anderson L, Fischman C, et al. T-cell exhaustion correlates with improved outcomes in kidney transplant recipients. *Kidney Int*. 2019;96(2):436-449. doi:10.1016/j.kint.2019.01.040
225. Cravedi P, Fribourg M, Zhang W, et al. Distinct peripheral blood molecular signature emerges with successful tacrolimus withdrawal in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2020;20(12):3477-3485. doi:10.1111/ajt.15979
226. Staron MM, Gray SM, Marshall HD, et al. The Transcription Factor FoxO1 Sustains Expression of the Inhibitory Receptor PD-1 and Survival of Antiviral CD8+ T Cells during Chronic Infection. *Immunity*. 2014;41(5):802-814. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.013
227. Taylor HE, Calantone NA, D'Aquila RT. MTOR signaling mediates effects of common gamma-chain cytokines on T cell proliferation and exhaustion: Implications for HIV-1 persistence and cure research. *AIDS*. 2018;32(18):2847-2851. doi:10.1097/QAD.0000000000001997
228. Bengsch B, Johnson AL, Kurachi M, et al. Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8+ T Cell Exhaustion. *Immunity*. 2016;45(2):358-373. doi:10.1016/j.immuni.2016.07.008
229. Sun H, Hartigan CR, Chen C wen, et al. TIGIT regulates apoptosis of risky memory T cell subsets implicated in belatacept-resistant rejection. *Am J Transplant*. 2021. doi:10.1111/ajt.16571

II Travail personnel

- Différence d'expression de récepteurs inhibiteurs après traitement déplétant par sérum anti-lymphocytaire après greffe rénale ABO ou HLA incompatible.....100
- Une diminution de la réponse T apparait au cours de la transplantation rénale, lié à une modification de la balance de l'axe TIGIT/CD226 dans les CD4+ et de la co-expression PD-1+ TIGIT dans les CD8+ 141
- Absence d'efficacité des inhibiteurs du checkpoint immun chez les patients greffés rénaux atteints d'une LEMP..... 207
- Analyse du profil lymphocytaire adaptatif au cours des formes légères et sévères des infections à COVID-19 chez des patients transplantés d'organe solide..... 223

III Perspectives 279

Conclusion 286

INDEX

Table 1 Présentation, causes, aspect fonctionnel et phénotypique associé à différents états dysfonctionnels lymphocytaires.....	46
Table 2 Perte hiérarchique de la fonction inflammatoire, proliférative, cytotoxique et majoration de la réponse apoptotique durant le développement de l'épuisement lymphocytaire T CD8+	48
Figure 1. Les différentes voies de reconnaissance de la réponse alloimmune	49
Figure 2. Définition de l'épuisement lymphocytaire T CD8+ au cours d'une stimulation antigénique chronique	50
Figure 3. Mécanismes d'expression des différents récepteurs inhibiteurs	53
Figure 4. Présentation des différents mécanismes d'expression par lesquels les molécules inhibitrices exercent leur rôle de régulation négative	54
Figure 5. Modifications métaboliques observées au cours de l'épuisement lymphocytaire T	56
Figure 6. Modifications épigénétiques au cours de l'épuisement lymphocytaire T	57
Figure 7. Techniques d'analyse in vivo des cellules T alloréactives	59

Liste des Abréviations

ELT, Epuisement lymphocytaire T

IL, Interleukine

TCR, T-cell Receptor

DAMPs, Damage-Associated Molecular Patterns

TLR, Toll-Like Receptors

LCMV, Virus de la ChorioMéningite Lymphocytaire

PD-1, Program- cell Death 1

PD-L1, Program-cell Death Ligand 1

PDL-2, Program-cell Death Ligand 2

TIGIT, T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains

Tim-3, T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3

LAG-3, Lymphocyte activation gene 3

CTLA-4, Cytotoxic T Lymphocyte Activated protein 4

NRP1, Neuropilin 1

T-Bet, T Box expressed in T cells

EOMES, Eomesodermin

TCF-1, T cell factor 1

NFAT, Nuclear Factor of Activated T cells

AP-1, Activated Protein 1

KLRG-1, Killer cell Lectin-like Receptor subfamily G member 1

mTOR, mammalian T Of Rapamycin

imTOR, inhibiteur de la mammalian T Of Rapamycin

ATP, Adénosine TriPhosphate

MLR, Mixed Lymphocyte Reaction (Réaction lymphocytaire mixte)

II Travail personnel

Comme précédemment évoque, il est nécessaire en transplantation d'organes d'obtenir des biomarqueurs plus robustes, permettant une individualisation de la délivrance des immunosuppresseurs, afin de limiter à long terme les effets de ces traitements.

Pour ce faire, une meilleure connaissance des processus adaptatifs du système immunitaire post greffe est nécessaire. De plus, l'utilisation de molécules visant à bloquer les récepteurs inhibiteurs afin de stimuler l'immunité dans les pathologies virales et carcinologiques est de plus en plus fréquente. Ces complications étant courantes après transplantation, la question d'utiliser ce type de traitement conceptuellement antinomique avec la prise d'un traitement immunosuppresseur se pose. Une connaissance fine des mécanismes mis en jeu chez les patients greffés en dehors et au cours de ce type de pathologie pourrait permettre d'ajuster la stratégie thérapeutique et limiter le risque de complications graves qui peuvent en découler (comme par exemple l'absence d'efficacité, ou le rejet de greffe).

Pour ces raisons nous nous sommes intéressés à cet état dysfonctionnel qu'est l'épuisement lymphocytaire T en dehors d'un contexte pathologique (lors de la reconstitution lymphocytaire T après utilisation de sérum anti-lymphocytaire chez des patients greffés ABO ou HLA incompatibles, et chez des patients n'ayant pas reçu de traitement d'induction) ainsi qu'au cours de 2 situations infectieuses (infection à JC-virus responsable d'une leucoencéphalopathie multifocale progressive, et infection à SARS-CoV-2).

1. Différence d'expression de récepteurs inhibiteurs après traitement déplétant par sérum anti-lymphocytaire après greffe rénale ABO ou HLA incompatible

Ce travail a fait l'objet

- D'une publication scientifique dans le *Clinical & Experimental Immunology*
- D'une communication orale à la Société Francophone de Transplantation (2019)

En transplantation rénale, deux types de greffe avec incompatibilité immunologique existent : d'une part la greffe avec anticorps préformés contre des protéines du système HLA du donneur (ou plus rarement d'autres protéines exprimées par les cellules endothéliales du donneur), et les greffes à travers des groupes sanguins non compatibles. Les mécanismes de réaction allo-immune intervenant dans ces deux situations diffèrent. Il s'agit dans la greffe ABO incompatible (où la cible antigénique est un polysaccharide) d'une réaction T-indépendante de type 2, alors que ce le mécanisme est T dépendant pour les greffes avec anticorps préformé anti-HLA. Les résultats sont également très différents : alors qu'en greffe ABO incompatible une légère augmentation dans la première année du risque de décès du patient (principalement par un sur-risque infectieux) et de perte de greffon (principalement par une augmentation du risque d'infection à BK-virus, et de rejet dans les premières semaines de greffe) est rapportée, les résultats à moyen et long terme sont similaires à ceux observés en greffe standard, sans anticorps préformé. Au contraire en greffe avec anticorps préformé contre le système HLA ou une autre protéine endothéliale du donneur, une augmentation du

risque infectieux et du risque de rejet est notée tout au long de l'évolution, et les résultats à long terme sont nettement moins bon qu'en greffe standard.

Dans ces deux types de greffe, une même immunosuppression est proposée au patient au dans notre centre (CHU de Toulouse, Département de Néphrologie et Transplantation d'Organes) avec une induction T et B déplétante par sérum anti-lymphocytaire et rituximab, associé à une ou plusieurs séances d'aphérèse (selon le titre de l'anticorps à déléter) et un traitement de maintenance par tacrolimus, acide mycophénolique, et corticoïdes.

Nous avons cherché à déterminer via une étude transversale, par analyse cytométrique si des différences d'expression de certains récepteurs inhibiteurs apparaissaient au cours de la reconstitution immune suivant l'injection des traitements déplétants. Dans cette première étude nous nous sommes intéressés aux molécules les plus classiquement décrites dans l'épuisement : PD-1, 2B4, et TIGIT, ainsi qu'un marqueur de sénescence, le CD57. Nous avons également réalisé une étude fonctionnelle (TNF α , IL-2, IFN γ) de ces cellules en fonction de l'expression de ces récepteurs inhibiteurs.

Nous avons ainsi pu montrer des différences d'expression de certains récepteurs, TIGIT en particulier, associées à une perte de certaines associations entre expression du récepteur et profil fonctionnel.

T-Cell Reconstitution after Lymphocyte Depletion Features a Different Pattern of Inhibitory Receptor Expression in ABO-Versus HLA-Incompatible Kidney Transplant Recipients

Arnaud Del Bello^{1,2,3}, Nassim Kamar^{1,2,3}, Emmanuel Treiner^{2,3,4}

¹ Nephrology and Organ Transplant Department, CHU Toulouse, France.

² Université Paul Sabatier Toulouse III, France.

³ Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan (CPTP), INSERM UMR1043-CNRS 5282, Toulouse, France.

⁴ Laboratory of Immunology, Biology Department, CHU Toulouse, France

Corresponding Authors:

delbello.a@chu-toulouse.fr

[Nephrologie and Organ Transplant Department, CHU de Toulouse](#)

[1, avenue Jean Poulhes, 31059 Toulouse Cedex 9, France.](#)

Emmanuel.treiner@inserm.fr

[Laboratory of Immunology, CHU de Toulouse](#)

[Place du Dr Baylac, 31000 Toulouse, France.](#)

Abstract word count: 199

Manuscript word count: 4216

Number of Figures: 6

Number of Table: 1

Supplementary Table: 2

Supplementary Figure 1

Keywords: Transplantation – Immune exhaustion – T cells – inhibitory receptors – cytokines – graft rejection- Donor specific antibodies.

Abbreviations

HLAi, HLA incompatible; ABOi, ABO incompatible; KT, Kidney Transplantation; CNIs, Calcineurin Inhibitors; IR, Inhibitory Receptor; PD-1, Programmed Death- 1 receptor; TIGIT, T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains; CD4m, CD4memory T cells; CD8m, memory CD8 T cells

Short Title

IR expression in kidney transplantation

Abstract

Chronic antigen stimulation can lead to immune exhaustion (a state of T cell dysfunction). Several phenotypic signatures of T cell exhaustion have been described in various pathological situations, characterized by aberrant expression of multiple inhibitory receptors (IR). This signature has been barely studied in the context of allogenic organ transplantation. We undertook a cross-sectional analysis of the expression of IR (CD244, CD279, TIGIT and CD57) and their correlation with cytokine-producing functions in T cells reconstituting after lymphocyte depletion in patients transplanted from living donors, with preformed donor-specific antibodies. After ABO incompatible transplantation, T cells progressively acquired a phenotype similar to healthy donors, and the expression of several IR marked cells with increased functions, with the exception of TIGIT, which was associated with decreased cytokine production. In stark contrast, T cell reconstitution in patients with anti-HLA antibodies was characterized with an increased co-expression of IR by T cells, and specifically by an increased expression of TIGIT. Furthermore, expression of these receptors was no longer directly correlated to cytokine production. These results suggest that T cell alloreactivity in HLA-incompatible kidney transplantation drives an aberrant T cell reconstitution with respect to IR profile, which could have an impact on the transplantation outcome.

Introduction

With regards to organ shortage, transplanting a kidney across immunological barriers is frequently required. Two different situations, with different issues, encompass incompatible KT. HLA-incompatible (HLAi) KT is known to be associated with a high risk of graft rejection and poor long-term outcomes (1, 2). However, transplantation across the ABO blood group barrier leads to similar outcomes comparing with ABO-compatible KT (3-5). Nonetheless, the treatment used in both incompatible KTs is similar, including (i) the use of multiple maintenance immunosuppressive therapies, such as calcineurin inhibitors (CNIs), antimetabolites, or m-TOR inhibitors, (ii) the pre-transplant elimination of circulating antibodies by apheresis sessions, and (iii) the depletion of B cells with anti-CD20 monoclonal antibody, associated with a T-cell targeting agent, resulting in almost complete elimination of circulating lymphocytes, including, T, B and NK cells (6, 7). Following this conditioning, lymphocytes populations will be progressively reconstituted in the periphery. It is well described that CD8⁺ T cells are rapidly re-emerging, whereas the reconstitution of CD4⁺ T cells is a slower process that takes years to complete (8). It was previously observed that a slow CD4 T cells reconstitution was associated with an increased susceptibility to infections, but also risk of chronic rejection (9, 10).

Nowadays, consequences of the use of multiple target immunosuppressive treatments, such as infectious complications and cancer, are a major pitfall (11, 12). Unfortunately, until now, biomarkers to monitor the depth of immunosuppression are lacking.

T cell responses are induced by TCR triggering but regulated through multiple interactions between co-stimulatory or co-inhibitory pairs of receptors (13). In recent years, there have been great advances in our knowledge regarding inhibitory receptors (IR) expression and functions (14). These IRs are mostly induced physiologically to modulate TCR-dependent activation as a negative feedback. However, the prolonged expression of some of these IRs, as well as their excessive co-expression, may lead to a state of potentially reversible dysfunction known as immune exhaustion (15). This phenomenon has been the focus of many studies in the context of chronic viral infections and cancer, leading to the development of new immune-based strategies to reverse these pathological conditions (16). Allogenic transplantation is a stereotypical condition where chronic stimulation of T cells occurs, and where immune exhaustion could be encountered (17). There is recent evidence that this phenomenon could be induced in animal models (18), and could predict allograft function in humans (19). However, the phenotype of T cells with respect to IR expression, and the description of a potential immune exhaustion phenomenon, has not been thoroughly investigated thus far in organ transplantation.

In this work, we investigated the pattern of IR expression and their association with T cell functions in a cross-sectional study of incompatible living-donor kidney-transplant recipients who received polyclonal antibodies associated with B-cell depleting agents and maintenance immunosuppressive treatments. This allowed us to study the dynamics of IR expression in repopulating T cells at various times post-transplantation in the context of alloreactivity.

Materials and Methods

Patients and Samples: Between 2011 and 2017, 114 living-donor incompatible KT were performed. All recipients that received a living-donor ABOi or HLAi KT were offered to participate in the study. Double incompatible KT were excluded from this study (n=17), as well as ABOi or HLAi kidney transplant recipients that received anti-IL-2 receptor blockers at induction (n=34), or patients that were no longer followed in our center during the sampling phase (n=16). Two recipients died before the sampling phase of the study and were excluded, as well as nine recipients who returned to dialysis before the sampling phase. Finally, 36 patients (18 ABOi and 18 HLAi living-donor KT) were included (Figure S1). All of them was tested only one time post transplantation. All of them received an informed consent. The study was approved by an independent ethics committee and declared on www.clinicaltrials.gov (RCT31/17/0426). Blood samples of 15 healthy donors were obtained from blood donors provided by French blood bank donors.

Cytometry Analysis: All blood samples were drawn by venipuncture in EDTA and heparin collection tubes, and transferred within 4 hours to the laboratory of immunology for analysis.

Cell Surface Staining: All stainings were performed directly on whole EDTA blood, within 8h after collection. Briefly, 100 μ L of whole blood were incubated for 15 min with the appropriate concentrations of monoclonal antibodies at room temperature (RT) in the dark. For determination of the concentrations of the major blood lymphocyte subsets (TCD4, TCD8, B, NK cells), blood samples were fixed and lysed with the TQ-prep workstation (Beckman Coulter), according to the manufacturer's instructions. 100 μ L of flow-count fluorospheres (Beckman Coulter) were added to the lysed blood and the samples were directly analyzed by flow cytometry (No-wash procedure). In every other case (CCR7, CD45, CD45RA, TIGIT, CD244, CD279, CD57), following incubation with the staining antibodies, 2mL of FACSllyse solution (BD Biosciences) was added and the samples were further incubated for 10 mns at RT. Cells were then washed after red blood cell lysis, suspended in 500 μ L of cellwash solution (BD biosciences), and analyzed by flow cytometry. Panel of labelled antibodies used were listed in Table S1.

Cell Stimulation and Intracellular Staining: 50 μ L of fresh heparinized blood were incubated for 3h at 37°C, 5% CO₂ in a Duractive 1 tube (Beckman Coulter), containing a fixed amount of PMA and Ionomycin. Fixation, permeabilization and intracellular stainings were performed with the Perfix NC kit and the Duraclone IFT activation kit (Beckman Coulter), according to the manufacturer's instructions. Antibodies used in the Duraclone IFT activation tube are listed in Table S1.

Flow Cytometry: Acquisitions were performed on a Navios cytometer (Beckman Coulter). Data were analyzed with the Kaluza software (Beckman Coulter).

Statistical Analysis: All statistical analyses were performed with Prism software (GraphPad). Unpaired parametric or non-parametric tests were chosen according to the Gaussian analysis of data. Spearman coefficient was used for correlation analyses, and Pearson coefficient was established for linear regression analyses. A p value <0.05 was considered statistically significant. Heatmaps were generated with heatmapper (20).

Results

The main characteristics of recipients enrolled in this study are described in table 1. Not surprisingly, HLAi recipients received a re-transplantation more frequently (11% vs 61%, $p=0.04$). At the time of sample analysis, all except one patient in the ABOi group received triple therapy. At this point, HLAi recipients more frequently received mycophenolic acid associated with CNI than ABOi recipients (72% vs 33%, $p=0.04$). Three and six patients, respectively, in the ABOi and HLAi groups had a history of an acute rejection episode prior to blood sample analysis: rejection episodes were considered T-cell mediated rejection in 2/3 of cases in the ABOi group and 1/3 of cases in the HLAi group. A kidney biopsy was performed at the same time as blood sample analysis in 10 (56%) and 9 (50%) ABOi and HLAi recipients, respectively. Among the 36 patients, the time between kidney biopsy and blood sample analysis was 75 (0-1440) and 0 (0-1212) days in ABOi and HLAi patients ($p=0.95$), respectively (the biopsy was performed at the same day of blood sample analysis in 8 and 10 ABOi and HLAi recipients respectively). HLAi recipients presented a higher rate of antibody-mediated rejection than ABOi, but the difference was not significant.

Different T Cell Reconstitution and Differentiation after ABO and HLA Incompatible Transplantation

We first assessed the number and frequency of CD4 and CD8 T cells in transplanted patients. (Figure 1A). Most patients showed a moderate T cell lymphopenia, mostly as a consequence of CD4 T cell lymphopenia, while CD8 T cell numbers were in the higher limit of the usual range. HLAi patients displayed a higher number of T cells and their subsets, although these differences did not reach statistical significance.

We next measured the frequency of CD25^{hi} CD127^{lo} CD4⁺ regulatory T cells (Tregs). ABOi patients harbored a higher frequency of Tregs than HLAi patients, as determined within the CD4⁺ compartment or among total CD3⁺ T cells (Figure 1B).

In order to analyze T cell homeostasis in our cohorts, we analyzed the differentiation status of T cell subsets, on the basis of CD45RA and CCR7 patterns of expression (figure 2A). The pattern of expression of these markers is highly variable between individuals, but also shows variations upon the specific antibodies used for quantitation; therefore, we included a group of healthy donors (HD) analyzed with the same antibody panel. Within CD4⁺ T cells, both groups of patients showed a decreased frequency of naïve CD45RA⁺CCR7⁺ cells, as compared with HD (Figure 2B). This was compensated for by an increased, although not statistically significant, proportion of CD45RA⁻CCR7⁻ effector/memory (EM) cells, while the proportions of CD45RA⁻CCR7⁺ central/memory (CM) cells were similar between groups. Finally, the distribution of the minor subset of CD45RA⁺CCR7⁻ terminally differentiated cells (EMRA) was characterized by a dramatic heterogeneity between transplanted patients, especially in the group of HLAi individuals. Within CD8⁺ T cells (Figure 2C), we observed trends towards lower frequencies of naïve and CM for both groups compared to healthy donors, but these differences were not statistically significant. ABOi patients showed a statistically higher proportion of EM CD8 T cells.

T Cell Memory Subsets Uncovers Differential Expression of IRs in ABOi and HLAi Patients

We chose to focus on the expression of three well known IRs by the patients' T cells: CD244 (also known as 2B4), CD279 (also known as Programmed Death (PD)-1), and TIGIT (T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains). We also included CD57, which is generally associated with another state of T cell dysfunction called senescence. These IRs are mostly, if not exclusively, expressed by memory T cells; therefore, we restricted our analysis to memory T cells, after exclusion of CD45RA+CCR7+ naïve T cells.

We first looked at IR expression on CD4memory (CD4m) T cells (Figure 3A, left panels). The expression of all these IRs was similar between groups, patients and healthy donors (Figure 3B). Notwithstanding, expression of CD244, TIGIT, and CD57 was highly heterogeneous, particularly in HLAi patients, where some patients displayed a dramatically high expression of CD244 and CD57. It is well described that IR expression is regulated upon T cell differentiation and differentially expressed among memory subsets (21). As shown previously, there is a high inter-individual heterogeneity with respect to CM/EM/EMRA CD4+ T cell frequencies (figure 2B); thus, analyzing total memory CD4+ T cells for IR expression could overlook significant differences within specific memory subsets. Therefore, we analyzed expression of each IR separately within CM, EM and EMRA CD4+ T cells. Both CD244 and CD57 are absent from CM CD4+ cells, and their expression rises dramatically from EM to EMRA cells (Figure 3C). The situation is different for CD279 and TIGIT, which are expressed at grossly comparable levels at each stage of CD4+ memory cell differentiation. Overall, CD244, CD279 and CD57 were expressed at similar levels between all groups, although with a dramatic inter-individual heterogeneity. By contrast, we observed a higher expression of TIGIT in HLAi patients within the CM compartment, reaching a median frequency of 39.6 % (29-46.8) versus 30.2% (23.7-36.8) in ABOi and 28.5% (24.1-35.1) in HD.

We then turned to a similar analysis with memory CD8 (CD8m) T cells (figure 3D). CD244 and CD57 expression were similar in HD and ABOi, and higher in HLAi patients, although these differences were statistically significant for CD244 only. CD279 expression was lower in both groups of patients compared to HD, but without statistical significance. However, CD279 was significantly decreased in both kidney transplant recipients in the CM compartment (figure 3E). TIGIT expression was higher in CD8m cells from HLAi patients than from ABOi patients. Detailed analysis of CD8m subsets confirmed these data. Indeed, TIGIT expression was significantly higher within both the CM and the EM compartments of HLAi patients (figure 3E).

T Cells from HLAi Patients Co-Express more IRs than ABOi Recipients

Although the expression of IRs on memory T cells is physiological, co-expression of multiple IRs is less common and has been associated in various settings with immune exhaustion. So, we first plotted each IR against the others in a Dot Plot analysis (figure 4A) within CD4m and CD8m cells, respectively. In CD4m T cells, the most frequent combinations were CD279/TIGIT, and to a lesser extent, CD244/CD57. We then performed a Boolean analysis to quantitate all possible combinations of IR (4B, upper panel). The majority of CD4m cells expressed none of the IRs (not shown); TIGIT and CD279 were the most frequently expressed IRs, either alone or in association. Co-expression of 3 or 4 IRs was a minor event, with only the CD279/CD244/CD57 combination expressed in a significant proportion of cells. From these data, we analyzed the proportion of CD4m cells expressing 0-4 IR. As shown in the pie chart (Figure 4C, left), HLAi patients harbored a lower proportion of cells expressing no IR and a consistently higher frequency of cells expressing 2 and 3 IRs. The situation was quite different

within the CD8m compartment, where IRs are more expressed than in CD4m+ cells (4A, right panels). Indeed, few cells express no IRs, whereas the majority co-expresses 2 or 3 IRs (4B, lower panel). The CD244/TIGIT combination was more frequent in HLAi patients than in HD or ABOi patients. Further, HLAi patients showed less CD8+ T cells expressing 1IR (p=0.024) and more expressing 3IRs (p=0.046) than ABOi patients (figure 4C, right panels).

We conclude from these experiments that T cells from HLAi patients co-express more IRs than cells from ABOi patients, which could be suggestive of a phenomenon akin to T cell exhaustion.

The Ability of CD4+ T Cells to Produce IL-2, and TNF α / IL-2 is more Altered in HLAi Kidney Transplant Recipients

As immune exhaustion refers to a state of dysfunction, we wished to assess the functionality of T cells from our patients. To that end, we quantified the percentage of intracellular cytokine (TNF α , IFN γ , IL-2)- producing cells after mitogenic stimulation with PMA and Ionomycin. Upon stimulation, a large majority of CD4+ T cells produce TNF α , and very often co-produced IL-2 as well; a lower fraction produces IFN γ (Figure 5A, left panels). As shown in figure 5B, neither the production of intracellular IFN γ nor the production of TNF α differed between transplant recipients and healthy donors. In sharp contrast, both patient groups showed a dampened IL-2 production by CD4+ T cells, compared with healthy donors (with a trend towards lower IL-2 production in HLAi patients, compared to ABOi patients). To obtain further detail, we analyzed cytokine co-production by CD4+ T cells (Figure 5C). Surprisingly, the decreased frequency of IL-2 producing cells differentially affected the poly-functionality of CD4+ cells. Indeed, whereas cells from both HLAi and ABOi displayed a decreased capacity to produce TNF α and IL-2 together, with a trend towards lower production in HLAi patients, there was an equivalent proportion of cells co-producing the three cytokines in the three groups. Finally, we observed an increased frequency of IFN γ /TNF α co-producing cells in HLAi patients.

Among CD8+ T cells, the response is dominated by IFN γ and TNF α (Figure 5A, right panels). Again, IL-2 production was altered in transplant recipients (5D). Cells from ABOi patients more often produced TNF α and IFN γ together, compared to HD (Figure 5D). However, contrary to CD4+ T cells, both the frequency of CD8+ T cells co-producing TNF α /IL-2 (not shown) and the frequency of cells co-expressing the three cytokines were decreased among both patient groups as compared with healthy donors (Figure 5E). Thus, the capacity to produce IL-2 is strongly affected in ABOi and HLAi kidney transplant recipients, both within the CD4+ and CD8+ compartments; surprisingly, this does not affect the more poly-functional CD4+ T cells, i.e., cells co-producing three cytokines.

Correlations Between IR Expression and Cytokine Production Differ Between ABOi and HLAi Kidney Transplant Recipients

We then performed a correlation analysis between each IR expression pattern and cytokine expression, as an indirect way of assessing the functionality of IR-expressing subsets. We expressed the results as a heatmap of p values obtained for each pair of comparison (Figure 6A). Many more significant correlations were found in T cell subsets from ABOi patients than from HLAi patients (Figure 6A, Table S2). Most of these correlations observed in ABOi T cell subsets were positive, in line with the idea that IR expression is physiologically induced in effector/memory and activated T cells, i.e., cells associated with higher functionality. CD57 and CD244 expression in CD4⁺ T cells correlated with increased cytokine production (Table S2) PD-1 expression by itself did not correlate with either increased or decreased cytokine-producing function. However, the frequency of CD4⁺ T cells expressing PD-1 in combination with other IRs (such as the PD-1/CD244, PD-1/CD57⁺, PD-1/CD244/CD57⁺ and PD-1/CD244/CD57/TIGIT⁺ combinations) was positively correlated with cytokine production. As a matter of fact, the frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing >2IR was linearly correlated with cytokine production in these subsets (figure 6B, left panels). Furthermore, the frequency of cells expressing more than 2IRs linearly increased with time in ABOi patients (6C, left). This is strongly suggestive of a progressive differentiation of naïve T cells into memory T cells expressing IRs. By contrast, in HLAi patients, these linear correlations were totally absent (supplementary table 2, figures 6B, 6C, right panels). Importantly, we found a negative correlation in CD4⁺ T cells from ABOi patients between TIGIT-only expression and cytokine production (6D, left). This might suggest that these cells represent hypofunctional T cells. Again, this correlation was not found in HLAi patients (6D, right). In these patients, there was a negative correlation between CD244⁺ CD4^m T cells and cytokine production (Table S2), but it was not linear (data not shown), suggesting that these two parameters may be only indirectly associated.

DISCUSSION

After KT, the long-term immunosuppressive regimen dampens the patients' immune surveillance capacities and strongly increases the risk of severe infections and malignancies. This phenomenon is increased in high-risk transplantation requiring the use of a lymphocyte-depleting agent (22, 23). Further, the reconstitution of T cells subsets is biased and influenced by numerous factors, including homeostatic proliferation, which occurs in lymphopenic hosts, as well as the chronic exposure to a high density of alloantigens expressed by the graft (8). Previous studies on post depletion lymphocyte reconstitution reported that CD8⁺ repopulate rapidly comparing with CD4⁺ T cells (24,25), and that repopulating CD8⁺ T cells consisted mainly of differentiated effector-type cells (25). Our results are consistent with these data. In this work, we carried out a descriptive analysis of the quality of T cell reconstitution in incompatible kidney transplant recipients, focusing on the expression of IRs in relation to T cell functions.

The comparison of T cells phenotype between ABOi and HLAi patients was highly informative. Although these two groups were grossly similar with respect to immunosuppressive regimen, they showed very different outcomes, with a much lower rate of rejection in ABOi patients. ABO antigens are carbohydrates that initiate mostly a T-cell independent type 2 antibody response (26, 27). However, these carbohydrates are often expressed as glycoproteins (6, 28): they can possibly induce T-cell dependent immunity. B-cell Isoagglutinins could occur in the early childhood, probably induced by the cell membrane polysaccharides of commensal bacteria (7). Naturally isoagglutinins are mainly of the IgM class, but they also consist of IgG and IgA classes, and the levels and distribution patterns of these immunoglobulin types and subclasses vary with individuals and blood groups (7). Moreover, the role of isoagglutinins types in rejection remains to be elucidated (7), and the pathogenic potential is also dependant on the blood group CD5⁺ B-1 or B-2 cells (6). In ABOi patients, there was a progressive reconstitution of a normal IR phenotype, akin to what is found in HD. We observed many positive correlations between IR expression (such as CD244, CD57 or combinations of PD-1 with other markers) with cytokine-producing functions. This is in agreement with the idea that these IRs are physiologically regulated upon activation and differentiation into memory T cells, marking cells with heightened functionality (21, 29, 30). Our data suggest that in ABOi patients, T cell reconstitution occurs in a quite physiological manner, independent (or with minimal consequences) from the activation of T cell alloreactive responses.

The situation was very different in HLAi patients, where T cell alloreactivity is an important determinant. First, the pattern of IR expression differed from both ABOi patients and HD, with a higher expression of TIGIT, and a higher frequency of T cells expressing ≥ 2 IR. Second, most correlations between IR expression and cytokine production observed in ABOi patients were absent in HLAi patients. Third, the appearance of these IR-expressing T cells was not correlated with time post-transplantation. This suggests that, in contrast to the ABOi setting, the major T cell alloreactivity occurring in the HLAi setting impedes normal T cell reconstitution and drives an uncontrolled IR expression upon chronic activation. This phenomenon could be amplified by the fact that these patients harbor a significant proportion of alloreactive memory T cells prior to transplantation, which are notoriously more resistant than naïve cells to both immunosuppression and depletion (31).

TIGIT appeared to be the most relevant IR in our study, as it was strongly upregulated in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells from HLAi patients. TIGIT is an inhibitory receptor expressed by NK cells and activated and memory T cells, which, upon binding to its cognate ligands PVR and PVRL2 on dendritic cells, negatively modulates lymphocyte activation (29). High TIGIT expression has been observed on tumor-infiltrating lymphocytes and is linked to immune

dysfunction in cancer patients (32, 33). Hence, TIGIT emerges as a candidate for anti-tumoral immune therapy, which is currently being tested in clinical studies (34). Interestingly, high TIGIT expression has also been observed in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, where it may mitigate the severity of GVHD (36,37). In ABOi patients, TIGIT expression was negatively associated with cytokine production in CD4⁺ T cells, suggesting it could be a marker of hypo-functional, or exhausted, T cells, as described in other conditions (8, 39). This correlation was lost in HLAi patients, together with other positive correlations already described. The absence of correlations between IR expression and cytokine production in HLAi patients could be the result of confounding factors, in particular the expression of other IRs that we did not analyze in this study, such as CD160, LAG-3, or TIM-3. For instance, TIM-3 has recently been identified as upregulated in kidney-infiltrating T cells in murine lupus models, and implicated in T cell exhaustion (40). Altered expression of co-stimulatory molecules, in particular CD226, which competes with TIGIT for binding to the same ligands (41), could also be implicated.

In our study, CD57 and CD244 expression correlated positively with cytokine production in CD4⁺ T cells (and CD8⁺ T cells for CD57) from ABOi patients only. CD57⁺CD4⁺ T cells have been associated with rejection in kidney-grafted patients treated with belatacept (42), and CD57⁺CD8⁺ T cells has been shown to be correlated with acute rejection upon intestinal transplantation (43). On the other hand, low CD57 expression was associated with poor response to CMV infection (44). All these data are consistent with our own results. The role of CD244 is contested, as it has been described as either co-stimulatory or co-inhibitory in modulating T-cell functions (45). In the transplantation setting, CD244 expression seemingly marks murine CD8⁺ T cells with impaired functionality, and promotes tolerance (46, 47). CD244 has also been found upregulated upon CMV infection after liver transplantation, and associated with an impaired proliferative response towards allogeneic donor cells (48). By contrast, our data reinforce the notion that elevated CD244 expression marks T cells with heightened effector functions, indirectly confirming that CD244 is likely a major regulator of T cell functions (49). PD-1 expression has also been linked with tolerance in mouse models of cardiac and liver allo-transplantation (50, 51). In both models, blocking PD-1/PD-L1 interactions induced or accelerated allograft rejection. Recently, PD1⁺CD57⁻ T cells with an exhausted profile were shown to predict allograft function (19). Although we did not find direct evidence of a role for PD-1 in graft tolerance, our data do not preclude such a role.

We also found a higher rate of CD25^{high}CD127^{low} CD4⁺ Tregs after ABOi compared with HLAi recipients. This point is in line with previous studies that described similar CD4⁺ Tregs rates after ABO compatible or incompatible kidney transplantation (52), whereas lower rates of Tregs were associated with chronic rejection (a clinical setting frequently associated with HLAi transplantation) (53, 54). There are several important limitations to the conclusions of our study. First, we analyzed a limited number of patients, which could blur important differences and/or correlations between groups, owing to the large variability observed for many important parameters. Second, we could not analyze directly the functional capacities of T cell subsets according to their pattern of IR expression, but relied on correlations. Third, we did not perform a longitudinal study, and compared groups of patients with a variable time post-transplantation. However, we think it is noteworthy that despite all these limitations, we were able to show differences between groups (such as for TIGIT expression) but also to find correlations between IR expression and cytokine production as well as between IR expression and the time post-transplantation.

ABOi and HLAi transplantations have very different outcomes with respect to graft rejection. Although preliminary, our data showing that T cells from patients have a very different pattern

of IR expression and association with cytokine production is relevant to understanding the mechanisms of alloreactive T cell regulation. Further studies are required to integrate these different T cell profiles and the posttransplant outcomes.

Acknowledgments

The authors wish to thank the patients that participated in this study, as well as the physicians and nurses who helped to include those patients and collect the samples. ET wishes to thank the technician staff from the Laboratory of Immunology for their help.

Author Contributions Statement

ADB and ET designed the study, performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. NK contributed to the design of the study, data analysis and the writing of the manuscript.

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *New Engl J Med* 2018;379(12):1150-60.
2. Pankhurst L, Hudson A, Mumford L, et al. The UK National Registry of ABO and HLA Antibody Incompatible Renal Transplantation: Pretransplant Factors Associated With Outcome in 879 Transplants. *Transplant Direct* 2017;3(7):e181.
3. Montgomery RA, Locke JE, King KE, et al. ABO incompatible renal transplantation: a paradigm ready for broad implementation. *Transplantation* 2009;87(8):1246-55.
4. Opelz G, Morath C, Susal C, et al. Three-year outcomes following 1420 ABO-incompatible living-donor kidney transplants performed after ABO antibody reduction: results from 101 centers. *Transplantation* 2015;99(2):400-4.
5. Takahashi K, Saito K, Takahara S, et al. Excellent long-term outcome of ABO-incompatible living donor KT in Japan. *Am J Transplant* 2004;4(7):1089-96.
6. Bohmig GA, Farkas AM, Eskandary F, et al. Strategies to overcome the ABO barrier in KT. *Nat Rev Nephrol* 2015;11(12):732-47.
7. Morath C, Zeier M, Dohler B, et al. ABO-Incompatible KT. *Front Immunol* 2017;8:234.
8. Bamoulid J, Staeck O, Crepin T, et al. Anti-thymocyte globulins in KT: focus on current indications and long-term immunological side effects. *Nephrol Dial Transplant* 2017;32(10):1601-8.
9. Ducloux D, Courivaud C, Bamoulid J, et al. Prolonged CD4 T cell lymphopenia increases morbidity and mortality after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(5):868-75.
10. Crepin T, Carron C, Roubiou C, et al. ATG-induced accelerated immune senescence: clinical implications in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2015;15(4):1028-38.
11. Batista MV, Pierrotti LC, Abdala E, et al. Endemic and opportunistic infections in Brazilian solid organ transplant recipients. *Trop Med Int Health* 2011;16(9):1134-42.
12. Tessari G, Naldi L, Boschiero L, et al. Incidence of primary and second cancers in renal transplant recipients: a multicenter cohort study. *Am J Transplant* 2013;13(1):214-21.
13. Attanasio J, Wherry EJ. Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease. *Immunity* 2016;44(5):1052-68.
14. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity* 2016;44(5):989-1004.
15. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat rev Immunol* 2015;15(8):486-99.
16. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu Rev Immunol* 2019;37:457-95.
17. Shahbazi M, Soltanzadeh-Yamchi M, Mohammadnia-Afrouzi M. T cell exhaustion implications during transplantation. *Immunol lett* 2018;202:52-8.
18. Sarraj B, Ye J, Akl AI, et al. Impaired selectin-dependent leukocyte recruitment induces T-cell exhaustion and prevents chronic allograft vasculopathy and rejection. [Proc Natl Acad Sci U S A](#) 2014;111(33):12145-50.
19. Fribourg M, Anderson L, Fischman C, et al. T-cell exhaustion correlates with improved outcomes in kidney transplant recipients. *Kidney Int* 2019; 96(2):436-449.
20. Babicki S, Arndt D, Marcu A, et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res* 2016;44(W1):W147-53.
21. Legat A, Speiser DE, Pircher H, et al. Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than "Exhaustion" of Human CD8 T Cells. *Front Immunol* 2013;4:455.
22. De Weerd AE, Betjes MGH. ABO-Incompatible Kidney Transplant Outcomes: A Meta-Analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018;13(8):1234-43.
23. Ko EJ, Yu JH, Yang CW, et al. Korean Organ Transplantation Registry Study G. Clinical outcomes of ABO- and HLA-incompatible KT: a nationwide cohort study. *Transplant Int* 2017;30(12):1215-25.

24. Havenith SH, Remmerswaal EB, Bemelman FJ, et al. Rapid T cell repopulation after rabbit anti-thymocyte globulin (rATG) treatment is driven mainly by cytomegalovirus. *Clin Exp Immunol* 2012; 169(3): 292-301.
25. Bamoulid J, Crepin T, Courivaud C, et al. Antithymocyte globulins in renal transplantation-from lymphocyte depletion to lymphocyte activation: the doubled-edged sword. *Transplant Rev (Orlando)* 2017; 31(3): 180-187.26.
26. Mohiuddin MM, Ogawa H, Yin DP, et al. Tolerance induction to a mammalian blood group-like carbohydrate antigen by syngeneic lymphocytes expressing the antigen, II: tolerance induction on memory B cells. *Blood* 2003;102(1):229-36.
27. Wuttke NJ, Macardle PJ, Zola H. Blood group antibodies are made by CD5+ and by CD5- B cells. *Immunol Cell Biol* 1997;75(5):478-83.
28. Finne J. Identification of the blood-group ABH-active glycoprotein components of human erythrocyte membrane. *Eur J Biochem* 1980;104(1):181-9.
29. Fuertes Marraco SA, Neubert NJ, Verdeil G, et al. Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front Immunol* 2015;6:310.
30. Speiser DE, Utzschneider DT, Oberle SG, et al. T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion? *Nat Rev Immunol* 2014;14(11):768-74.
31. Pearl JP, Parris J, Hale DA, et al. Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion. *Am J Transplant* 2005;5(3):465-74.
32. Hutten TJA, Norde WJ, Woestenenk R, et al. Increased Coexpression of PD-1, TIGIT, and KLRG-1 on Tumor-Reactive CD8(+) T Cells During Relapse after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018;24(4):666-77.
33. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, et al. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer cell*. 2014;26(6):923-37.
34. Solomon BL, Garrido-Laguna I. TIGIT: a novel immunotherapy target moving from bench to bedside. *Cancer Immunol Immunother* 2018;67(11):1659-67.
35. Guillerey C, Harjunpaa H, Carrie N, et al. TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8(+) T-cell immunity against multiple myeloma. *Blood* 2018;132(16):1689-94.
36. Hattori N, Kawaguchi Y, Sasaki Y, et al. Monitoring TIGIT/DNAM-1 and PVR/PVRL2 immune checkpoint's expression levels in allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019; 25(5):861-867
37. Zhang D, Hu W, Xie J, et al. TIGIT-Fc alleviates acute graft-versus-host disease by suppressing CTL activation via promoting the generation of immunoregulatory dendritic cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864(9 Pt B):3085-98.
38. Chew GM, Fujita T, Webb GM, et al. TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection. *PLoS pathogens* 2016;12(1):e1005349.
39. Kong Y, Zhu L, Schell TD, et al. T-Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT) Associates with CD8+ T-Cell Exhaustion and Poor Clinical Outcome in AML Patients. *Clin Cancer Res* 2016;22(12):3057-66.
40. Tilstra JS, Avery L, Menk AV, et al. Kidney-infiltrating T cells in murine lupus nephritis are metabolically and functionally exhausted. *J Clin Invest* 2018;128(11):4884-97.
41. Lozano E, Dominguez-Villar M, Kuchroo V, Hafler DA. The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. *J Immunol* 2012;188(8):3869-75.
42. Espinosa J, Herr F, Tharp G, et al. CD57(+) CD4 T Cells Underlie Belatacept-Resistant Allograft Rejection. *Am J Transplant* 2016;16(4):1102-12.
43. Guerra MR, Rossetti M, Zhang Z, et al. Characterization of T cell immunophenotypes in intestinal transplantation: A pilot study. *Transplant immunol* 2018;51:50-7.
44. Ferreira VH, Kumar D, Humar A. Deep Profiling of the CD8+ T-cell Compartment Identifies Activated Cell Subsets and Multifunctional Responses Associated With Control of Cytomegalovirus Viremia. *Transplantation* 2019;103(3):613-21.
45. Schlaphoff V, Lunemann S, Suneetha PV, et al. Dual function of the NK cell receptor 2B4 (CD244) in the regulation of HCV-specific CD8+ T cells. *PLoS pathogens* 2011;7(5):e1002045.

46. Laurie SJ, Liu D, Wagener ME, et al. 2B4 Mediates Inhibition of CD8(+) T Cell Responses via Attenuation of Glycolysis and Cell Division. *J Immunol* 2018;201(5):1536-48.
47. Liu D, Krummey SM, Badell IR, et al. 2B4 (CD244) induced by selective CD28 blockade functionally regulates allograft-specific CD8+ T cell responses. *J Exp Med*. 2014;211(2):297-311.
48. De Mare-Bredemeijer EL, Shi XL, Mancham S, et al. Cytomegalovirus-Induced Expression of CD244 after Liver Transplantation Is Associated with CD8+ T Cell Hyporesponsiveness to Alloantigen. *J Immunol*. 2015;195(4):1838-48.
49. Lissina A, Ambrozak DR, Boswell KL, et al. Fine-tuning of CD8(+) T-cell effector functions by targeting the 2B4-CD48 interaction. *Immunol cell biol* 2016;94(6):583-92.
50. Morita M, Fujino M, Jiang G, et al. PD-1/B7-H1 interaction contribute to the spontaneous acceptance of mouse liver allograft. *Am J Transplant* 2010;10(1):40-6.
51. Yang J, Popoola J, Khandwala S, et al. Critical role of donor tissue expression of programmed death ligand-1 in regulating cardiac allograft rejection and vasculopathy. *Circulation* 2008;117(5):660-9.
52. Schlöber HA, Thelen M, Dieplinger G, et al. Prospective analysis of circulating B cell subsets in ABO-compatible and ABO-incompatible kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2017; 17(2): 542-550.
53. Al-Wedaie F, Farid E, Tabbara K, et al. T-regulatory cells in chronic rejection versus stable grafts. *Exp Clin Transplant* 2015; 13(S1): 170-6.
54. Carmona-Escamilla MA, Queipo G, Guarcia-Mosqueda LA, et al. Peripheral Blood Regulatory T cells are diminished in kidney transplant patients with chronic allograft nephropathy. *Transplant proc* 2018; 50(2): 444-448.

Table 1: Demographic and Clinical Characteristics of the Patients Included in the Study

Variable	ABOi (n=18)	HLAi (n=18)	p
<i>Recipient age at transplantation (years), median (min-max)</i>	54 (31-68)	47 (26-67)	0,74
Initial kidney disease (%)			0.03
- Glomerular	6 (33)	12 (67)	
- Vascular	0	2 (11)	
- PKD / Interstitial disease	11 (61)	2 (11)	
- Undetermined	1 (6)	2 (11)	
Retransplantation, yes (%)	2 (11)	11 (61)	0,002
<i>Initial IsoAgglutinin titer, mean (range)</i>	64 ± 128	-	-
<i>Initial positive Crossmatch (%)</i>	-	2 (11)	-
<i>MFI DSA ID</i>		8,875 ± 6150	-
<i>MFI DSA sum</i>		17,000±16,000	-
<i>Donor age at transplantation (years), median (min-max)</i>	56 (31-66)	50 (34-77)	0,77
<i>Initial immunosuppressive treatment</i>			
<i>Polyclonal antibodies</i>	18 (100)	18 (100)	1
<i>Thymoglobulins, y (%)</i>	11 (61)	11 (61)	1
<i>Number of injection (1.25 mg/kg)</i>	3 ± 0.9	3 ± 0.8	1
<i>Lymphoglobulins, y (%)</i>	7 (39)	7 (39)	1
<i>Number of injection (9 mg/kg)</i>	1	1	1
<i>Tacrolimus, y (%)</i>	18 (100)	18 (100)	1
<i>Mycophenolate mofetil, y (%)</i>	18 (100)	18 (100)	1
<i>Steroids, y (%)</i>			
<i>Time between transplantation – blood sample (months)</i>	20 (6-82)	31 (9-77)	0.74
<i>IS treatment at the time of blood sample analysis</i>			
<i>Calcineurin Inhibitors, y (%)</i>	18 (100)	18 (100)	1
<i>Tacrolimus, y (%)</i>	17 (94)	18 (100)	0.48
<i>CO Tacrolimus (µg/L)</i>	5 ± 2	6 ± 1	0.60
<i>Cyclosporin A, y (%)</i>	1 (6)	0	-
<i>T0 Cyclosporin A (µg/L)</i>	150	-	-
Mycophenolic acid, y (%)	6 (33)	13 (72)	0.04
<i>Mycophenolate mofetil dose (mg / d)</i>	720	720	1
<i>Everolimus, y (%)</i>	11 (61)	5 (28)	0.1

CO Everolimus ($\mu\text{g/L}$)	6 \pm 0	5 \pm 0	0.34
Steroids, y (%)	18 (100)	18 (100)	1
Steroid dose (mg / d)	5	5	1
<i>GFR (CKD-EPI) at the time of blood sample analysis</i>	52 \pm 19	50 \pm 22	0.91
<i>BPAR episode before blood sample analysis</i>	3 (17)	6 (33)	0.44
<i>T-cell mediated rejection</i>	2 (11)	2 (11)	1
<i>Antibody-mediated rejection</i>	1 (6)	4 (22)	0.33

Abbreviations: ABOi, ABO-incompatible KT; HLAi, HLA-incompatible KT; PKD, Polycystic Kidney Disease; MFI, Mean Fluorescence Intensity; ID, Immunodominant; DSA, Donor Specific Antibody; CO, trough level; GFR, Glomerular Filtration Rate.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: (A) Absolute counts per mm³ of CD3⁺ T cells (left), CD4⁺ T cells (middle) and CD8⁺ T cells (right) in ABOi and HLAi patients. (B) Gating strategy for regulatory T cells (Tregs) identification by flow cytometry. Examples are shown for one representative ABOi patient (left) and one HLAi patient (right). (C) Cumulative frequencies of circulating Tregs in ABOi and HLAi patients. Each symbol represents an individual patient. Boxes and interval bars represent the median with interquartile range. All statistical analyses were performed using two-tailed Mann-Whitney test. A p value <0.05 is considered significant. ns: non-significant.

Figure 2: (A) Gating strategy for *ex vivo* identification of naïve and memory T cell subsets. Subsets are defined as naïve (CD45RA⁺CCR7⁺), central memory (CM: CD45RA⁻CCR7⁺), effector memory (EM: CD45RA⁻CCR7⁻) and terminally differentiated (EMRA: CD45RA⁺CCR7⁻). (B and C) Frequencies of each subset among CD4⁺ (B) and CD8⁺ (C) T cells, analyzed in healthy donors (HD), ABOi patients and HLAi patients. Each symbol represents an individual patient. Boxes and interval bars represent the median with interquartile range. Comparisons were made with one-way ANOVA, followed by a Holm-Sidak test for multiple comparisons. A p<0.05 is considered significant. ns: non-significant.

Figure 3: Inhibitory receptor (IR) expression by memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells. (A) Flow cytometry histograms showing representative examples of CD244, CD279, TIGIT, and CD57 expression by memory CD4⁺ (left panels) and CD8⁺ (right panels) T cells in one HD (left), one ABOi patient (middle) and one HLAi patient (right). (B and E) Frequencies of memory CD4⁺ (B) and CD8⁺ (D) T cells expressing each IR, among HD, ABOi and HLAi patients. (C and E) Frequencies of memory CD4⁺ (C) and CD8⁺ (E) T cells expressing each IR, analyzed within the CM, EM and EMRA subsets, among HD, ABOi and HLAi patients. Each symbol represents an individual patient. Boxes and interval bars represent the median with interquartile range. Comparisons were made with one-way ANOVA, followed by a Holm-Sidak test for multiple comparisons. A p<0.05 is considered significant. ns: non-significant.

Figure 4: patterns of IR co-expression by memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells. (A) Dot plot analysis showing the 6 different patterns of IR co-expression by memory CD4⁺ (left panels) and CD8⁺ (right panels) T cells in one representative HD. (B) Summary of the 16 different combinations of IR co-expression in memory CD4⁺ (left) and CD8⁺ (right) T cells from HD (grey circles), ABOi patients (blue circles) and HLAi patients (red circles). Each symbol represents an individual patient. Boxes and interval bars represent the median with interquartile range. (C) Pie charts representing the mean cumulative frequencies of memory CD4⁺ (left) and CD8⁺ (right) T cells expressing 0 to 4 IR among HD, ABOi and HLAi patients. Comparisons were made with one-way ANOVA, followed by a Holm-Sidak test for multiple comparisons. A p<0.05 is considered significant. ns: non-significant.

Figure 5: (A) Dot plots showing a representative example of intracellular cytokine production by CD4⁺ T cells (left panels) and CD8⁺ T cells (right panels) upon PMA and Ionomycin stimulation in one HD. (B) Frequencies of CD4⁺ (left) and CD8⁺ (right) T cells producing each cytokine intracellularly upon stimulation, in HD, ABOi and HLAi patients. (C) Frequencies of CD4⁺ (left) and CD8⁺ (right) T cells co-producing the indicated combinations of cytokines in the three groups. Comparisons were made with one-way ANOVA, followed by a Holm-Sidak test for multiple comparisons. A p<0.05 is considered significant. ns: non-significant.

Figure 6: Correlations between IR expression, intracellular cytokine production and delay post-transplantation. (A) Heatmap of p values obtained for correlations between intracellular

cytokine production and IR expression in CD4+ T from ABOi (left) and HLAi patients (right). (B) Linear regressions of the frequencies of CD4+ (upper panels) and CD8+ T cells (lower panels) producing the indicated cytokines with the frequencies of cells expressing >2IRs. (C) Linear regression of the frequencies of CD4+ T cells producing the indicated cytokines with the percentage of cells expressing TIGIT only. (C) Correlations between the frequency of memory CD4+ T cells expressing the indicated number of IR and the time post-transplantation, in ABOi patients (left panel) and HLAi patients (right panel). Significance was assessed by F-test. P values < 0.05 are considered significant. r^2 value of Pearson's coefficient is shown where $p < 0.05$.

Supporting information:

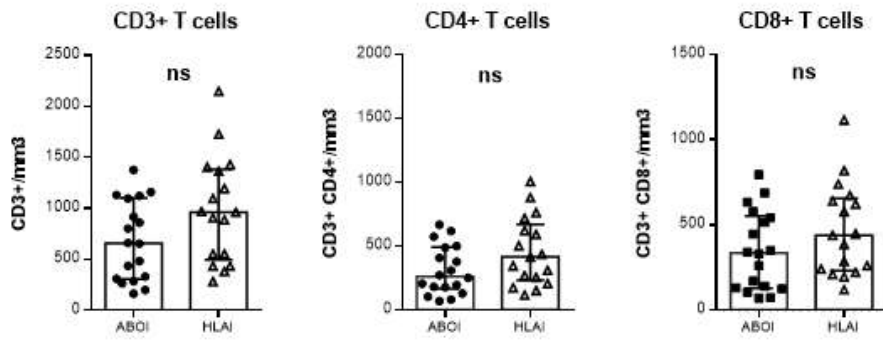
Table S1. Antibodies used for flow cytometry.

Table S2. Correlations Between IR Expression and Cytokine Production.

Figure S1. Study flowchart.

Figure 1

A



B

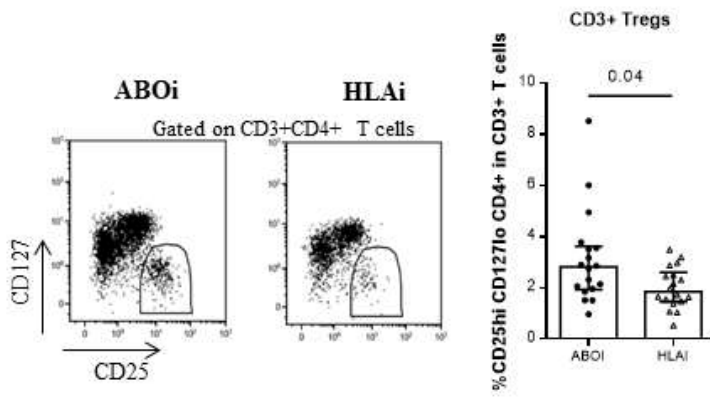


Figure 2

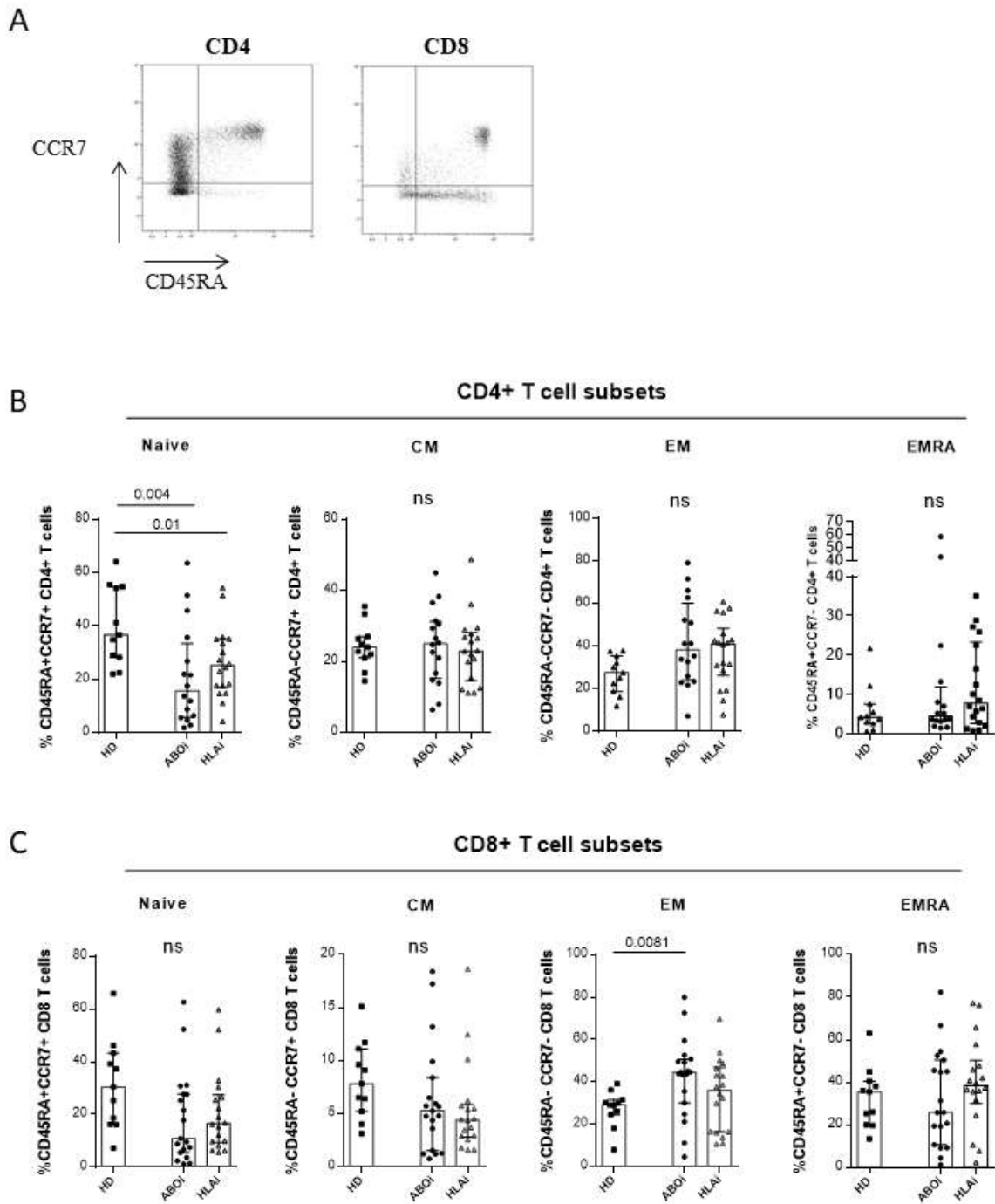


Figure 3

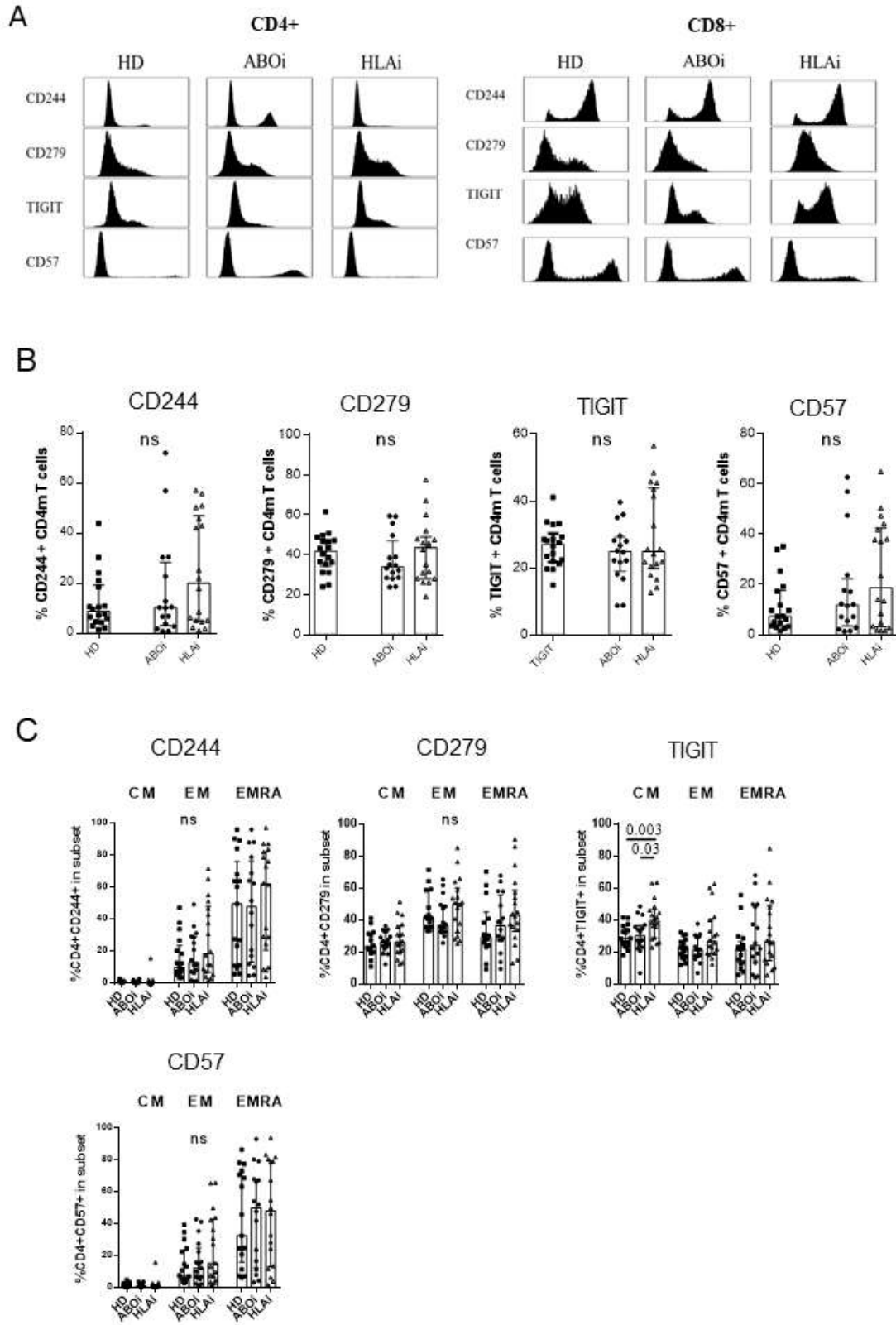
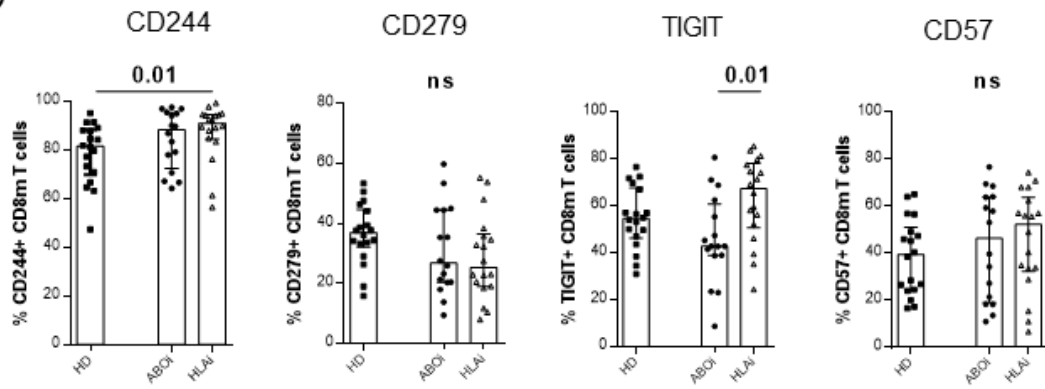


Figure 3 (continued)

D



E

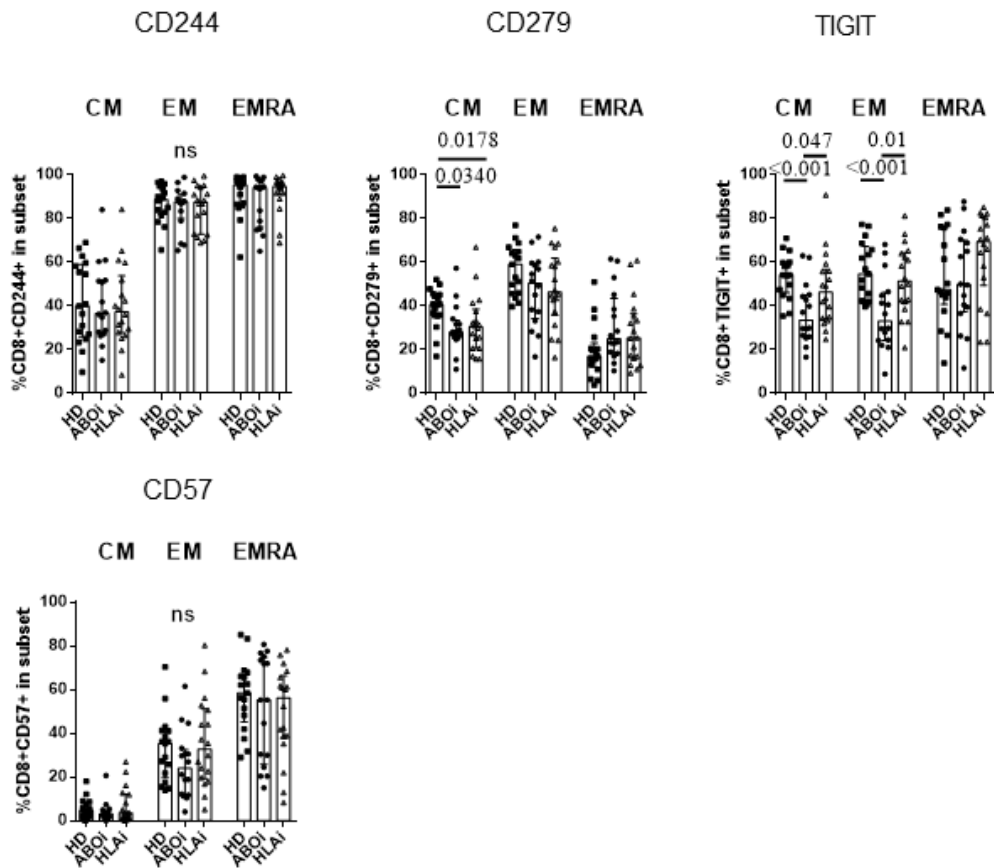


Figure 4



Figure 4 continued

C

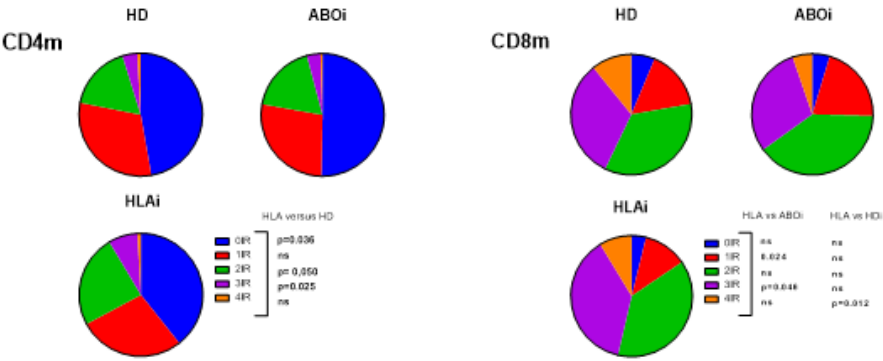
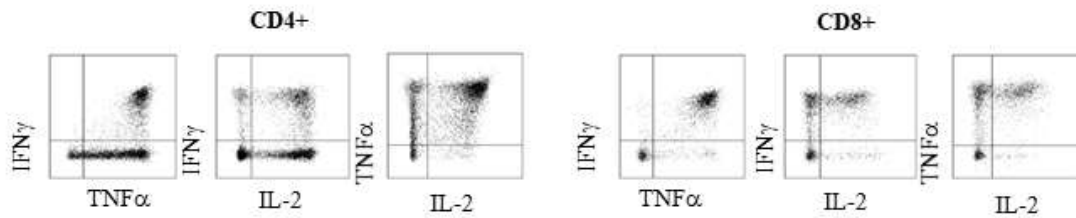
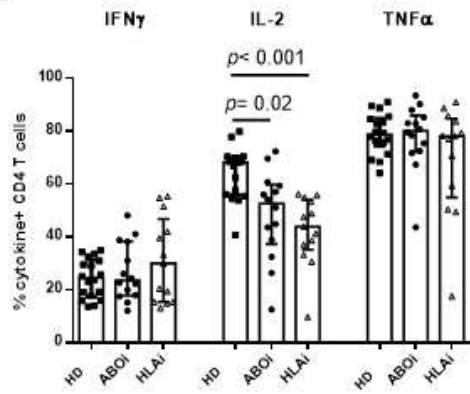


Figure 5

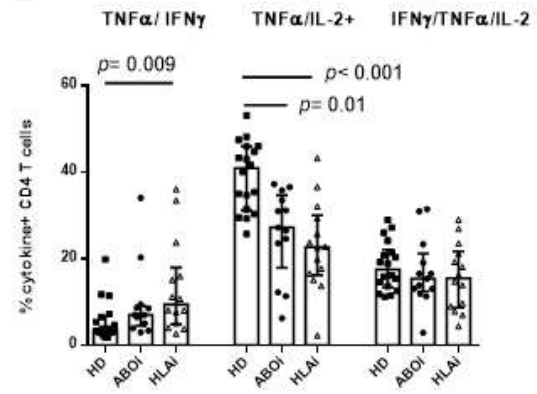
A



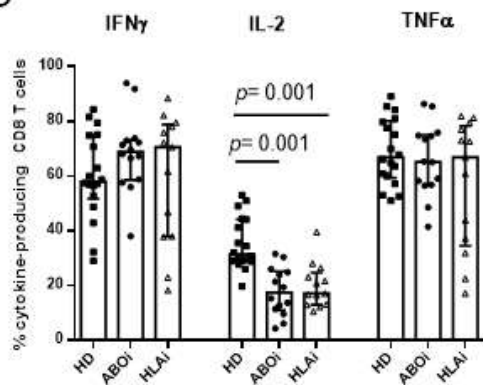
B



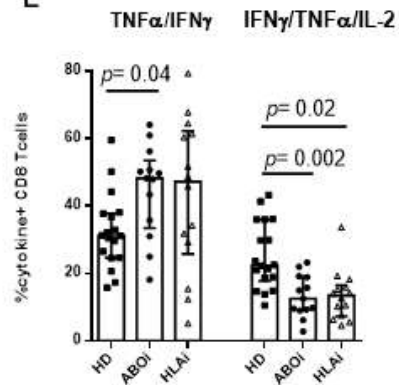
C



D



E



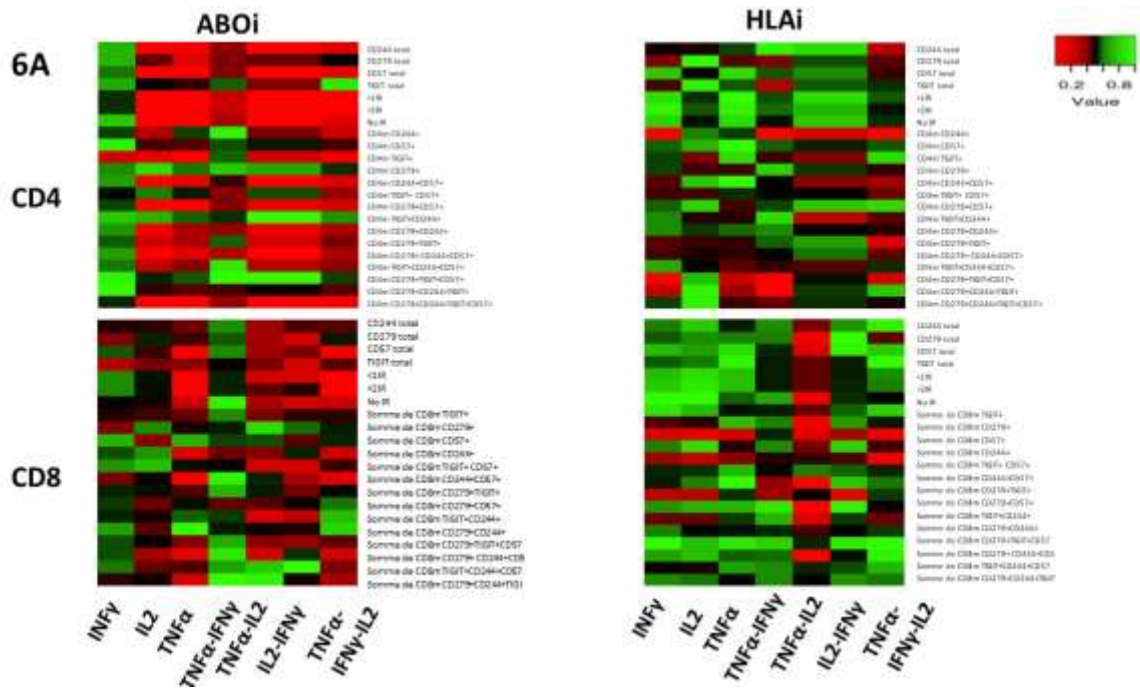
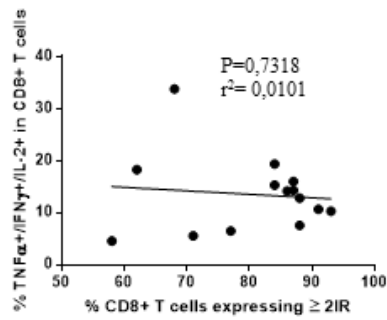
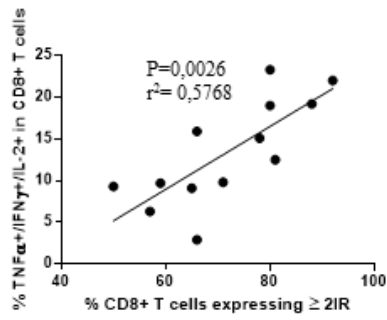
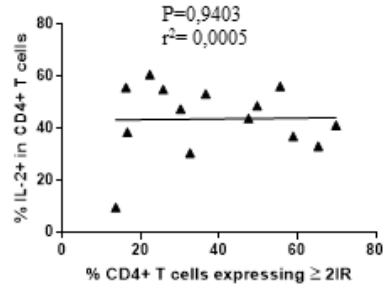
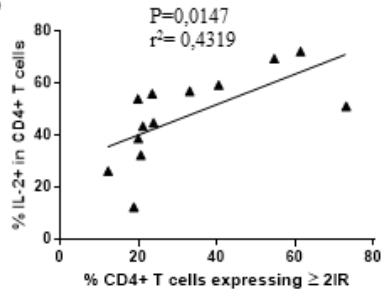
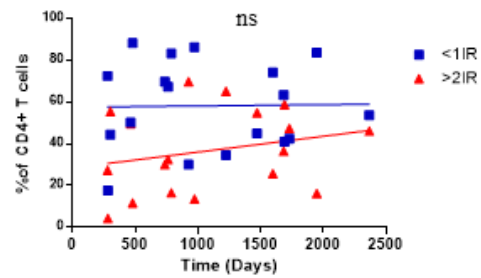
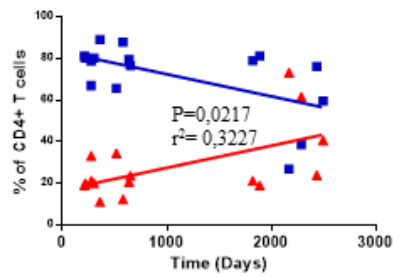


Figure 6 continued

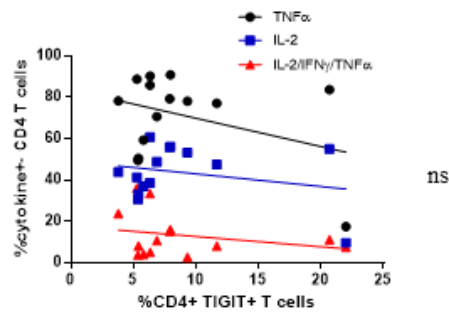
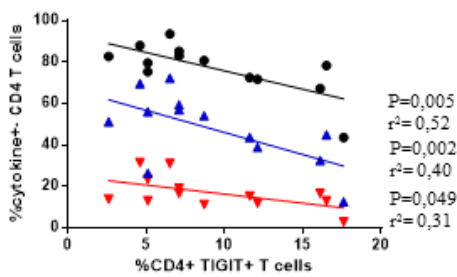
B



C



D



Supplementary Table 1 : Antibodies used for flow cytometry

Antigen	Fluorochrome
Cell surface staining	
CD3	AA700
CD4	APC
CD8	PC5.5
CD45	BV510
CD45RA	FITC
CD197	PECF594
CYTO-STAT tetraCHROME CD45	FITC
CD4	RD1
CD8	ECD
CD3	PC5
CD56	RD1
CD19	ECD
CD3	AA750
CD4	AA700
CD8	KrOr
CD197	PE
TIGIT	ECD
CD244	PerCp5.5
CD279	PC7
CD57	PB
Cell stimulation and Intracellular staining	
CD3	AF750
CD4	PB
CD8	AF700
IFN γ	FITC
TNF α	PE
IL-2	PC7

Table S2 : A-H : Correlations Between IR Expression and Cytokine Production.

S2A. Correlations (p-values) between IR expression and Cytokine Production in CD4+ T cells, in ABOi kidney transplant recipients.

	IFN γ	IL2	TNF α	TNF α /IFN γ	TNF α /IL2	TNF α /IFN γ /IL2
Total CD244	0,8491	0,0034	0,0284	0,2214	0,0016	0,0706
Total CD279	0,8491	0,3063	0,0673	0,2566	0,3155	0,5190
Total CD57	0,7370	0,0028	0,0118	0,2486	0,0028	0,0485
Total TIGIT	0,8347	0,5171	0,4151	0,6921	0,2471	0,9457
<1IR	0,5911	0,0025	0,0086	0,1179	0,0061	0,0108
>2IR	0,5911	0,0025	0,0086	0,1157	0,0061	0,0112
0 IR	0,8917	0,0158	0,0137	0,1612	0,0208	0,0657
CD244+	0,6256	0,1414	0,6256	0,9735	0,2730	0,1014
CD57+	0,9745	0,3698	0,3358	0,6441	0,5496	0,3749
TIGIT+	0,0971	0,0499	0,0137	0,6921	0,0971	0,0401
CD279+	0,7647	0,9205	0,7370	0,8812	0,8347	0,5806
CD244+CD57+	0,8099	0,0090	0,0558	0,3943	0,0077	0,0804
TIGIT+ CD57+	0,5171	0,7506	0,5537	0,2214	0,6561	0,2172
CD279+CD57+	0,6298	0,0127	0,0147	0,2523	0,0499	0,0889
TIGIT+CD244+	0,8879	0,8450	0,6858	0,5943	0,9967	0,7968
CD279+CD244+	0,7784	0,0340	0,1695	0,2180	0,0425	0,1637
CD279+TIGIT+	0,6692	0,0850	0,1695	0,6786	0,0812	0,2722
CD279+ CD244+CD57+	0,8025	0,0114	0,0679	0,1573	0,0054	0,1654
TIGIT+CD244+CD57+	0,7328	0,1307	0,2287	0,9445	0,1526	0,2247
CD279+TIGIT+CD57+	0,9639	0,5786	0,6692	0,9967	0,9782	0,6321
CD279+CD244+TIGIT+	0,9929	0,4151	0,3342	0,3654	0,4703	0,3211
CD279+CD244+TIGIT+CD57+	0,5659	0,0016	0,0034	0,2180	0,0067	0,0390

S2B. Correlations (r coefficient) between IR expression and Cytokine Production in CD4+ T cells, in ABOi kidney transplant recipients.

	IFN γ	IL2	TNF α	TNF α /IFN γ	TNF α /IL2	TNF α /IFN γ /IL2
Total CD244	0,0604	0,7637	0,6154	-0,3604	0,8022	0,5207
Total CD279	0,0604	0,3077	0,5275	-0,3356	0,3022	0,1956
Total CD57	0,1044	0,7747	0,6868	-0,3411	0,7747	0,5620
Total TIGIT	-0,0659	-0,1978	-0,2473	0,1210	-0,3462	-0,0193
<1IR	-0,1648	-0,7802	-0,7088	0,4567	-0,7308	-0,6887
>2IR	0,1648	0,7802	0,7088	-0,4567	0,7308	0,6887
0 IR	-0,0440	-0,6648	-0,6758	0,4127	-0,6429	-0,5262
CD244+	0,1486	0,4319	0,1486	0,0110	0,3274	0,4759
CD57+	-0,0083	0,2696	0,2889	-0,1377	0,1816	0,2662
TIGIT+	-0,4835	-0,5604	-0,6758	0,1210	-0,4835	-0,5785
CD279+	0,0934	-0,0330	0,1044	-0,0440	-0,0659	-0,1653
CD244+CD57+	0,0743	0,7043	0,5475	-0,2534	0,7153	0,5048
TIGIT+ CD57+	0,1978	0,0989	-0,1813	0,3631	-0,1374	0,3664
CD279+CD57+	0,1484	0,6813	0,6703	-0,3384	0,5604	0,4931
TIGIT+CD244+	-0,0413	-0,0578	-0,1210	0,1612	0,0000	0,0786
CD279+CD244+	-0,0879	0,5989	0,4066	-0,3631	0,5769	0,4105
CD279+TIGIT+	-0,1319	-0,5000	-0,4066	0,1265	-0,5055	-0,3251
CD279+ CD244+CD57+	-0,0743	0,6878	0,5254	-0,4132	0,7373	0,4083
TIGIT+CD244+CD57+	0,1045	0,4429	0,3576	0,0220	0,4209	0,3600
CD279+TIGIT+CD57+	0,0165	0,1703	0,1319	0,0028	-0,0110	0,1460
CD279+CD244+TIGIT+	0,0055	0,2473	0,2912	-0,2696	0,2198	0,2975
CD279+CD244+TIGIT+CD57+	0,1758	0,8022	0,7637	-0,3631	0,7253	0,5840

S2C. Correlations (p-values) between IR expression and Cytokine Production in CD8+ T cells, in ABOi kidney transplant recipients.

	IFN γ	IL2	TNF α	TNF α /IFN γ	TNF α /IFN γ /IL2
Total CD244	0,4257	0,2886	0,0284	0,7647	0,3342
Total CD279	0,2550	0,3939	0,5786	0,6692	0,5537
Total CD57	0,6692	0,0101	0,3835	0,7647	0,0251
Total TIGIT	0,1574	0,2392	0,2800	0,4934	0,3342
<1IR	0,7609	0,0036	0,5339	0,5645	0,0015
>2IR	0,7609	0,0036	0,5339	0,5645	0,0015
0 IR	0,4936	0,1173	0,4593	0,9716	0,1173
TIGIT+	0,4255	0,3012	0,3630	0,7612	0,4147
CD279+	0,2466	0,4593	0,7615	0,5533	0,5533
CD57+	0,8437	0,8577	0,2282	0,6397	0,5758
CD244+	0,6545	0,0780	0,7890	0,2886	0,1030
TIGIT+ CD57+	0,7806	0,5322	0,8646	0,4847	0,3857
CD244+CD57+	0,2799	0,0165	0,4706	0,9716	0,0546
CD279+TIGIT+	0,5656	0,3440	0,5291	0,8445	0,5053
CD279+CD57+	0,6023	0,5330	0,2965	0,3103	0,7361
TIGIT+CD244+	0,5780	0,6808	0,4593	0,6158	0,8725
CD279+CD244+	0,8166	0,9858	0,3249	0,5411	0,9007
CD279+TIGIT+CD57+	0,6406	0,2574	0,4924	0,8301	0,3235
CD279+ CD244+CD57+	0,6415	0,0463	0,1680	0,9432	0,0899
TIGIT+CD244+CD57+	0,7343	0,3737	0,3156	0,8166	0,2629
CD279+CD244+TIGIT+	0,4154	0,0899	0,4706	1,0000	0,1618
CD279+CD244+TIGIT+CD57+	0,4262	0,8166	0,7074	0,4706	0,9149

S2D. Correlations (r coefficients) between IR expression and Cytokine Production in CD8+ T cells, in ABOi kidney transplant recipients.

	IFNγ	IL2	TNFα	TNFα/IFNγ	TNFα/IFNγ/IL2
Total CD244	0,2418	0,3187	0,2473	0,0934	0,2912
Total CD279	-0,3407	-0,2582	-0,1703	-0,1319	-0,1813
Total CD57	0,1319	0,6978	0,2637	-0,0934	0,6264
Total TIGIT	-0,4176	-0,3516	-0,3242	-0,2088	-0,2912
<1IR	-0,0937	-0,7438	-0,1901	0,1763	-0,7851
>2IR	0,0937	0,7438	0,1901	-0,1763	0,7851
0 IR	-0,2088	-0,4560	-0,2253	0,0110	-0,4560
TIGIT+	-0,2421	-0,3109	-0,2751	-0,0935	-0,2476
CD279+	-0,3462	-0,2253	0,0934	0,1813	-0,1813
CD57+	-0,0608	0,0552	0,3591	0,1436	0,1713
CD244+	0,1374	-0,5055	0,0824	0,3187	-0,4725
TIGIT+ CD57+	-0,0858	0,1909	-0,0526	-0,2130	0,2628
CD244+CD57+	0,3242	0,6484	0,2198	-0,0110	0,5440
CD279+TIGIT+	-0,1758	-0,2857	-0,1923	-0,0604	-0,2033
CD279+CD57+	0,1597	-0,1905	0,3138	0,3054	-0,1037
TIGIT+CD244+	-0,1703	-0,1264	-0,2253	-0,1538	-0,0495
CD279+CD244+	-0,0714	-0,0055	0,2967	0,1868	0,0385
CD279+TIGIT+CD57+	-0,1433	-0,3388	-0,2094	-0,0661	-0,2975
CD279+ CD244+CD57+	0,1429	0,5604	0,4066	0,0220	0,4890
TIGIT+CD244+CD57+	-0,1044	0,2692	0,3022	0,0714	0,3352
CD279+CD244+TIGIT+	-0,2473	-0,4890	-0,2198	0,0000	-0,4121
CD279+CD244+TIGIT+CD57+	-0,2418	-0,0714	-0,1154	-0,2198	-0,0330

S2E. Correlations (p-values) between IR expression and Cytokine Production in CD4+ T cells, in HLAi kidney transplant recipients.

	IFN γ	IL2	TNF α	TNF α /IFN γ	TNF α /IL2	TNF α /IFN γ /IL2
Total CD244	0,4796	0,4636	0,6266	0,9605	0,9276	0,1505
Total CD279	0,2610	1,0000	0,3411	0,2477	0,6485	0,3411
Total CD57	0,8946	0,4731	0,9396	0,6733	0,7732	0,3911
Total TIGIT	0,3590	0,9638	0,6818	0,1535	0,6706	0,5838
<1IR	0,9363	0,5944	1,0000	0,6562	0,9276	0,6818
>2IR	0,9605	0,6818	0,9638	0,7184	0,8438	0,5321
0 IR	0,9066	0,5423	0,9276	0,5392	0,8915	0,5944
CD244+	0,0186	0,7616	0,6158	0,0255	0,0938	0,0136
CD57+	0,6957	0,8438	0,9879	0,6845	0,5733	0,6818
TIGIT+	0,6342	0,2806	0,9276	0,4017	0,2464	0,9276
CD279+	0,6401	0,3825	0,3825	0,9122	0,6158	0,4175
CD244+CD57+	0,3427	0,8915	0,9879	0,4893	0,2399	0,1862
TIGIT+ CD57+	0,3745	0,3843	0,5863	0,5194	0,4848	0,2965
CD279+CD57+	0,6844	0,9155	0,3656	0,6234	0,8915	0,9396
TIGIT+CD244+	0,7698	0,4356	0,4265	0,9242	0,1413	0,3332
CD279+CD244+	0,7644	0,6051	0,7156	0,7698	0,5022	0,4265
CD279+TIGIT+	0,3305	0,3998	0,4086	0,6957	0,8201	0,0809
CD279+ CD244+CD57+	0,3757	0,4542	0,4175	0,5044	0,7270	0,3176
TIGIT+CD244+CD57+	0,8349	0,5022	0,3332	0,4236	0,3253	0,5838
CD279+TIGIT+CD57+	0,0194	0,8703	0,1159	0,0076	0,5288	0,0922
CD279+CD244+TIGIT+	0,1337	0,9787	0,1865	0,0232	0,6068	0,8883
CD279+CD244+TIGIT+CD57+	0,6401	0,9758	0,3911	0,3115	0,5838	0,4448

S2F. Correlations (r coefficient) between IR expression and Cytokine Production in CD4+ T cells, in HLAi kidney transplant recipients.

	IFN γ	IL2	TNF α	TNF α /IFN γ	TNF α /IL2	TNF α /IFN γ /IL2
Total CD244	-0,2024	-0,2132	-0,1429	-0,0132	-0,0286	-0,4066
Total CD279	0,3212	-0,0022	0,2747	0,3300	-0,1341	0,2747
Total CD57	-0,0374	-0,2088	-0,0242	0,1232	-0,0857	-0,2484
Total TIGIT	0,2640	0,0154	0,1209	0,4026	-0,1253	0,1604
<1IR	-0,0220	0,1560	-0,0022	-0,1276	0,0286	0,1209
>2IR	-0,0132	-0,1209	0,0154	0,1056	0,0593	-0,1824
0 IR	-0,0330	0,1780	-0,0286	-0,1760	0,0418	0,1560
CD244+	-0,6249	0,0901	-0,1473	-0,5985	0,4681	-0,6527
CD57+	-0,1122	0,0593	-0,0066	-0,1166	0,1648	-0,1209
TIGIT+	-0,1364	0,3099	-0,0286	-0,2398	0,3319	0,0286
CD279+	0,1364	0,2527	0,2527	-0,0308	0,1473	0,2352
CD244+CD57+	-0,2706	0,0418	-0,0066	-0,1980	0,3363	-0,3758
TIGIT+ CD57+	0,2555	0,2508	0,1584	0,1861	0,2024	0,2992
CD279+CD57+	0,1188	0,0330	0,2615	0,1430	0,0418	0,0242
TIGIT+CD244+	-0,0836	0,2264	0,2308	0,0286	0,4154	-0,2791
CD279+CD244+	-0,0858	0,1516	0,1077	-0,0836	0,1956	-0,2308
CD279+TIGIT+	0,2794	0,2440	0,2396	0,1144	0,0681	0,4857
CD279+ CD244+CD57+	-0,2530	-0,2176	-0,2352	-0,1914	-0,1033	-0,2879
TIGIT+CD244+CD57+	0,0616	0,1956	0,2791	0,2310	0,2835	-0,1604
CD279+TIGIT+CD57+	0,6229	0,0485	0,4405	0,6913	-0,1806	0,4692
CD279+CD244+TIGIT+	0,4212	0,0088	0,3745	0,6086	-0,1476	0,0419
CD279+CD244+TIGIT+CD57+	0,1364	0,0110	0,2484	0,2904	0,1604	-0,2220

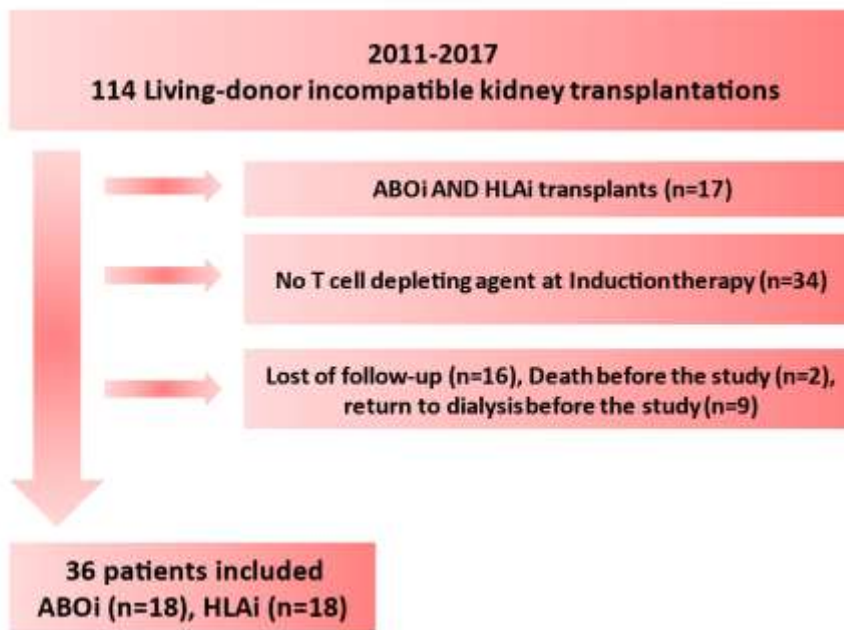
S2G. Correlations (p-values) between IR expression and Cytokine Production in CD8+ T cells, in HLAi kidney transplant recipients.

	IFNγ	IL2	TNFα	TNFα/IFNγ	TNFα/IFNγ/IL2
Total CD244	0,7500	0,5629	0,8915	0,7849	0,9638
Total CD279	0,6818	0,7616	0,7732	1,0000	0,3253
Total CD57	0,8796	0,9396	0,8083	0,9758	0,8915
Total TIGIT	0,6706	0,9638	0,7385	0,5526	1,0000
<1IR	0,8761	0,8761	0,9364	0,5694	0,7696
>2IR	0,8881	0,8641	0,9485	0,5799	0,7579
0 IR	1,0000	0,6930	0,9879	0,6051	0,4924
TIGIT+	0,9517	0,5423	0,8676	0,7043	0,9155
CD279+	0,3628	0,8826	0,4418	0,8231	0,5652
CD57+	0,0889	0,1140	0,0654	0,1977	0,0628
CD244+	0,7500	0,4448	0,9396	0,9035	0,4086
TIGIT+ CD57+	0,2065	0,2536	0,1304	0,3709	0,0489
CD244+CD57+	0,5733	0,8557	0,5944	0,7043	0,5838
CD279+TIGIT+	0,5629	1,0000	0,7616	0,8915	0,7385
CD279+CD57+	0,1410	0,6012	0,1551	0,0732	0,6174
TIGIT+CD244+	0,7849	0,8557	0,8557	0,9758	0,4924
CD279+CD244+	0,3100	0,6266	0,3253	0,6158	0,3025
CD279+TIGIT+CD57+	0,7576	0,5429	0,5277	0,4977	0,6223
CD279+ CD244+CD57+	1,0000	0,9517	0,8796	0,9517	0,9879
TIGIT+CD244+CD57+	0,8201	0,6930	0,8676	0,5423	0,9758
CD279+CD244+TIGIT+	0,4924	0,8201	0,4542	0,6595	0,8557
CD279+CD244+TIGIT+CD57+	0,7732	0,5221	0,7270	0,7966	0,7270

S2H. Correlations (r coefficient) between IR expression and Cytokine Production in CD8+ T cells, in HLAi kidney transplant recipients.

	IFN γ	IL2	TNF α	TNF α /IFN γ	TNF α /IFN γ /IL2
Total CD244	-0,0945	0,1692	-0,0418	0,0813	0,0154
Total CD279	0,1209	0,0901	0,0857	0,0022	0,2835
Total CD57	-0,0462	-0,0242	-0,0725	0,0110	-0,0418
Total TIGIT	0,1253	0,0154	0,0989	0,1736	0,0022
<1IR	-0,0419	0,0463	-0,0198	-0,1610	0,0860
>2IR	0,0419	-0,0463	0,0198	0,1610	-0,0860
0 IR	0,0022	0,1165	-0,0066	-0,1516	0,2000
TIGIT+	0,0198	-0,1780	-0,0505	-0,1121	-0,0330
CD279+	0,2618	0,0440	0,2222	0,0660	0,1672
CD57+	-0,4714	-0,4405	-0,5066	-0,3634	-0,5110
CD244+	-0,0945	-0,2220	-0,0242	-0,0374	-0,2396
TIGIT+ CD57+	-0,3568	-0,3238	-0,4229	-0,2555	-0,5374
CD244+CD57+	-0,1648	-0,0549	-0,1560	-0,1121	-0,1604
CD279+TIGIT+	0,1692	0,0022	0,0901	0,0418	0,0989
CD279+CD57+	-0,4101	0,1522	-0,3969	-0,4917	0,1455
TIGIT+CD244+	-0,0813	-0,0549	-0,0549	-0,0110	-0,2000
CD279+CD244+	0,2923	0,1429	0,2835	0,1473	0,2967
CD279+TIGIT+CD57+	-0,0861	0,1766	-0,1788	-0,1921	0,1435
CD279+ CD244+CD57+	-0,0022	-0,0198	-0,0462	0,0198	0,0066
TIGIT+CD244+CD57+	0,0681	0,1165	0,0505	0,1780	0,0110
CD279+CD244+TIGIT+	0,2000	-0,0681	0,2176	0,1297	0,0549
CD279+CD244+TIGIT+CD57+	-0,0857	-0,1868	-0,1033	-0,0769	-0,1033

Figure S1



2. Une diminution de la réponse T apparait au cours de la transplantation rénale, lié à une modification de la balance de l'axe TIGIT/CD226 dans les CD4+ et de la co-expression PD-1+ TIGIT dans les CD8+

Ce travail a fait l'objet

- De la création de collection d'échantillons biologiques au sein de cohortes spécifiques à ce travail, mais aussi de cohortes prospectives toujours en cours
- D'un article actuellement soumis

2.1 L'axe CD226/TIGIT/CD96

L'axe CD226/TIGIT/CD96 représente une voie d'activation et de régulation négative dont l'intérêt en cancérologie s'accroît ces dernières années avec le développement d'antagonistes contre certains récepteurs de cet axe.

Le CD155 (PVR) est le point d'entrée du poliovirus dans les cellules d'où son nom. Il s'agit d'une molécule d'adhésion. L'expression du CD155 a été associée à un pronostic péjoratif dans différents types de cancer²¹⁷. Son expression est principalement retrouvée dans les cellules myéloïdes, ainsi que les cellules tumorales⁸⁶, mais aussi dans un grand nombre de

cellules endothéliales, épithéliales (dont les cellules tubulaires rénales)²¹⁸. Cette molécule est connue pour avoir trois ligands principaux : CD226, TIGIT et CD96.

Le CD226 (aussi appelé DNAM-1, DNAX accessory molecule – 1), TIGIT (aussi appelé WUCAM, Washington University Cell Adhesion Molecule, ou Vstm3, V-Set and Transmembrane doMain containing protein 3, ou VSIG9, V-Set and ImmunoGlobulin domain containing protein 9) et CD96 (Tactile, T cell ACTivation Increased Late Expression 9) sont exprimées principalement sur les lymphocytes T et les cellules NK et ont en commun certains ligands, le CD155 (PolioVirus Receptor [PVR], NECL-5) et le CD112.

Le CD226 est une molécule d'adhésion et de costimulation de la superfamille des immunoglobulines, capable d'augmenter l'activité cytotoxique et la production d'IFN γ des cellules NK et des lymphocytes T. Elle est exprimée également par les monocytes, les plaquettes, et certaines populations B. Elle contient deux domaines extracellulaire Ig-like, un récepteur intracellulaire avec motif d'activation tyrosine dépendant. Deux ligands lui sont connus CD112 et CD155⁸⁶. L'importance de cette voie de costimulation a été démontrée lors de la présentation antigénique par des cellules non professionnelles. La perte progressive de l'expression de ce récepteur, sous la dépendance du facteur de transcription EOMES a été mise en avant dans la dysfonction des lymphocytes T CD8+ infiltrant les tumeurs²¹⁹. Le signal de costimulation induit par CD226 et renforcé par LFA-1 qui permet la phosphorylation du motif intracellulaire de CD226²²⁰.

TIGIT est une molécule inhibitrice, principalement exprimée par les lymphocytes T, certaines populations B, et les cellules NK. TIGIT contient un domaine extra-cellulaire Ig variable, un domaine transmembranaire, et un domaine intracellulaire porteur d'un motif ITIM²²¹. Le ligand principal de TIGIT est le CD155 (PVR). Cependant TIGIT peut également lier

le CD112, CD113 mais avec des affinités bien plus faibles^{87,221}. Récemment nectin4 a été décrit comme un nouveau ligand de TIGIT, spécifique, mais uniquement exprimé par les cellules tumorales²²². Les mécanismes d'action de TIGIT lui permettant d'effectuer son rôle de molécule inhibitrice sont multiples. L'affinité supérieure de TIGIT sur le CD155 en comparaison au CD226 lui permet de gagner la compétition de liaison sur ce ligand²²³. La liaison de TIGIT au CD155 entraîne sur la cellule T une diminution de l'activation, via la phosphorylation du motif ITIM intracellulaire, et l'interférence avec les voies d'activation⁸⁹. TIGIT empêche également l'homodimérisation de CD226, et induit une déphosphorylation de celui-ci ce qui empêche cette molécule de jouer son rôle de costimulation^{88,224}. Enfin l'interaction TIGIT-CD155 induit un phénotype plus tolérogène des cellules dendritiques⁸⁷. De nombreuses études ont montré l'importance de cette voie d'inhibition dans les cancers solides, ou les pathologies virales solides (détaillé dans la partie I). TIGIT semble principalement exprimé dans les cellules T mémoires progénitrices épuisées, ou elles sont avec PD-1 les molécules inhibitrices dominantes¹⁶⁷. TIGIT semble également inhiber les fonctions effectrices lymphocytaires T via son rôle sur les T régulateurs. Joller et collègues⁹⁰ ont montré que les Tregs exprimant TIGIT produisaient plus d'IL-10, leur permettant d'influer sur le phénotype plus tolérogène des cellules dendritiques, et ainsi d'inhiber les réponses effectrices. Cette observation a également été rapportée dans le mélanome et des modèles murins^{116,225}. Le rôle de TIGIT sur les cellules NK est également important en réduisant leur activation de manière drastique²²¹.

Le CD96 est également un membre de la famille des immunoglobulines. Cette molécule participe à l'adhésion cellulaire via son ligand principal le CD155 (avec une affinité supérieure au CD226 mais inférieure à celle de TIGIT)⁸⁶. Le CD96 est également exprimé par

les cellules NK, les lymphocytes T ($\alpha\beta$ et $\gamma\delta$) ainsi que par certains sous types de lymphocytes B. Cette molécule avait initialement été décrite comme molécule de costimulation, car très fortement uprégulée suivant l'activation cellulaire T et NK, d'une manière similaire au CD226. Depuis, plusieurs publications sont venues contredire cette idée. Dans les modèles murins déficient en CD96, il a été montré une augmentation de la réponse NK après stimulation par LPS ou stimulation par IL-12 ou IL-18²¹⁸. Chez l'homme, le rôle de cette molécule est moins clair. L'analyse du transcriptome de cellules NK hépatiques montre une association entre l'expression du CD96 et un phénotype et un profil fonctionnel d'épuisement de ces cellules²²⁶. De plus l'expression du CD96 a été retrouvée comme particulièrement augmentée dans les lymphocytes infiltrant les tumeurs⁸⁶. Cependant d'autres ont montré une augmentation de la fonction des cellules NK avec l'utilisation d'un agoniste du CD96²²⁷. La dualité de ces observations est représentée par la caractérisation moléculaire de ce récepteur qui contient dans son domaine intracellulaire un motif ITIM-like proche de celui de TIGIT, mais aussi un motif YXXM également retrouvé sur les molécules de costimulation comme le CD28²²⁸. Le rôle exact de cette molécule est donc actuellement à définir.

Récemment un autre ligand a été décrit dans cet axe, PVRIg. Ce récepteur serait principalement le ligand du CD112, mais pourrait également interagir avec CD226 (mais très peu avec TIGIT). Il s'agirait d'une nouvelle voie inhibitrice, synergique avec celle de TIGIT²²⁹.

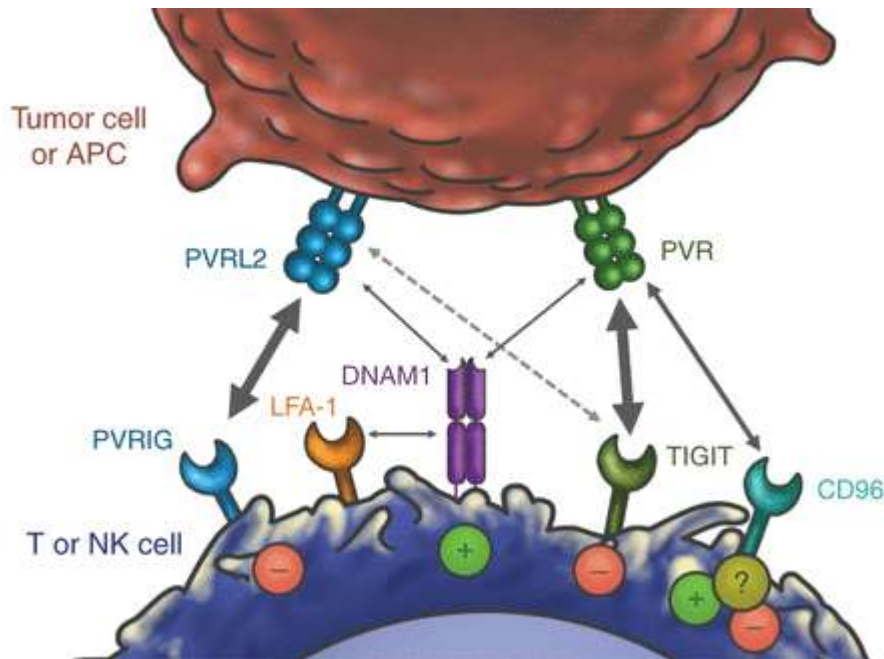


Figure 1. D'après Alterber Z, Cancer Discovery 2021

L'intérêt de cet axe CD155/TIGIT/CD226/CD96 est croissant en oncologie, où des antagonistes TIGIT et CD96 sont en cours d'évaluation. Plus récemment en transplantation de moelle osseuse, des taux élevés de TIGIT dans la moelle après allogreffe ont été associés à de meilleurs pronostics alors que des taux élevés de CD226 circulants sont associés à une survenue plus fréquente de formes graves de maladie du greffon contre l'hôte²³⁰. Une dysrégulation dans l'expression de TIGIT et du CD226 a également été rapportée dans certaines maladies auto-immunes (comme la cirrhose biliaire primitive²³¹, le lupus érythémateux disséminé²³², ou la dermatopolymyosite²³³). En transplantation d'organes solide cet axe a été peu étudié à ce jour. Dans un modèle murin de transplantation rénale, le CD112 et le CD155 ont été retrouvés fortement uprégulés au cours des épisodes de rejet aigu. Cependant les souris déficientes en CD155 ou CD112 présentaient des taux de rejet comparables aux souris sauvages²³⁴, confirmant la nécessité d'une prise en compte globale de

l'axe TIGIT/CD226/CD96 et des ligands CD155 et CD112 en vue de d'appréhender leur rôle en transplantation d'organe solide.

Par différents travaux portant sur des patients transplantés rénaux, en dehors ou au cours de complications infectieuses, nous avons cherché à déterminer la présence

2.2 Présentation de nos résultats

Les résultats de la transplantation rénale restent décevants à long-terme, souvent inférieurs à la durée de vie des patients. L'absence de biomarqueurs permettant d'individualiser la prescription d'immunosuppresseurs au fil de l'évolution empêche l'anticipation des complications à type de sur-immunosuppression (infections et cancers) ou de sous-immunosuppression (rejet de greffe).

Le développement d'un épuisement lymphocytaire T spécifique ou non vis-à-vis du donneur après greffe est actuellement mal connu. Toutefois, la transplantation rénale représente une situation dans laquelle un épuisement T pourrait apparaître (charge antigénique élevée et continue en particulier), et plusieurs modèles murins (évoqués en introduction) suggèrent un rôle positif de ce phénomène en greffe.

Nous avons étudié le développement d'un épuisement T global et spécifique du donneur au travers d'une étude transversale, de patients greffés rénaux à partir d'un donneur vivant, ne présentant pas de complication immunologique (greffe ABO ou HLA incompatible, rejet, récurrence de la maladie initiale), ou infectieuse (infection en cours, infection à CMV à répétition, réplique à BK-virus sérique). Nous avons étudié l'expression mais aussi le profil fonctionnel

(par cytométrie de flux) de plusieurs récepteurs inhibiteurs : PD-1, 2B4, CD160, Tim-3 et TIGIT. De plus afin d'analyser l'expression de TIGIT nous avons également étudié l'expression du CD226 (ligand compétitif avec TIGIT pour le CD155). Les différents sous types de T helpers ont également été étudiés, ainsi que les récepteurs CD28, KLRG1, CD57, et HLA-DR.

Nous avons pu mettre en évidence au cours de la transplantation chez des patients sous traitement par anticalcineurine, une modification de la balance TIGIT/CD226 au sein des LT mémoires CD4+ avec une augmentation progressive de la proportion de cellules TIGIT+CD226+ et une diminution de cellules TIGIT-CD226+. Des modifications fonctionnelles ont été également rapportées avec une diminution des capacités de production cytokiniques des cellules TIGIT+CD226+ en comparaison aux cellules TIGIT-CD226+ et une altération des capacités de production cytokiniques des cellules TIGIT+CD226+ pour les patients à distance de la greffe comparativement aux patients proches de la transplantation.

Concernant la réponse T spécifique, nous avons pu noter une baisse de la réponse T CD4+ post greffe. Nous avons là encore mis en évidence des modifications de l'axe TIGIT/CD226.

The CD226/TIGIT axis is involved in T cell hypo-responsiveness appearance in long-term kidney transplant recipients

Arnaud Del Bello^{1,2,3}, Anna Gouin^{1,2,3}, Camille Chaubet³, Nassim Kamar^{1,2,3}, and Emmanuel Treiner^{2,3,4}

¹ Nephrology and Organ Transplant Department, CHU Toulouse, France.

² Université Paul Sabatier Toulouse III, France.

³ Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases (Infinity), INSERM UMR1043-CNRS 5282, Toulouse, France.

⁴ Laboratory of Immunology, Biology Department, CHU Toulouse, France

[running title: T exhaustion after transplantation](#)

[Abstract word count: 250](#)

[Text word count: 2835](#)

[Keywords: Exhaustion, organ transplantation, rejection, infection, cancer, CD226, TIGIT,](#)

[PD1.](#)

Corresponding Authors:

delbello.a@chu-toulouse.fr

[Département de Néphrologie-Dialyse-Transplantation d'Organes](#)

[CHU de Toulouse, 1 av Jean Poulhès](#)

[31059 Toulouse Cedex 9](#)

[Or](#)

Emmanuel.treiner@inserm.fr

[Infinity – Inserm UMR 1291-CNRS UMR5051](#)

[CHU Purpan – BP3028](#)

[31024 Toulouse Cedex 3 - France](#)

Significance statement:

Our study reveals that after kidney transplantation, both a polyclonal and donor-specific T cell hyporesponsiveness appears. Dysregulation of the CD226/TIGIT axis, with an increased TIGIT/CD226 ratio over time leads to a decrease of CD4+ T cell response. Moreover, in CD8+, a PD1+TIGIT+ exhausted subset increases with time, and participates in the decrease of T cell responses after kidney transplantation.

Abstract

Background

T cell exhaustion (Tex) refers to a dysfunctional state in which effector T cells present a decreased ability to proliferate and to produce cytokines, while the co-expression of inhibitory receptors increases. The presence of Tex after transplantation has not been well studied until now.

Method

We investigated global and donor-specific T cell responses in a cohort of stable, living-donor kidney transplant patients that received similar immunosuppression. Phenotype and functional status were analyzed.

Results

After transplantation, an increase in the ratio of TIGIT⁺/CD226⁺ in mCD4⁺ T cells ($r = 0.47$, $p = 0.01$), and a decrease of CD226⁺TIGIT⁻ mCD4⁺ T cells was observed (Spearman $r = -0.55$, $p = 0.001$). This leads to an increase of dysfunctional T cells in patients far from transplantation, with an altered IFN γ production after mitogenic stimulation.

In mCD8⁺ T cells, a decrease of IL-2 production after mitogenic stimulation was observed in patients far from transplantation. Phenotypic analyses revealed an increase of mCD8⁺ T cells co-expressing PD-1 and TIGIT over time (Spearman $r = 0.51$, $p = 0.02$).

After donor-specific stimulation, the ability of CD4⁺ T cells to proliferate was decreased compared with third parties. CD4⁺ T cells expressing CD226 and TIGIT were correlated with

allospecific CD4+ proliferation (Spearman $r= 0.74$, $p<0.001$), advocating for a central role of TIGIT/CD226 axis in the allo-immune response.

Conclusion

Our study suggests that after kidney transplantation a polyclonal and donor-specific T cell hyporesponsiveness appears over time, driven by a dysregulation of CD226/TIGIT axis in mCD4+ T cells, associated with an increase of PD1+TIGIT+ in mCD8+ T cells.

Introduction

Despite significant improvement, long-term kidney allograft survival rates remain disappointing^{1,2}. Infectious and neoplastic-related complications represent major pitfalls after transplantation³, while the risk of rejection dictates the need to maintain immunosuppressive therapy⁴. Nonetheless, the phenotype of rejections evolves over time post-transplantation, with a decreased prevalence of acute T-cell mediated rejection, and an increase of chronic antibody-mediated rejection^{5,6}. However, the immunological mechanisms underlying this phenomenon have not been completely understood until now⁶.

T cell exhaustion (Tex) refers to a dysfunctional state in which effector T cells present a decreased ability to proliferate, to secrete cytokines (e.g., interleukin [IL]-2, interferon [IFN]- γ , tumor or necrosis factor [TNF]- α), and co-express several inhibitory receptors (IRs) (e.g., programmed cell death protein 1 [PD-1], T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 [Tim-3], 2B4, CD160, T cell immunoreceptor with Immunoglobulin and ITIM domains [TIGIT]) after chronic exposure to antigen stimulation^{7,8}. High antigen load and prolonged antigen exposure are the main factors for the development of this dysfunctional state⁸. Tex was described in human persistent viral infection (mainly HCV⁹, HBV¹⁰, HIV¹¹) and cancer¹²⁻¹⁴, leading to new revolutionizing therapies^{15,16}. Differences in immunogenicity and microenvironment prevent the use of a universal signature of Tex⁸. Consequently, Tex must be studied in a situation-dependent manner.

In solid organ transplantation, donor-reactive T cells from immunosuppressed recipients are chronically exposed to a high load of the transplanted organ, which is a prerequisite to the development of Tex. Some evidence of a positive association between graft

outcomes and Tex after transplantation was previously highlighted in murine models^{17,18}. However, little is known concerning the development of exhaustion after transplantation in humans. Fribourg and colleagues¹⁹ previously found that exhausted CD4+ and CD8+T cells increased during the first months' post-transplantation, particularly in patients who received depleting induction. They also described a negative correlation between graft fibrosis and the percentage of exhausted cells. Our group previously investigated the expression of IRs and function of T cells in ABO and HLA-incompatible kidney transplant recipients and found that TIGIT was dramatically increased in HLA-incompatible recipients leading to alteration of T cell function²⁰.

To date, the function and exhaustion-associated phenotype of T cells long after kidney transplantation have been poorly documented. In this study, we followed the progression of T cell phenotype and function with time in a cross-sectional cohort of stable living kidney transplant donors receiving standard immunosuppressive therapy, and uncovered the phenotype associated with the development of hyporesponsiveness in CD4 and CD8 T cells.

Patients and Methods

Patient selection

Kidney Transplant recipients

From 2008 to 2019, 357 first transplant, non-combined, living-donor kidney transplantations were performed in the Nephrology and Organ Transplant Department of CHU de Toulouse, France. Excluded were all patients with a history of graft rejection or reoccurrence of initial kidney disease, Donor-Specific Antibodies (performed or *de novo*), post-transplant CMV or BK-virus viremia, patients that had received induction therapy with a B or T-cell depleting agent, as well as patients that had not received any immunosuppressive treatment with tacrolimus, mycophenolic acid, and steroids (n=304). Hence, 53 patients were included in the study. Among them, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the kidney donor were available for eight recipients.

Dialysis patients: Twenty-one patients on the waitlist for kidney transplantation but who had not received any immunosuppressive treatments were also analyzed.

All patients included in the study gave their informed consent (Nephrogen cohort (DC-2011-1388)).

Isolation of PBMCs

PBMCs were isolated from patients' blood samples by centrifugation in density gradient medium (Ficoll-Paque). After washing, PBMCs were frozen in Dimethyl Sulfoxide (DMSO) at -196°C in liquid nitrogen and stored in the Centre de Ressources Biologiques (CRB) of the CHU of Toulouse, until further use.

Preparation of “third-party donors”: PBMC were isolated from buffy coats from four different healthy donors (obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS)). PBMC were mixed in equal numbers, and the pool of cells was aliquoted and frozen in liquid nitrogen until use.

Phenotypic analyses

PBMC were thawed, washed and counted. Cell surface staining included an incubation with brilliant stain buffer (BD Biosciences), followed by a 30 mins incubation at room temperature with the monoclonal antibodies at the appropriate concentration. For intracellular staining, cells were fixed and permeabilized with the transcription factor buffer set (BD Biosciences), followed by a 1-hour incubation at 4°C with the monoclonal antibodies at the appropriate concentration. After washing, cells were analyzed by flow cytometry. All patients were tested for exhaustion markers; when blood samples were available, T helper subsets, regulatory T cells, and differentiation panels were analyzed.

T cell functional analysis

Polyclonal stimulation: PBMC were thawed, washed, counted, and plated at a concentration of 10^7 /ml in 96 well plates. Cells were then incubated in the absence or presence of 1 µg/ml phorbol 12-myristate 13-acetate and 2 µg/ml Ionomycin (both from Sigma-Aldrich) for 4 hours, in the presence of Golgi plug (BD Biosciences). At the end of the incubation time, cells were harvested, and membrane staining was performed followed by fixation and permeabilization with the Fix/Perm kit as per the manufacturer’s instructions (BD Biosciences). Intracellular staining was performed at 4°C with 1 hour incubation with anti-IFN γ , TNF α , and IL-2 antibodies, followed by flow cytometry analysis.

Mixed lymphocyte reaction: Frozen PBMCs from graft donors or from the pool of healthy donors were thawed, washed, and resuspended in RPMI (ThermoFisher Medium). Cells were irradiated at 3000 rad, followed by a 45 mins incubation at 37°C with CMFDA (Thermofisher) in AIM V medium (Thermofisher). After washes, cells were suspended in AIM V medium at 10^7 /ml before use as stimulator cells.

Responder cells were prepared as follows: frozen PBMCs from transplant recipients were thawed, washed, and resuspended in RPMI-10% with FCS (ThermoFisher Medium). After counting, responding cells were incubated for 10 mins in pre-warmed PBS with Cell Trace Violet (Thermofisher), washed with pure SVF, and then resuspended in AIMV medium at 10^7 /ml.

For the MLR, 250, 000 CTV-labeled responder cells and 250, 000 CMFDA-labeled, irradiated stimulators cells (donor-specific or third-party) were plated in a 96-well plate, and kept in an incubator at 37°C 5% CO₂ for 7 days. In some selected cases, these culture were performed in duplicates.

At the end of the MLR, one of the duplicate was used for phenotypic analysis as already described. Cells were harvested from the second duplicate, washed, and stimulated with PMA and ionomycin in the presence of Golgi Plug as already described. After 4 hours, cells were stained for cell surface markers, followed by fixation/permeabilization, and intracellular cytokine stainings with anti-IFN γ and anti IL-2 antibodies. Stained cells were analyzed by flow cytometry.

Flow cytometry:

Antibodies used for the different phenotypes and functional panel are listed in Supporting document 1.

Acquisitions were performed either on a Fortessa X18, a Fortessa X20 or a LSRII flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Data were analyzed with FlowJo software (v10.7, BD Biosciences).

Clustering analyses : we first clustered cells using the Phenograph algorithm²¹, and t-SNE²² to visualize high-dimensional data in two dimensions while preserving single-cell resolution. To minimize variability in measurement, our analysis strategy was structured as follows:

-Equal contribution of the samples: to avoid bias in Phenograph for the subsets present in the samples, we first extracted and analyzed separately memory CD4+ and CD8+ T cells and maintained an equal contribution in the number of cells from every sample determined by the sample with the lowest number of CD4+ or CD8+ T cells.

- Reiteration: to increase the power of the analyses for the cell subsets with a low number of events, we reiterated the entirety of the sampling process and Phenograph, clustering up to 5 times to achieve robustness in the results.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with Prism Software v8.1 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Statistical tests used are reported in the figure legend. Unpaired parametric or non-parametric tests were chosen according to the Gaussian analysis of data. Spearman's coefficient was used for correlation analyses. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Decreased polyclonal T cell responses in long-term kidney transplanted recipients

To investigate the possibility that kidney transplantation may induce a state of lymphocyte exhaustion, we undertook a cross-sectional study including 30 living-donor KTR studied at different time post-transplantation (Table 1). All patients were grafted with HLA-mismatched organs, and were under the same immunosuppressive regimen (excluding T cell-depleting agents). We also purposely selected only patients under stable conditions from the time of transplantation, i.e. without any history of cancer, active infection, CMV or BK virus replication, reoccurrence of the initial kidney disease, presence of DSA, or transplant rejection.

We first analyzed the main circulating T lymphocyte subsets in patients at the time of study. The number of total CD3⁺ T cells, as well as CD4⁺ and CD8⁺ T cells, did not significantly vary with time from transplantation (Figure 1A). Among CD4⁺ T cells, the proportion of memory cells remained steady (1B and supporting figure 2A). Similarly, we analyzed the frequencies of CD4⁺ Tregs (Foxp3⁺CD25^{hi}CD127^{lo}), of the various Thelper subsets (Th1, Th2, Th17 and Th17*, based on the relative expression of CCR6/CXCR3/CCR4), and of senescent/terminally differentiated CD28-CD57⁺ and KLRG1⁺ cells (supporting figure 2B and 2C). Although some of these subsets showed a dramatic inter-individual variation, they did not correlate with the delay post-transplantation (S2C, S2D). By contrast, the subset of follicular helper T cells (CD45RA-CCR7-CXCR5⁺PD1⁺) significantly increased with time post transplantation (Figure 1C). Altogether, most T cell subsets varied independently of the duration of contact between the graft antigens and the immune system of our patients.

Next, we measured the capacity of the patients CD4⁺ T cells to produce intracellular cytokines upon mitogenic stimulation with PMA and Ionomycin. We separately analyzed the

response of T cells from recently (< 3 months) or late (>2 years) transplanted patients. As shown in figure 2A, CD4+ T cells from late KTR showed a dampened IFN γ response compared with early KTR, that also translated into a dramatic drop of triple (IFN γ , TNF α , IL-2) cytokine producers. Blunted IFN γ response is a hallmark of immune exhaustion in T cells, suggesting that such a phenomenon could occur in KTR as a result of long-time exposure to foreign allo-antigens.

Exhausted T cells usually express simultaneously multiple surface receptors involved in the regulation of immune responses, referred to as inhibitory receptors (IR). An increase in the frequency of cells co-expressing multiple IR could possibly explain the observed blunted response of CD4+ T cells. We chose to focus on five important IR: PD1, TIGIT, 2B4, CD160 and Tim3, as well as CD226, a co-stimulatory receptor binding to the same ligands than TIGIT. The frequency of cells expressing any combination of 2 to 5 IR remained stable with time post-transplantation (figure 2B). Nevertheless, unbiased clustering analysis unraveled a time-dependent decrease in the frequency of cells expressing CD226 but none of the 5 IR included in the analysis (Spearman $r=-0.52$, $p=0.02$), (figure 2C). In other words, the frequency of cells expressing no IR decreases with time, which implies that expression of at least one of these IR must increase in a time-dependent fashion. Thus, we looked at the expression of specific IR. The expression of the 5 IR analyzed was similar between the whole cohort of Tx patients and dialysis controls (supporting figure 2E). However, we observed a time-dependent increase in the frequency of cells expressing TIGIT (T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains) (figure 2D). TIGIT display multiple mechanisms to inhibit T cell responses. One of these involves the stimulatory receptor CD226, which is specific for the same ligands than TIGIT, but with lower affinity. Thus, TIGIT expression competes with CD226 for binding to their ligands (CD112 and CD155). CD226 expression tended to decrease with time post-transplantation (Figure 2D).

We observed that the increase in TIGIT expression with time involved both TIGIT⁺CD226⁻ and TIGIT⁺CD226⁺ subsets, resulting in an increase in the ratio of TIGIT⁺/CD226⁺ cells among the CD4⁺ subset (Figure 2D). Importantly, we found a negative correlation between TIGIT⁺ cells and Th1 (Spearman $r = -0.45$, $p = 0.03$) or Th17* ($r = -0.40$, $p = 0.05$) subsets (both involved in T cell-mediated rejection), strongly suggesting that the expansion of TIGIT⁺ cells dampens T cell-mediated Immunity *in vivo* (Figure 2E).

We next asked whether TIGIT and/or CD226 expression was directly responsible for T-cell mediated hyporesponsiveness in late KTR. Surprisingly, intracellular production of IFN γ , IL2 or TNF α after mitogenic stimulation was similar between TIGIT⁺ and TIGIT⁻ CD4⁺ T cells (Figure 3A). On the other hand, CD226 expression was strongly associated with cytokine production (Figure 3B). When we analyzed the production of cytokines by CD226/TIGIT-defined subsets according to time post-transplantation, we found a significant drop in IFN γ production only in the TIGIT⁺CD226⁺ subset in late KTR (Figure 3C). Altogether, our results strongly suggests that both TIGIT and CD226 expression regulates cytokine production in KTR, and that a dysregulation of this TIGIT/CD226 axis may be responsible for CD4⁺ hyporesponsiveness in late KTR.

CD8⁺ exhausted T cells increase after kidney transplantation

We next turned to the CD8⁺ T cell compartment within the same cohort (Table 1). The memory CD8⁺ T cell subsets, as well as the different Tc1, Tc2, Tc17, and Tc17* subsets or CD57, CD28, KLRG1 expression were stable over time (Figure 4A, supporting Figure 2F and 2G). Upon mitogenic stimulation, CD8⁺ T cells from late KTR produced significantly less IL-2 than recently transplanted patients (Figure 4B). The expression of each individual IR did not differ with time

post-transplantation or compared with patients under dialysis (Supporting figure 2H). However, the percentage of CD8+ T cells simultaneously expressing three IRs increased with time post-transplantation (Figure 4C). After unbiased clustering strategy, we observed that PD1+TIGIT+mCD8+ T cells increased over time post-transplantation (Spearman $r = 0.51$, $p = 0.02$), (Figure 4D).

Thus, akin to CD4+ T cells, we observed that CD8+ T cell hypo-responsiveness develop in long-term KTR, and is associated with the expansion of a exhausted PD1+TIGIT+ subset.

Alloreactive CD4+ donor-specific hyporesponsiveness after kidney transplantation is correlated with CD4+CD226+TIGIT+Tim3-PD1^{low}2B4^{low} T cells

Our results so far show that a state of exhaustion develop in polyclonal T cells from long-term KTR. However, we wished to investigate whether an antigen-specific phenomenon could also be uncovered, which would be more directly linked to chronic exposure to graft alloantigens. Thus, we selected 11 stable patients grafted from living donors at different time post-transplantation, and analyzed their T cell reactivity by Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) against donor cells (donor-specific alloreactivity) and against third-party cells (non-specific alloreactivity) (supporting document 3A, 3B).

As shown in figure 5 (A), T cell proliferation measured at day 7 was lower after donor-specific stimulation compared with third- party (non-donor specific). This hypo-responsiveness was observed in CD4+ T cells only, but not for CD8+ T cells (donor-specific/third- party proliferation ratio (median [IQR]): 0.24 [0.04; 1.02], 0.06 [0.02; 0.92], 0.71 [0.03; 2.07] for CD3+, CD4+, CD8+ respectively). At the end of the MLR, PBMC were restimulated with PMA and Ionomycin for 4h and analyzed for intracellular cytokine production (IFN γ , IL-2). No significant difference was observed with respect to cytokine production by CTV^{low} proliferating CD4+ and CD8+ T cells when comparing donor-specific or third party- stimulation (supporting figure 3C, 3D). Further, in either condition, intracellular cytokine production did not correlate with time post-transplantation (supporting figure 3C, 3D). We also analyzed the expression of IR and CD226 by proliferating, i.e. CTV^{low}, T cells after MLR. As shown in figure 5C, a number of those receptors, mostly dominated by PD-1, CD226, TIGIT, and Tim3 are strongly expressed by proliferating cells. However, there was strong inter-individual differences, but that did not correlate with time post-transplantation (Supporting Figure 3E, and 3F). Further, we found no

significant differences between donor-specific and third-party MLR, although there was a small trend toward lower expression of some IR (including TIGIT and Tim3) after donor-specific stimulation. At least some of these IR are induced upon activation as a negative feedback loop; thus, our observations may be the result of a lower activation signal received by stimulated cells.

On the basis of an unbiased clustering analysis of recipient CD4⁺ and CD8⁺ exhaustion phenotype before MLR, the proportion of CD226⁺TIGIT⁺Tim3⁻PD1^{low}2B4^{low} CD4⁺ cells was correlated with allospecific, but not third-party, CD4⁺ proliferation (Spearman $r=0.68$, $p=0.04$). This observation was mainly driven by two recently transplant patients with high proportion of proliferating cells after MLR (Figure 5C).

Hence, we observed an allospecific T cell hyporesponsiveness after kidney transplantation, mainly in CD4⁺ T cells. Donor-specific CD4⁺ T cell proliferation was correlated with the percentage of CD226⁺TIGIT⁺Tim3⁻PD1^{low}2B4^{low} CD4⁺ T cells, suggesting a decisive role of the CD226/TIGIT axis in donor-specific response.

Discussion

In this study, we found that donor-specific T cell hyporesponsiveness prevails in CD4+ T cells after kidney transplantation and was linked with CD226+TIGIT+ CD4+ T cells. We also pointed out that TIGIT expression increased in mCD4+ T cells after transplantation in stable conditions, at the expense of CD226+TIGIT- mCD4+ T cells. As a result, we observed an altered function of this CD4+ T cell subset in recipients far from transplantation. The TIGIT/CD226 axis is a recently described pathway that regulates T cell function. Similar to other immune checkpoint pathways, such as CD28/CTLA4, CD226 presents a co-stimulatory function, that shares ligands with TIGIT which is a co-inhibitory receptor. Both of these receptors bind to two nectin and nectin-like proteins, CD155 (PVR) and CD112 (PVRL2). TIGIT is expressed on conventional $\alpha\beta$ T cells, but also memory, regulatory, and follicular helper T cells²³. TIGIT exerts an inhibitory function in several ways. TIGIT could regulate T cell responses via engagement in a cell-extrinsic manner via the ligation after homodimerization to CD155 in dendritic cells and macrophages (resulting in a shift of IL-12 production to IL-10), promoting a tolerogenic phenotype^{24,25}. TIGIT could also exert an inhibitory function in a cell-intrinsic manner, by competing with CD226 for the binding of CD155, and interacting with CD226 on the surface of T cells to disrupt CD226 homodimerization²⁶. In conventional CD4+ T cells, TIGIT expression exerts a direct inhibitory effect on T cell proliferation with inhibition of cytokine production, predominantly on IFN γ ²⁷. We also observed a negative correlation in kidney transplant recipients between the expression of TIGIT in conventional T cells, and the proportion of Th1 or Th17 subsets. Th1 and Th17 cells play a key role in the initiation and development of T cell rejection²⁸⁻³⁰. Taken together, our data suggest that in triple, CNI-based immunosuppressive

therapy, increased TIGIT expression could participate in CD4+ T cell hyporesponsiveness and the previously described disappearance of T cell rejection over time⁶. Conversely, TIGIT expression on tumor- Infiltrating Lymphocytes of melanoma patients or on peripheral blood T cells of gastric cancer patients was previously associated with poor outcomes³¹⁻³³. A decrease in TIGIT+CD4+ T cells was associated with severe forms of autoimmune diseases such as multiple sclerosis, atopic dermatitis, ulcerative colitis, and systemic lupus³⁴⁻³⁷. Moreover, dysregulation of CD226+TIGIT+ CD4+ T cell functions was previously described in severe forms of dermatomyositis³⁸ and primary Sjögren syndrome³⁹. CD226 downregulation and high levels of TIGIT were previously described in cancer and chronic viral infections⁴⁰⁻⁴². In the same way, we previously found in highly immunosuppressed HLA incompatible kidney transplant recipients known to present a high risk of infectious complications⁴³, higher levels of TIGIT expression, compared with ABO-incompatible recipients²⁰. TIGIT was also previously identified in kidney biopsies as one of the most specific transcript changes (with other costimulation - related transcript) during pure T-cell mediated rejection, compared with other disease⁴⁴. Finally we observed that donor-specific T cell (but not third-parties) response involved preferentially CD226+TIGIT+ cells. The dysfunctional state observed in these cells far from transplantation could participate to the donor-specific hyporesponsiveness observed after transplantation. Thus, exploring the TIGIT/CD226 after kidney transplantation could be a promising tool for monitoring the balance of immunosuppression after transplantation.

Conversely, we did not observe any increase of other inhibitory receptors such as PD-1, or any combination of inhibitory receptors (using clustering analyses), over time post-transplantation. In a mouse model of chronic rejection after heart transplantation, Sarraj and colleagues previously demonstrated an association between graft survival and CD4+ T cell exhaustion phenotype in the periphery, while Zou and colleagues¹⁸ demonstrated in a skin

transplant model that donor antigen abundance is a main factor of T cell exhaustion development. In humans, Fribourg and colleagues previously found during the first 6 months post- transplantation, an increase of exhausted CD4+ T cell subsets, mainly represented by PD1+TIGIT+2B4-Tim3- cells. They also observed a negative correlation between CD4+ Tex and the development of graft fibrosis. Unlike the Fribourg study, we only included recipients that had not received T cell depleting agents, in order to avoid biases related to the expression of some inhibitory receptors during T cell reconstitution. Moreover, in our study, patients were far from transplantation and exposed to long-term use of immunosuppressive treatments. It was previously suggested in mouse models that T cell exhaustion could be prevented by calcineurin inhibitors^{45,46}. Hence, it could be argued that CNI-based immunosuppression after transplantation could interfere with the development of exhaustion-induced hyporesponsiveness.

We also observed an increase of PD1+TIGIT+ CD8+ T cells after kidney transplantation. In cancer, TIGIT+PD1+ CD8+ cells were previously found to be upregulated and to present altered function^{47,48}. Our results are consistent with those of Fribourg¹⁹: in their study, they found an increase of CD8+ Tex clusters mainly represented by PD1+TIGIT+2B4+ cells. They also found a correlation between graft fibrosis during the first months post- transplantation and the proportion of CD8+ Tex. Given these observations, monitoring the PD1+TIGIT+ CD8+ after transplantation could thus be an interesting path of investigation toward individualizing immunosuppression in the treatment of infections and cancer, or graft rejection and fibrosis.

Our study presents several limitations. First, we analyzed a relatively small sample of recipients. This was mainly driven by the ambition to homogenize patients: all transplant recipients included here received the same immunosuppressive treatment, did not present

viral replication in blood, graft rejection, or reoccurrence of kidney disease. Moreover, despite the low number of patients, we were able to highlight some major changes in CD4+ and CD8+ T cell compartments after transplantation. Second, we were not able to investigate all previously described inhibitory receptors. We decided to focus on the main inhibitory receptors, associated with exhaustion development. Consequently, we cannot eliminate different signatures, with other IR after transplantation. For example, TOX was recently described as a major transcription factor for exhaustion in the mouse⁴⁹ and should be investigated in future prospective studies. Nonetheless, using only the principal 5 IRs we described a dysregulation of the CD226/TIGIT axis and an increase of PD1+TIGIT+ CD8+ T cells. Conversely, a main strength of our study was the investigation of donor- specific T cell response according to exhaustion.

In conclusion, our study reveals that after kidney transplantation, a donor-specific T cell hyporesponsiveness develops after transplantation. The dysregulation of the CD226/TIGIT axis, with the increase of TIGIT over time leads to a decrease of CD4+ T cell response. Moreover, CD8+ PD1+TIGIT+ exhausted T cells increase with time, and participate in the decrease of T cell response after kidney transplantation. Future studies that include these subsets as biomarkers to monitor clinical endpoints or over- or underimmunosuppression are needed.

Author's contribution

ADB, NK, ET designed the study

ADB, AG, CC, ET performed experiments

ADB and ET analyzed the data and wrote the paper

NK reviewed the paper.

Acknowledgements

ADB and ET thank patients who accepted to participate.

We thank the technical staff of the flow cytometry core facilities of CPTP-Inserm UMR1043 and of the IPBS-CNRS UMR 5089 for assistance. We thank the staff of the Centre de Ressources Biologiques (CRB) of the CHU of Toulouse for help with the Nephrogen cohort.

ADB thanks nurses who collected biologic samples and the Fondation de L'avenir for their subsidy

Disclosures:

The authors declare they have nothing to disclose in accordance with J am Soc Nephrol policies.

Funding

The Fondation de l'Avenir provided a donation allowing this research to be carried out.

References

1. coemans M, Süsal C, Döhler B, Anglicheau D, Giral M et al. Analyses of the short - and long term graft survival after kidney transplantation in Europe between 1986 and 2015. *Kidney Int.* 2018;95(5):964-973.
2. Lodhi SA, Lamb KE, Meier-Kriesche HU. Improving long-term outcomes for transplant patients: Making the case for long-term disease-specific and multidisciplinary research. *Am J Transplant.* 2011;11(10):2264-2265. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03713.x
3. Cohen-Bucay A, Gordon CE, Francis JM. Non-immunological complications following kidney transplantation [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research.* 2019;8. doi:10.12688/f1000research.16627.1
4. Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N Engl J Med.* 2018;379(12):1150-1160. doi:10.1056/nejmra1802677
5. Sellarés J, De Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: The dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant.* 2012;12(2):388-399. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03840.x
6. Halloran PF, Chang J, Famulski K, et al. Disappearance of T cell-mediated rejection despite continued antibody-mediated rejection in late kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(7):1711-1720. doi:10.1681/ASN.2014060588
7. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(8):486-499. doi:10.1038/nri3862
8. Blank CU, Haining WN, Held W, et al. Defining 'T cell exhaustion.' *Nat Rev Immunol.* 2019. doi:10.1038/s41577-019-0221-9
9. Gruener NH, Lechner F, Jung M-C, et al. Sustained Dysfunction of Antiviral CD8+ T

- Lymphocytes after Infection with Hepatitis C Virus. *J Virol*. 2001;75(12):5550-5558.
doi:10.1128/jvi.75.12.5550-5558.2001
10. Ye B, Liu X, Li X, Kong H, Tian L, Chen Y. T-cell exhaustion in chronic hepatitis B infection: current knowledge and clinical significance. *Cell Death Dis*. 2015;6(3):e1694.
doi:10.1038/cddis.2015.42
 11. Shankar P, Russo M, Harnisch B, Patterson M, Skolnik P, Lieberman J. Impaired function of circulating HIV-specific CD8+ T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 2000;96(9):3094-3101. doi:10.1182/blood.v96.9.3094
 12. Baitsch L, Baumgaertner P, Devèvre E, et al. Exhaustion of tumor-specific CD8+ T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2350-2360.
doi:10.1172/JCI46102
 13. Matsuzaki J, Gnjatic S, Mhawech-Fauceglia P, et al. Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(17):7875-7880. doi:10.1073/pnas.1003345107
 14. Zhang Y, Huang S, Gong D, Qin Y, Shen Q. Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer. *Cell Mol Immunol*. 2010;7(5):389-395. doi:10.1038/cmi.2010.28
 15. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-264. doi:10.1038/nrc3239
 16. Ledford H. Melanoma drug wins US approval. *Nature*. 2011;471(7340):561.
doi:10.1038/471561a
 17. Bara Sarraj, Junsheng Yeb, Ahmed Ibrahim Akl, Guodong Chen, Jiao-Jing Wang, Zheng Zhang FA, Michael Abecassis, Stephen D. Miller, Geoffrey S. Kans and MJA. Impaired selectin-dependent leukocyte recruitment induces T-cell exhaustion and prevents chronic allograft

- vasculopathy and rejection. *PNAS*. 2014;111(33):12145–12150.
18. Zou D, Dai Y, Zhang X, et al. T cell exhaustion is associated with antigen abundance and promotes transplant acceptance. *Am J Transplant*. 2020;20(9):2540-2550.
doi:10.1111/ajt.15870
 19. Fribourg M, Anderson L, Fischman C, et al. T-cell exhaustion correlates with improved outcomes in kidney transplant recipients. *Kidney Int*. 2019;96(2):436-449.
doi:10.1016/j.kint.2019.01.040
 20. Del Bello A, Kamar N, Treiner E. T cell reconstitution after lymphocyte depletion features a different pattern of inhibitory receptor expression in ABO- versus HLA-incompatible kidney transplant recipients. *Clin Exp Immunol*. 2020;200(1). doi:10.1111/cei.13412
 21. Levine JH, Simonds EF, Bendall SC, et al. Data-Driven Phenotypic Dissection of AML Reveals Progenitor-like Cells that Correlate with Prognosis. *Cell*. 2015;162(1):184-197.
doi:10.1016/j.cell.2015.05.047
 22. Laurens van der Maaten. Accelerating t-SNE using Tree-Based Algorithms. *J Mach Learn Res*. 2014;15:3221-3245.
 23. Dougall WC, Kurtulus S, Smyth MJ, Anderson AC. TIGIT and CD96: new checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*. 2017;276(1):112-120.
doi:10.1111/imr.12518
 24. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009;10(1):48-57. doi:10.1038/ni.1674
 25. Liang R, Zhu X, Lan T, et al. TIGIT promotes CD8+T cells exhaustion and predicts poor prognosis of colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*. February 2021.
doi:10.1007/s00262-021-02886-8

26. Harjunpää H, Guillerey C. TIGIT as an emerging immune checkpoint. *Clin Exp Immunol*. 2020;200(2):108-119. doi:10.1111/cei.13407
27. Lozano E, Dominguez-Villar M, Kuchroo V, Hafler DA. The TIGIT/CD226 Axis Regulates Human T Cell Function. *J Immunol*. 2012;188(8):3869-3875. doi:10.4049/jimmunol.1103627
28. Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis*. 1999;5(4):285-294. doi:10.1097/00054725-199911000-00009
29. Heidt S, San D, Chadha R, Wood KJ. The impact of Th17 cells on transplant rejection and the induction of tolerance. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15(4):456-461. doi:10.1097/MOT.0b013e32833b9bfb
30. Szczepanik A, Isella CJ, McDyer JF, Ensor CR. Cytokine-targeted therapy for the management of solid organ transplant recipients. *Hum Immunol*. 2019;80(3):184-190. doi:10.1016/j.humimm.2018.12.006
31. Tang W, Pan X, Han D, et al. Clinical significance of CD8+ T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains+ in locally advanced gastric cancer treated with SOX regimen after D2 gastrectomy. *Oncoimmunology*. 2019;8(6). doi:10.1080/2162402X.2019.1593807
32. Lee WJ, Lee YJ, Choi ME, et al. Expression of lymphocyte-activating gene 3 and T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains in cutaneous melanoma and their correlation with programmed cell death 1 expression in tumor-infiltrating lymphocytes. *J Am Acad Dermatol*. 2019;81(1):219-227. doi:10.1016/j.jaad.2019.03.012
33. Stålhammar G, Seregard S, Grossniklaus HE. Expression of immune checkpoint receptors Indoleamine 2,3-dioxygenase and T cell Ig and ITIM domain in metastatic versus nonmetastatic choroidal melanoma. *Cancer Med*. 2019;8(6):2784-2792. doi:10.1002/cam4.2167
34. Kurita M, Yoshihara Y, Ishiuchi Y, et al. Expression of T-cell immunoglobulin and

- immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domain on CD4 + T cells in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol.* 2019;46(1):37-42. doi:10.1111/1346-8138.14696
35. Lavon I, Heli C, Brill L, Charbit H, Vaknin-Dembinsky A. Blood Levels of Co-inhibitory- Receptors: A Biomarker of Disease Prognosis in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2019;10:835. doi:10.3389/fimmu.2019.00835
36. Fuchs S, Sawas N, Staedler N, et al. High-dimensional single-cell proteomics analysis identifies immune checkpoint signatures and therapeutic targets in ulcerative colitis. *Eur J Immunol.* 2019;49(3):462-475. doi:10.1002/eji.201847862
37. Zhou H, Li B, Li J, et al. Dysregulated T cell activation and aberrant cytokine expression profile in systemic lupus erythematosus. *Mediators Inflamm.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/8450947
38. Li W, Deng C, Yang H, et al. Expansion of circulating peripheral TIGIT+CD226+ CD4 T cells with enhanced effector functions in dermatomyositis. *Arthritis Res Ther.* 2021;23(1). doi:10.1186/s13075-020-02397-4
39. Deng C, Chen Y, Li W, et al. Alteration of CD226/TIGIT immune checkpoint on T cells in the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *J Autoimmun.* 2020;113. doi:10.1016/j.jaut.2020.102485
40. Weulersse M, Asrir A, Pichler AC, et al. Eomes-Dependent Loss of the Co-activating Receptor CD226 Restrains CD8+ T Cell Anti-tumor Functions and Limits the Efficacy of Cancer Immunotherapy. *Immunity.* 2020;53(4):824-839.e10. doi:10.1016/j.immuni.2020.09.006
41. Yeo J, Ko M, Lee D-H, Park Y, Jin H-S. TIGIT/CD226 Axis Regulates Anti-Tumor Immunity. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021;14(3):1-20. doi:10.3390/ph14030200
42. Sanchez-Correa B, Gayoso I, Bergua JM, et al. Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. *Immunol Cell Biol.* 2012;90(1):109-115. doi:10.1038/icb.2011.15

43. Ko Y, Yeon Kim J, Kim SH, et al. Acute rejection and infectious complications in abo- and hla-incompatible kidney transplantations. *Ann Transplant*. 2020;25:e927420-1-e927420-10. doi:10.12659/AOT.927420
44. Venner JM, Hidalgo LG, Famulski KS, Chang J, Halloran PF. The molecular landscape of antibody-mediated kidney transplant rejection: Evidence for NK involvement through CD16a Fc receptors. *Am J Transplant*. 2015;15(5):1336-1348. doi:10.1111/AJT.13115
45. Alfei F, Kanev K, Hofmann M, et al. TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. *Nature*. 2019. doi:10.1038/s41586-019-1326-9
46. Yao C, Sun HW, Lacey NE, et al. Single-cell RNA-seq reveals TOX as a key regulator of CD8+ T cell persistence in chronic infection. *Nat Immunol*. 2019;20(7):890-901. doi:10.1038/s41590-019-0403-4
47. Fourcade J, Sun Z, Chauvin JM, et al. CD226 opposes TIGIT to disrupt Tregs in melanoma. *JCI insight*. 2018;3(14). doi:10.1172/jci.insight.121157
48. Liu X, Li M, Wang X, et al. PD-1+ TIGIT+ CD8+ T cells are associated with pathogenesis and progression of patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(12):2041-2054. doi:10.1007/s00262-019-02426-5
49. Khan O, Giles JR, McDonald S, et al. TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion. *Nature*. 2019. doi:10.1038/s41586-019-1325-x

Table 1. Main characteristics of the 30 living-donor kidney transplant recipients included in the inhibitory receptors expression changes after transplantation.

Variable	Results
Recipient age (years), mean (\pm range)	52 \pm 10
Recipient gender, male (%)	18 (60)
Donor age (years), mean (\pm range)	53 \pm 13
Time between Tx- sample analysis (months), median (IQR 25-75)	39 (27; 71)
CKD-Epi estimated GFR at sample analysis, mL/min/1.73m ² , mean (\pm range)	58 \pm 21
Positive CMV serology, yes (%)	16 (53)
Positive EBV serology, yes (%)	30 (100)
Positive Toxoplasma Gondii serology, yes (%)	25 (83)
Initial kidney disease: n (%)	
- Glomerular	14 (47)
- PKD	11 (37)
- Vascular	1 (3)
- Unknown	4 (13)
Donor-Recipient HLA mismatches, mean (\pm range)	
A, B mismatches	3.7 \pm 2.4
DR, DQ mismatches	1.9 \pm 1.3
A, B, DR, DQ mismatches	1.8 \pm 1.4
Anti-HLA sensitization:	
- Anti-class I	4 (13)
- Anti-class II	2 (7)
- Anti-class I and II	1 (3)
- Donor-Specific Antibodies	0
Immunosuppressive therapy	
- Anti-CD25 at induction, yes (%)	12 (40)

Abbreviations: Tx, Transplantation; GFR, Glomerular Filtration Rate.

Table 2. Main characteristics of the 15 living-donor kidney transplant recipients included in the functional analysis.

Variable	Early (n=7)	Late (n=8)	Results
Recipient age (years), mean (\pm range)	51 \pm 13	52 \pm 14	0.73
Recipient gender, male (%)	5 (71)	6 (75)	0.99
Donor age (years), (\pm range)	55 \pm 19	46 \pm 14	0.48
Donor-Recipient mismatches, mean (\pm range)			
A, B mismatches	2.3 \pm 0.5	3.0 \pm 1.2	0.16
DR, DQ mismatches	1.9 \pm 1.1	2.9 \pm 0.9	0.11
A, B, DR, DQ mismatches	4.1 \pm 0.9	5.9 \pm 1.7	0.09
Initial kidney disease			0.45
- Glomerular	4	2	
- PKDA/genetic	2	4	
- Unknown	1	2	
Time between Tx- sample analysis (months) median (IQR 25-75)	1 (1; 1)	64 (50; 83)	0.001
CKD-Epi eGFR at sample analysis, mL/min/1.73m ² , mean (\pm range)	49 \pm 17	70 \pm 18	0.08
Positive CMV serology, yes (%)	5 (71)	4 (50)	0.61
Positive EBV serology, yes (%)	6 (86)	8 (100)	0.47

Abbreviation: eGFR, estimated Glomerular Filtration Rate.

Table 3. Main characteristics of patients included for the donor- specific response analyses.

Variable	Result
Recipient age at Tx (median), IQR (25-75)	42 ± 17
Recipient sex, male yes (%)	3 (38)
Recipient CMV serology positive (%)	4 (50)
Recipient EBV serology positive (%)	7 (88)
Time between Tx- blood sample analysis (months), IQR (25-75) *	3 (3; 11)
Anti-class I/II anti-HLA sensitization, yes (%)	2 (25)
Donor- Specific Antibodies at blood sample analysis, yes	0
Anti-CD25 induction therapy, yes (%)	4 (50)

*One patient provided blood samples for investigation at 0.5, 1-, and 3-months post- transplantation, and one other patient provided blood samples for investigation at 3- and 6-months post-transplantation.

Figure Legends

Figure 1 (A-C) Phenotype analyses of mCD4+ T cells.

- A. CD3+ T cell rate after transplantation
- B. CD4+ proportion among CD3+ (left) and memory T cell subsets of CD4+ (right)
- C. Circulating T follicular helpers (due to blood sample availability, only 24 patients were tested).

Figure 2 (A-E) Functional and phenotypic analyses of mCD4+ T cells. Comparisons were performed by an unpaired Mann-Whitney t-test. Statistical correlation was performed using a Spearman correlation test.

- A. IFN γ , IL-2 and TNF α , and IFN γ +IL-2+TNF α production in mCD4+ T cells in unstimulated (UNS) or after PMA-ionomycin stimulation in early (<3 months) and late (> 2 years) transplant patients.
- B. Percentage of memory CD4+ T cells expressing 0, 1, 2, 3, 4, or 5 inhibitory receptors
- C. Unbiased clustering analysis of inhibitory receptor expression and CD226 expression in mCD4+ T cells after transplantation
- D. TIGIT, TIGIT+CD226+ expression in mCD4+ T cells (left) and TIGIT/CD226 expression ratio in memory CD4+ T cells.
- E. Correlation between percentage of CXCR3+CCR6- (Th1), and CXCR3+CCR6+ (Th17*) subsets and percentage of TIGIT+CD4+ in memory CD4+ T cells

Figure 3 (A-C) Functional analyses according to TIGIT and CD226 expression in mCD4+ T cells in early (<3 months) and late (>2 years) kidney transplant patients. Comparisons were performed by an unpaired Mann-Whitney t-test (*p< 0.05, ** p< 0.01, ***p<0.001)

- A. Comparison of IFN γ , IL2 and TNF α production in mCD4+ T cells according to the expression of TIGIT in patients recently transplanted and those far from transplantation
- B. Comparison of IFN γ , IL2 and TNF α production in mCD4+ T cells according to the expression of CD226 in patients recently transplanted and those far from transplantation
- C. Comparison of IFN γ , IL2 and TNF α production in mCD4+ T cells according to the expression of TIGIT and CD226 in patients recently transplanted and those far from transplantation

Figure 4. Phenotype and functional analyses of mCD8+ T cells. Comparisons were performed by an unpaired Mann-Whitney t-test. Statistical correlation was performed using a Spearman correlation test. (*: p<0.05)

- A. Memory CD8+ subsets over time post-transplantation
- B. Comparison of IFN γ , IL2, and TNF α production in mCD8+ in the recently transplanted and those far from transplantation.

- C. Percentage of mCD8+ T cells that express 3 inhibitory receptors over time post-transplantation
- D. Unbiased clustering analysis of the different inhibitory receptors.

Figure 5 (A-C) Donor -specific and third-parties responses.

A. Proliferation of CD3+, CD4+ and CD8+ T cells after autologous, allospecific, third-parties, and mitogenic stimulation. Comparisons were performed by an unpaired Mann-Whitney t-test.

*: $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$

B. Expression of each Inhibitory receptor in CTV^{low} CD4+ (left) and CD8+ (right) proliferating cells.

C. Unbiased clustering analysis of T cell phenotype before MLR, and correlation with donor-specific and third-party stimulation.

Supplementary documents

Supporting document 1. List of antibodies (and supplies) used in the study.

Supporting document 2. Phenotype analyses of exhaustion markers after kidney transplantation

(A) Gating strategy

a & b) Identification of singlets using Forward Scatter (FSC)-W versus FSC-H (a) and Side Scatter (SSC) W vs SSC-H (b). Viable T cells were selected by gating on CD3⁺ cells and negative expression of the fixable viability stain (c). Within the lymphocyte population, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were differentiated based on the surface expression of CD3⁺ and either CD4⁺ or CD8⁺ (d). Memory CD4⁺ (e) or CD8⁺ (f) T cells subsets were differentiated using the expression of CD45RA and CCR7 expression. Expression of the different inhibitory receptors, KLRG1, CD28, CD57, and TNF α , IFN γ , IL2 was analyzed in non-naïve CD4⁺ (g, k) and CD8⁺ T cells (h, l). The subsets were differentiated based on CXCR3, CCR4, CCR6, CCR5 expression. Tregs were defined using CD25, CD127, and FoxP3 expression.

(B) CXCR3⁺CCR6⁻ (Th1), CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁺ (Th2), CXCR3⁺CCR6⁺ (Th17), and CXCR3⁺CCR6⁺ (Th17*) subsets in mCD4⁺ T cells with time post transplantation (Due to blood sample availability, only 24 patients were tested)

(C) CD28⁺CD57⁺, KLRG1⁺, DR⁺ (only 25 patients were tested, due to blood sample availability), and FoxP3⁺CD25^{hi}CD127^{low} (regulatory T cells) (n=15, due to blood sample availability) subsets in mCD4⁺ T cells with time post transplantation.

(D) Expression of each Inhibitory receptors in mCD4⁺ T cells with time post transplantation.

(E) Comparison of CD4⁺ naïve and memory T cell expression, in dialysis (D0) and transplant recipients.

(F) CXCR3⁺CCR6⁻ (Tc1), CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁺ (Tc2), CXCR3⁺CCR6⁺ (Tc17), and CXCR3⁺CCR6⁺ (Tc17*) subsets in mCD8⁺ T cells with time post transplantation (only 25 patients were tested, due to blood sample availability).

(G) CD28-CD57+, KLRG1+, DR+ subsets in mCD8+ T cells with time post transplantation (only 25 patients were tested, due to blood sample availability)

(H) Comparison of CD8+ naïve and memory T cell expression, in dialysis (D0) and transplant recipients.

Supporting document 3. Mixed lymphocyte reaction

(A) Mixed Lymphocyte Reaction protocol

MLR assays were performed with CTV-labelled recipient cells, and CMFDA-labeled and irradiated stimulator cells, under four conditions: autologous (recipient cells used as stimulator cells), allo-specific (living kidney donor used as stimulator cells), third parties (from 4 different healthy blood donors equally distributed used as stimulator cells) and positive control with mitogenic agents (anti-CD2/CD3/CD28).

Phenotype analyses were performed before and after 7 days of culture.

After the culture, a functional analysis by Intra-cellular staining (ICS) of IL2, and IFN γ expression was performed after 4 hours of stimulation with PMA-ionomycin.

(B) Gating strategy

a & b) Identification of singlets using Forward Scatter (FSC)-W versus FSC-H (a) and Side Scatter (SSC) W vs. SSC-H (b). Responders T cells were selected by gating on CMFDA- cells (c), and the next negative expression of the fixable viability stain (d). Within the lymphocyte population, CD4+ and CD8+ T cells were differentiated based on the surface expression of CD3+ and either CD4+ or CD8+ (e). Proliferating cells were identified by gating on CTV- cells (f). Expression of the different inhibitory receptors, KLRG1, CD28, CD57, and TNF α , IFN γ , and IL2 was analyzed in non-naïve CD4+ (g, i) and CD8+ T cells (h, j).

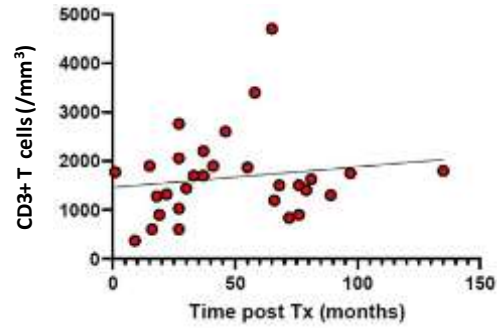
(C) TNF α , IFN γ , and IL-2 expression in CTV^{low} CD4+ T cells after mitogenic restimulation (left), and correlation between cytokine expression and time post transplantation.

(D) TNF α , IFN γ , and IL-2 expression in CTV^{low} CD8+ T cells after mitogenic restimulation (left), and correlation between cytokine expression and time post transplantation.

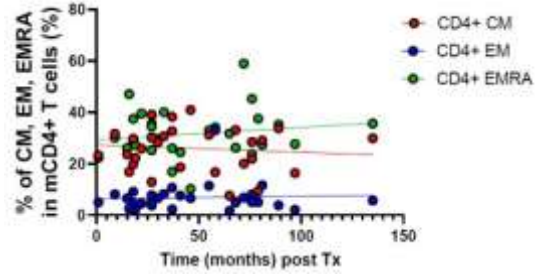
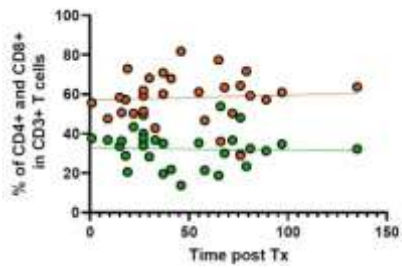
(E) Correlation between expression of each IR expression in CD4+ T cells before stimulation and donor-specific (left) and allo-specific/ third-parties proliferation ratio (right).

(F) Correlation between expression of each IR expression in CD8+ T cells before stimulation and donor-specific (left) and allo-specific/ third-parties proliferation ratio (right).

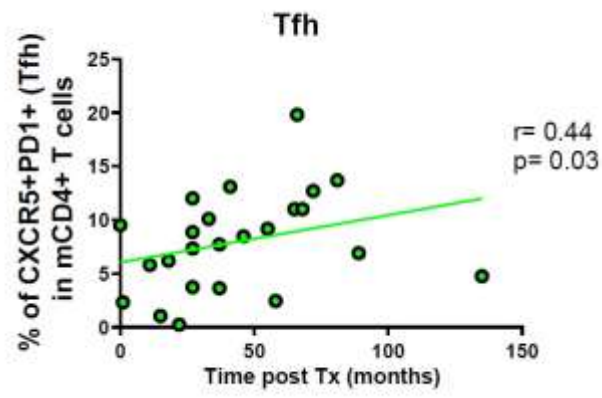
1A



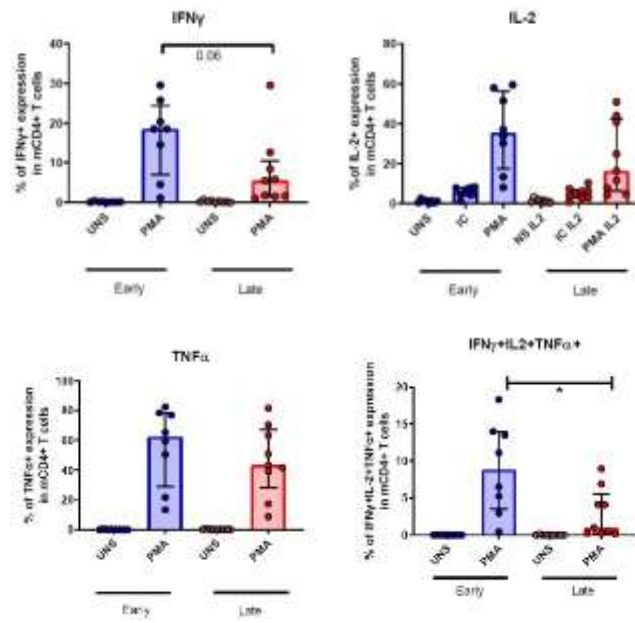
1B



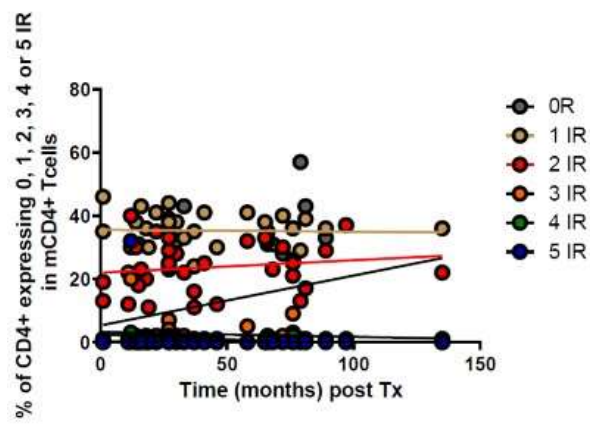
1C



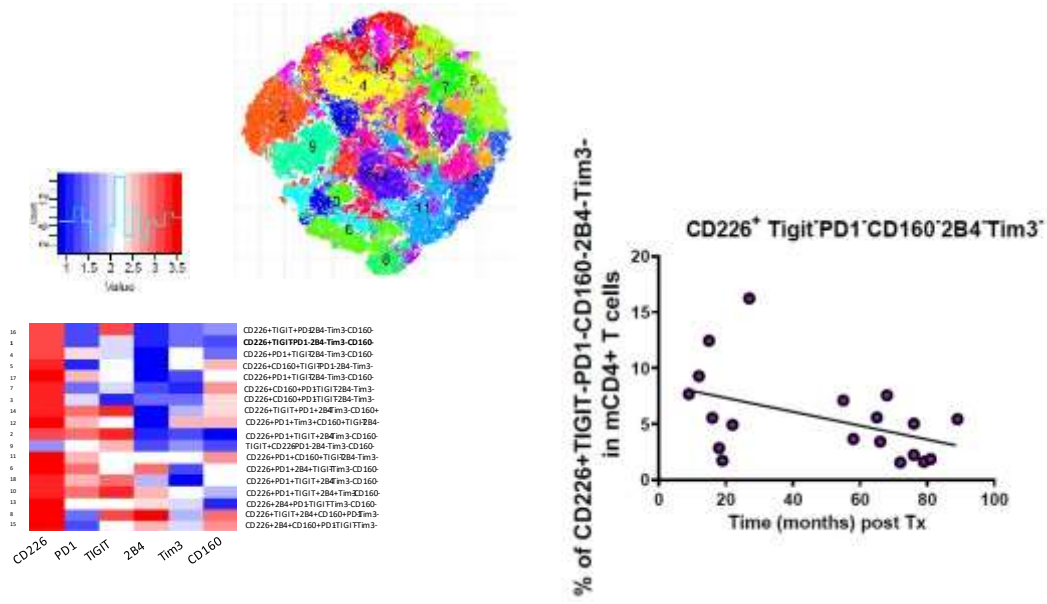
2A



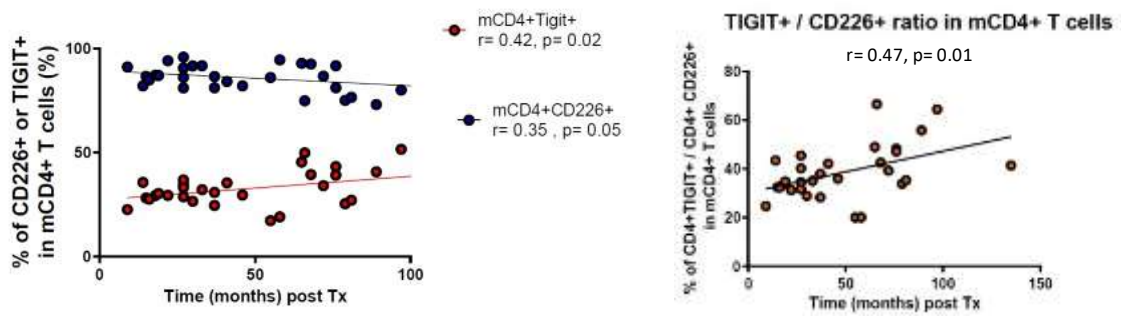
2B



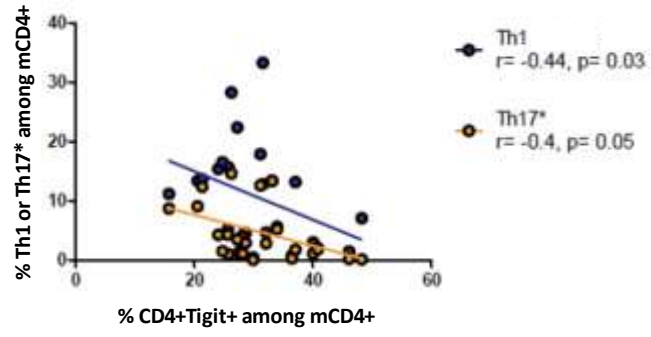
2C



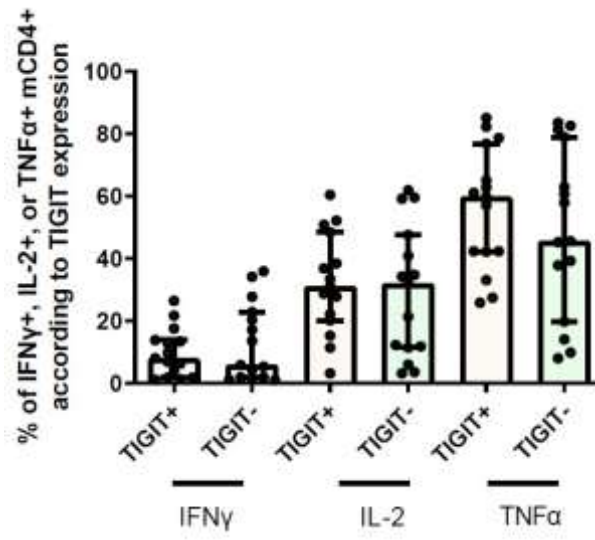
2D



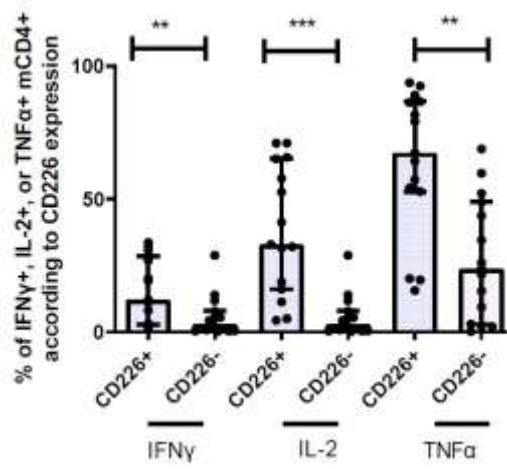
2E



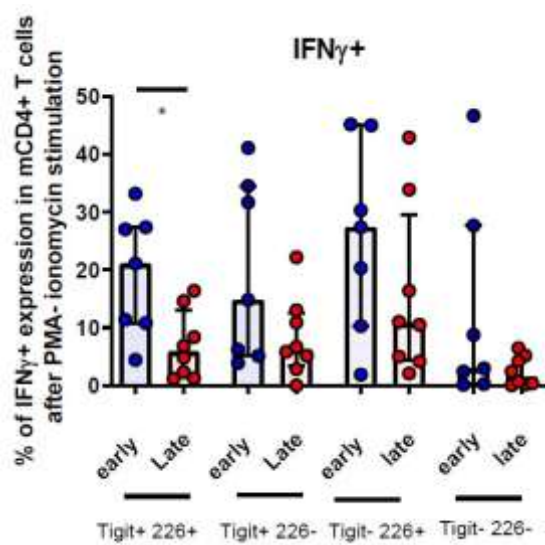
3A



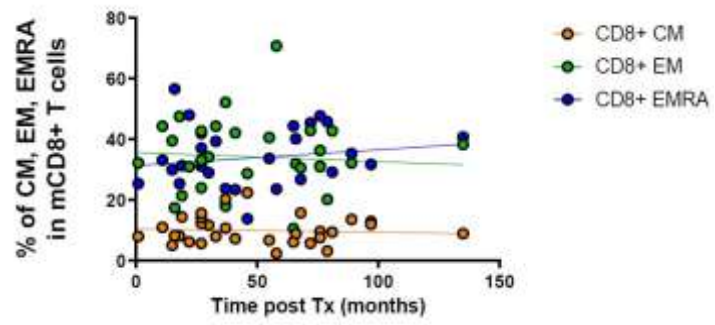
3B



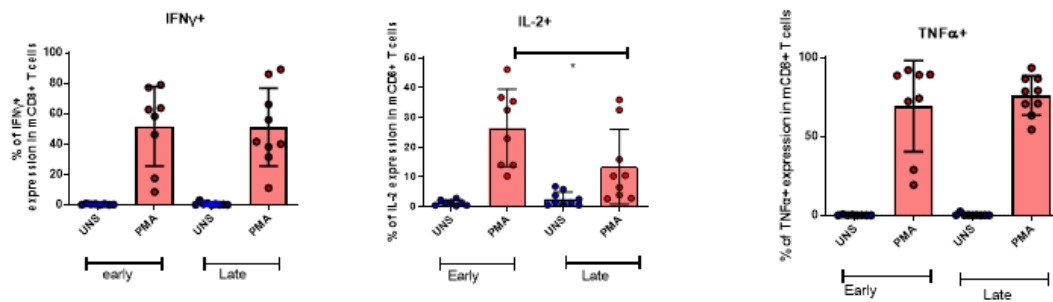
3C



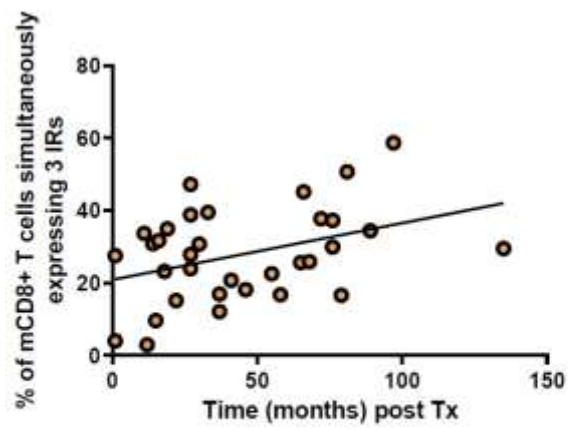
4A



4B

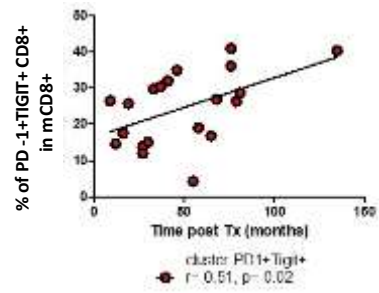
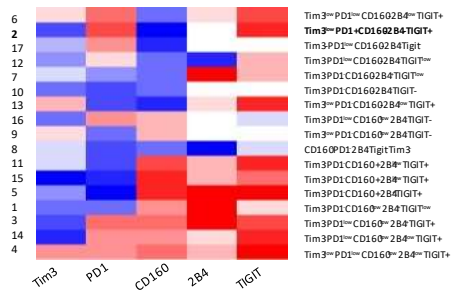
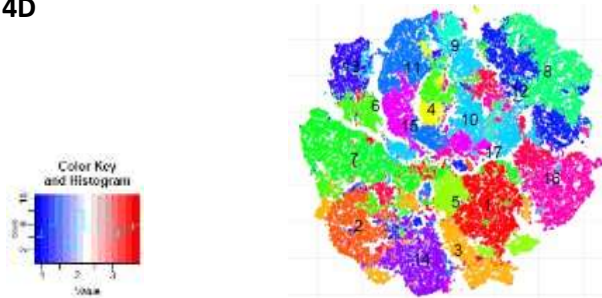


4C



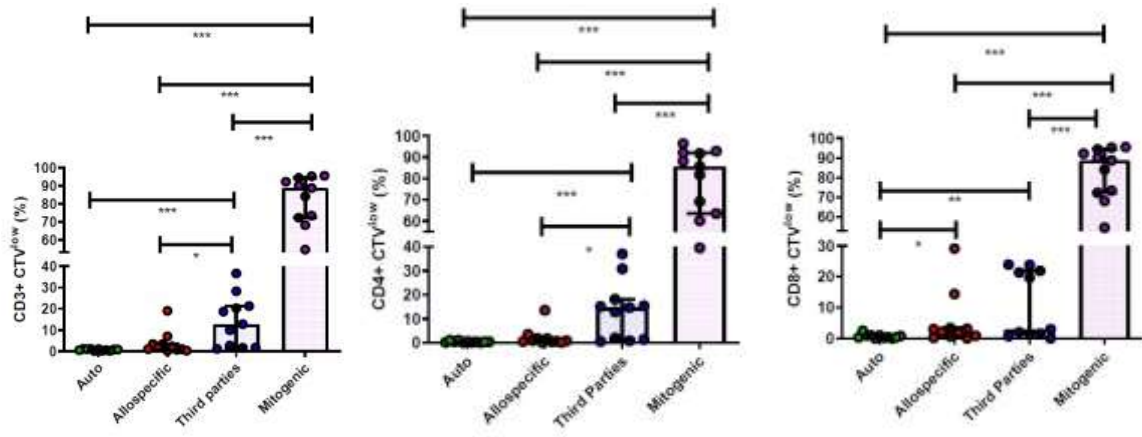
● 3 IRs simultaneously expressed in mCD8+ T cells
 $r = 0.39, p = 0.03$

4D

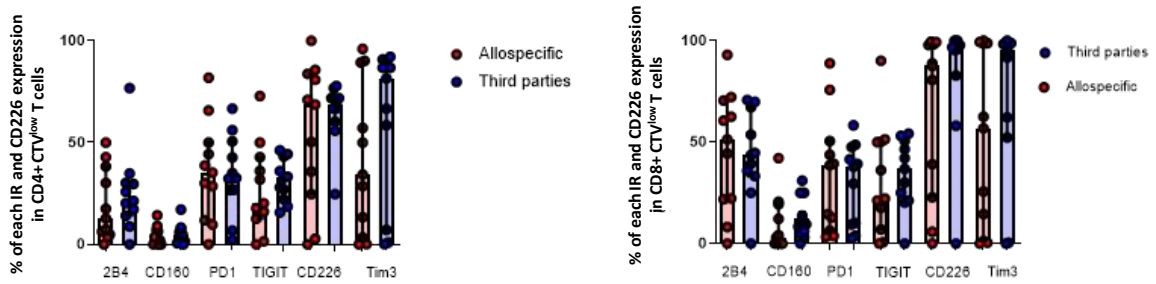


● cluster PD1+Tigt+
 $r = 0.51, p = 0.02$

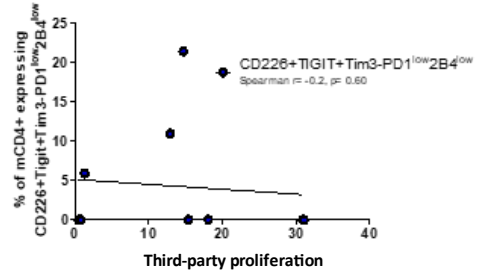
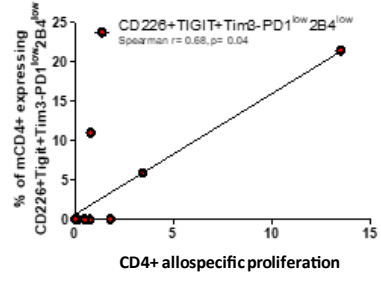
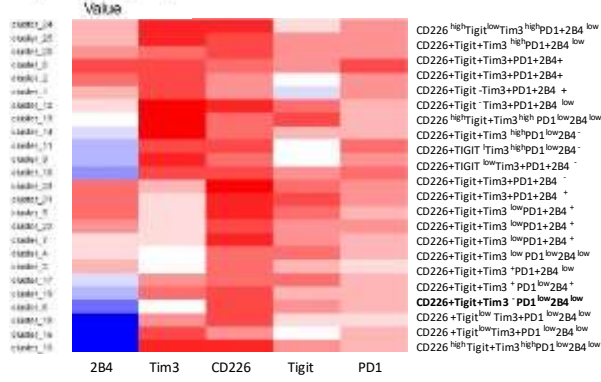
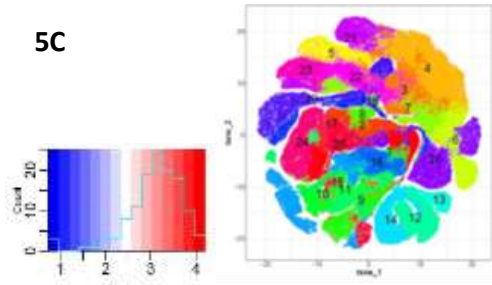
5A



5B



5C



Supporting documents

- Table of contents:

- Supporting document 1 (list of antibodies and supplies used in the study)
- Supporting document 2 (Phenotype analyses of exhaustion markers after kidney transplantation)
- Supporting document 3 (Mixed lymphocyte reaction)

Supporting Document 1. List of antibodies and supplies used in the study.

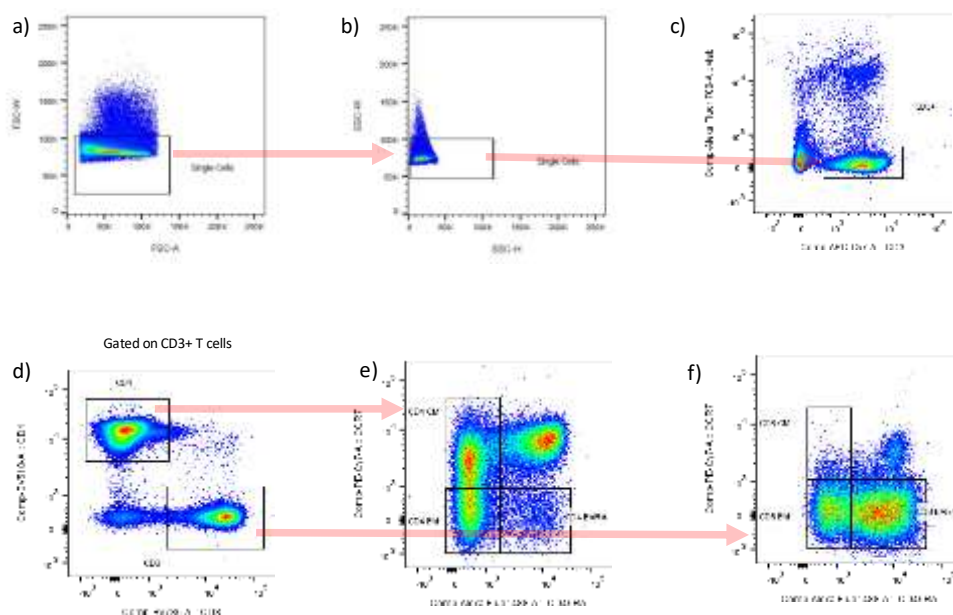
Flow cytometry analysis:

The list of antibodies included: CD4BV510 (BD- Biosciences), CD8-BV786/785A (BD Biosciences), CD3-APC-H7/APC Cy7 (BD Biosciences), CD45RA -FITC/Alexa Fluor 488 (BD Biosciences), TIGIT- BB700/PerCP/Cy5.5 (BD Biosciences), CD197-PE-Cy7 (BD Biosciences), CD244-PE-CF594 (Thermofisher), intra-cellularEomes-PE (BD Biosciences), CD160-Alexa Fluor647 (BD Biosciences), CD226-BV711 (BD Biosciences), CD279- BV650 (Thermofisher), CD366-BV421 (BioLegend), CD183- BB700/ PerCP/Cy5.5 (BD Biosciences), CD196-PE-CF594 (BD Biosciences), ICOS-PE (BD Biosciences), CXCR5- Alexa Fluor 647 (BD Biosciences), CD194 BD Horizon/ BV421 (BD Biosciences), HLA-DR- PECF594 (BD Biosciences), CD28-PE (BD Biosciences), CD57- PerCP/Cy5.5 (BD Biosciences), KLRG1-APC (BD Biosciences), CD25-PE-CF594 (BD Biosciences), intracellular FoxP3PE (BD Biosciences), intracellular HeliosAlexa Fluor647 (BD Biosciences), CD127-BV421 (BD Biosciences), intracellular CTLA4- PE-Cy7 (BD Biosciences), CD161- BB700/PerCP/Cy5.5 (BD Biosciences), intracellular Granzyme B Alexa Fluor647 (BD Biosciences), intracellular Perforin (BD Biosciences), Tim3PE (BioLegend), CD56-BV650 (BD Biosciences).

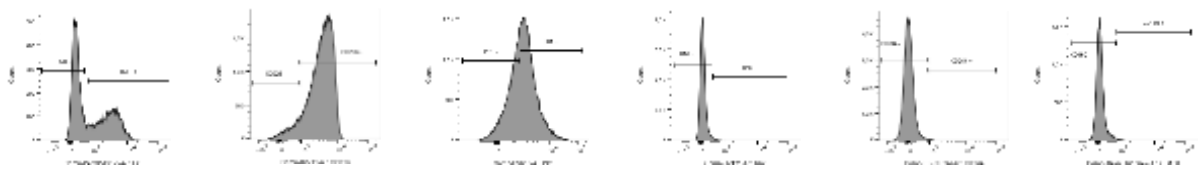
intracellular cytokines:

PBMC were stimulated for 4 hours at 37°C with phorbol myristate acetate (PMA; 100 ng/ml, Sigma-Aldrich) and ionomycin (100 ng/ml, Calbiochem, Millipore) in the presence of GolgiStop (BD Biosciences). Fixation and permeabilization were performed using Cell Fixation & Cell Permeabilization Kit (Thermofisher), followed by staining with the appropriate antibodies, including FITC-anti-TNF- α (BioLegend), BV510-anti-IL-2 (BD Biosciences), PE-Cy7-anti-IFN- γ (clone B27; BD Biosciences).

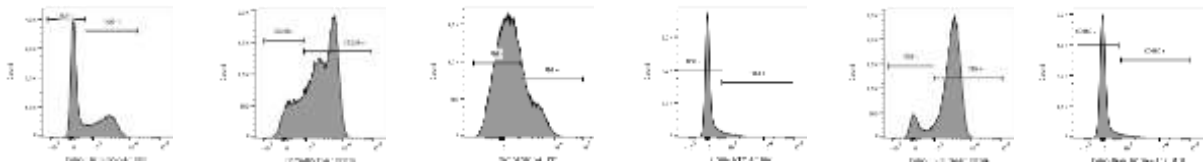
Supporting Figure 2A



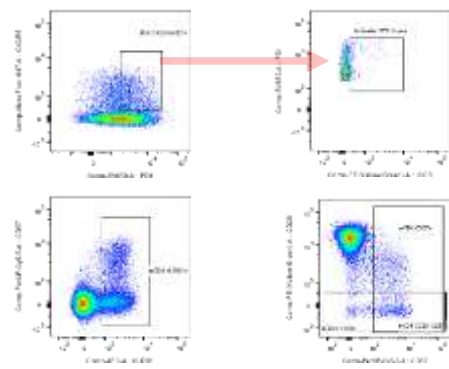
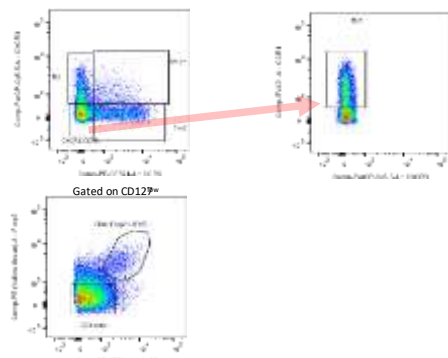
g) Inhibitory receptors and CD226 expression: gated on non-naive CD4+ T cells



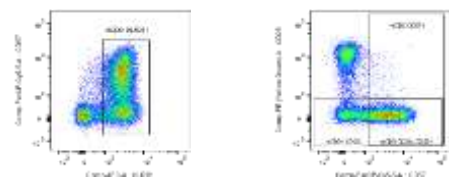
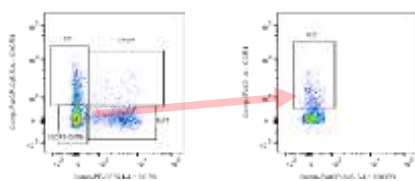
h) Inhibitory receptors and CD226 expression: gated on non-naive CD8+ T cells



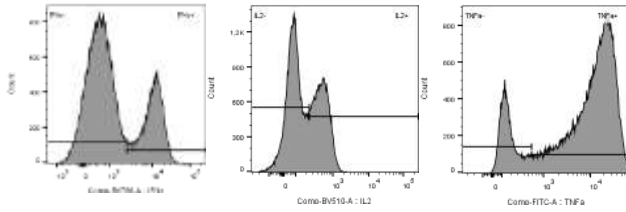
i) Gated on non-naive CD4+ T cells



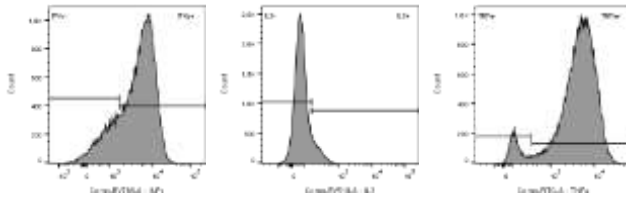
j) Gated on non-naive CD8+ T cells



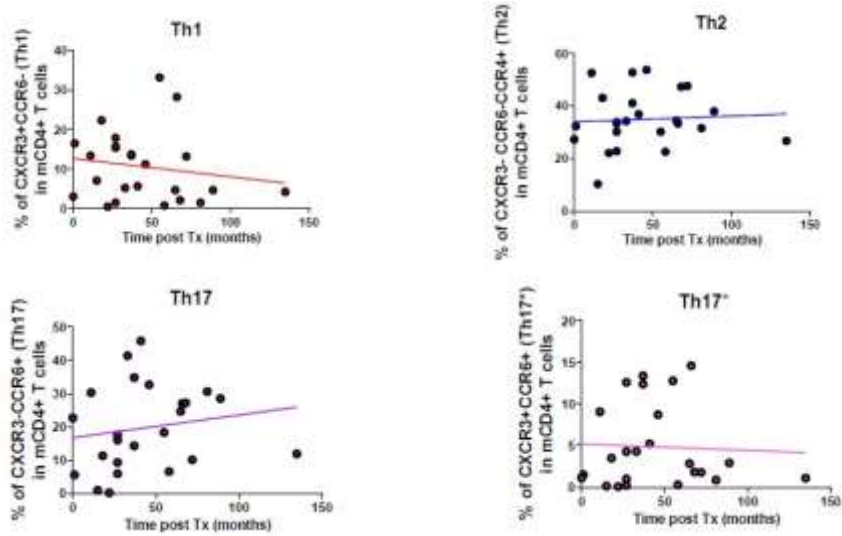
k) Functional analyses, gated on non-naive CD4+ T cells



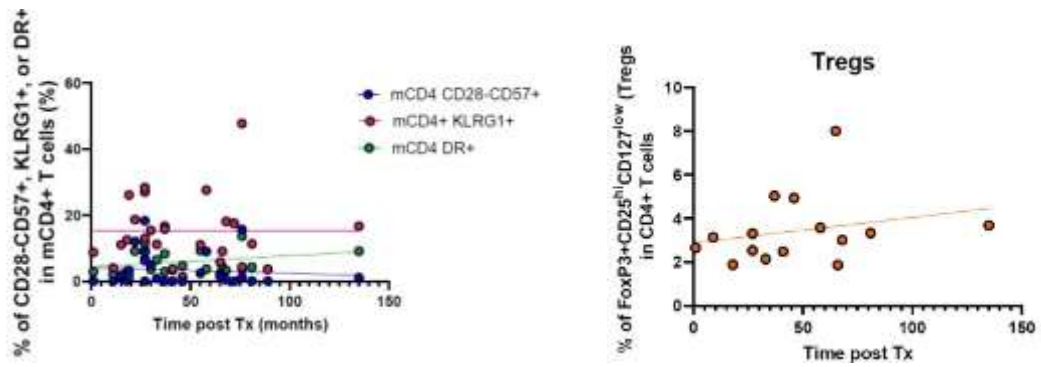
l) Functional analyses, gated on non-naive CD4+ T cells



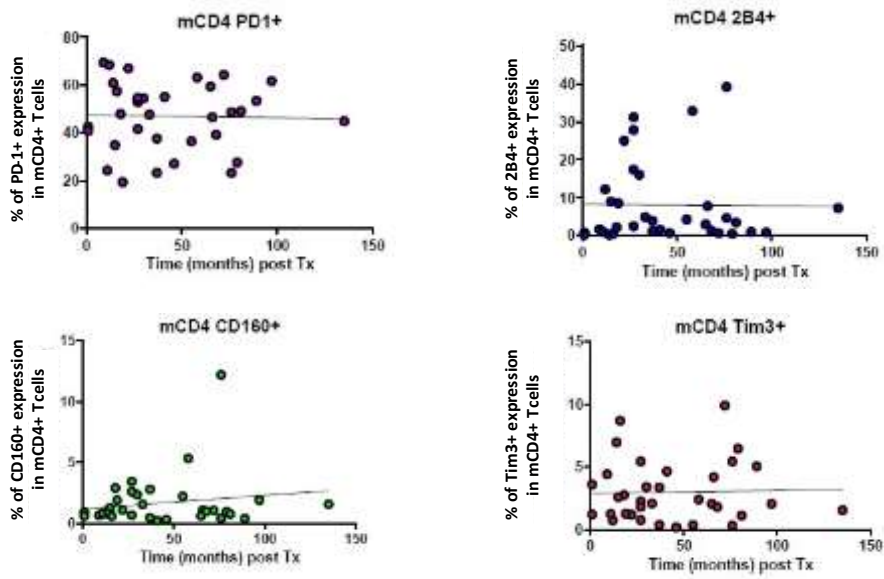
Supporting Figure 2B



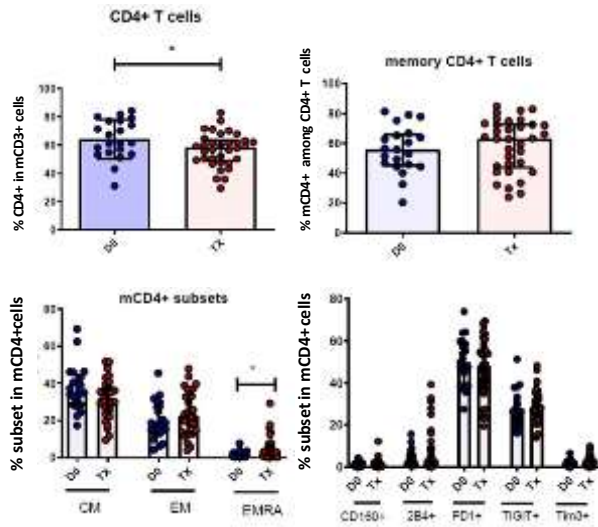
Supporting Figure 2C



Supporting Figure 2D



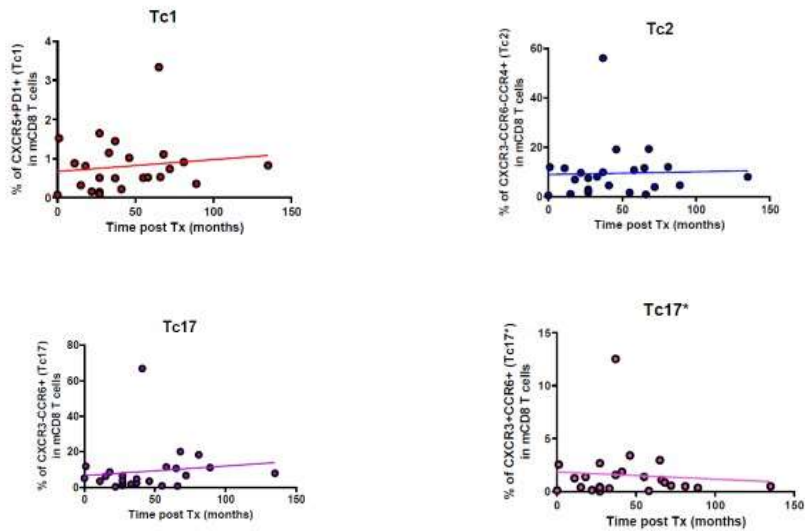
Supporting Figure 2E



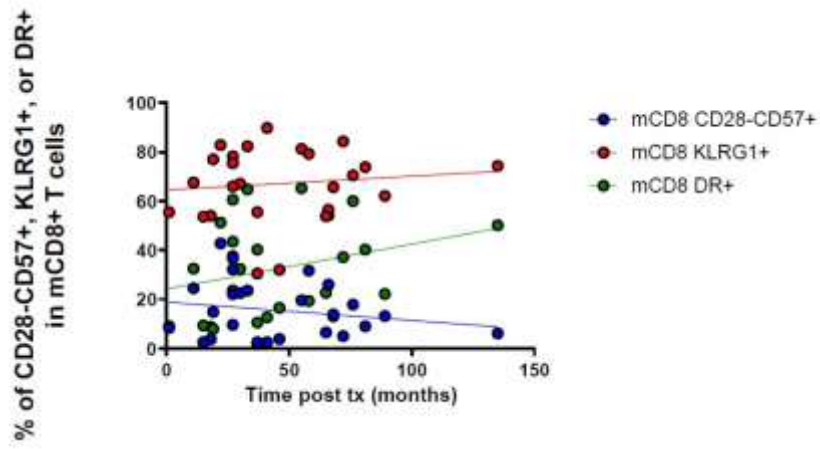
Variable	Dialysis patients (n=21)	Post-transplant recipients (n=30)	Results
Recipient age, year (IQR 25 -75)	57 ± 17	52 ± 14	0.10
Recipient gender, male (%)	15 (71)	18 (60)	0.55
Initial kidney disease			0.42
- Glomerular	9	14	
- ADPKD/genetic	5	11	
- vascular	3	1	
- Unknown	4	4	
Positive CMV serology, yes (%)	13 (62)	16 (53)	0.58
Positive EBV serology, yes (%)	19 (90)	30 (100)	0.16

Table S2. Comparison between dialysis patients and kidney transplant recipients. Abbreviations: ADPKD, Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease; CMV, Cytomegalovirus; EBV, Epstein-Barr Virus.

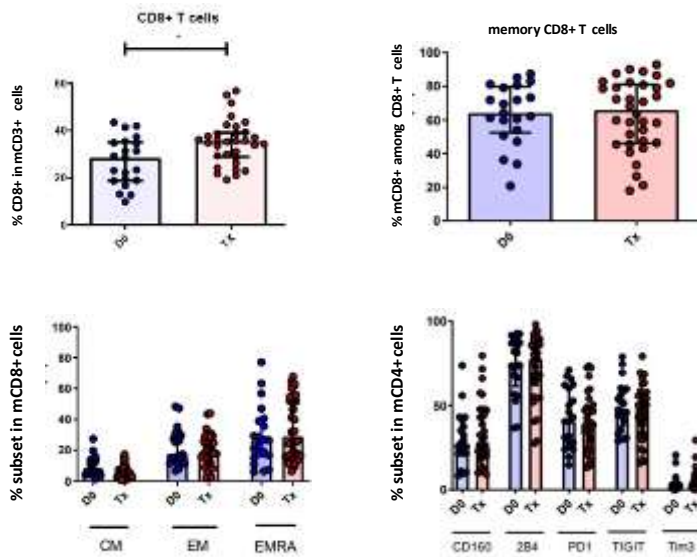
Supporting Figure 2F



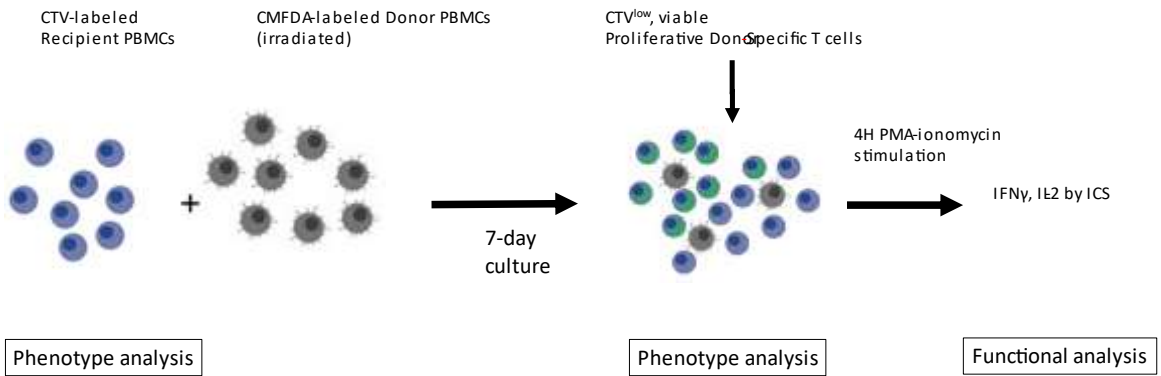
Supporting Figure 2G



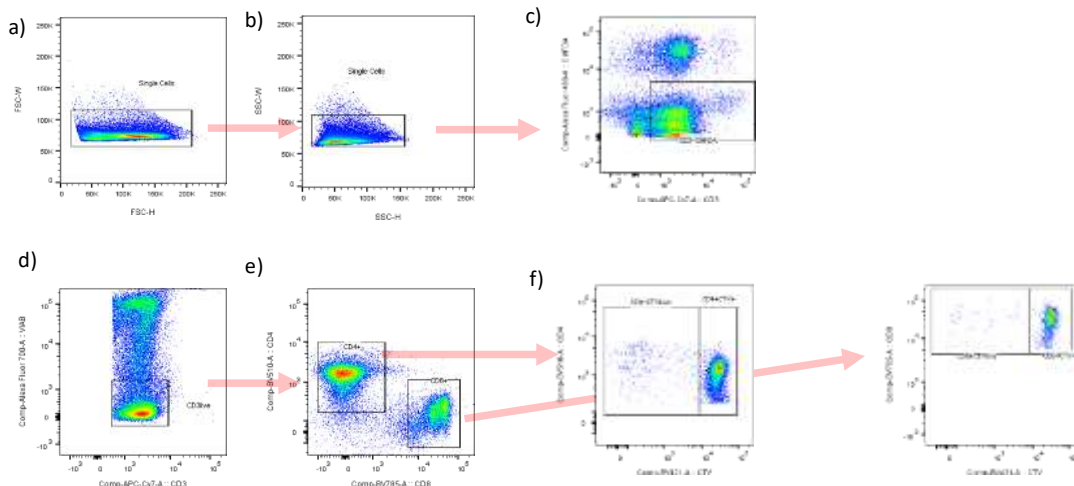
Supporting Figure 2H



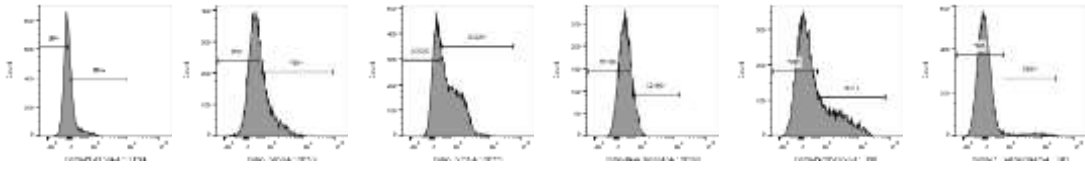
Supporting Document 3A



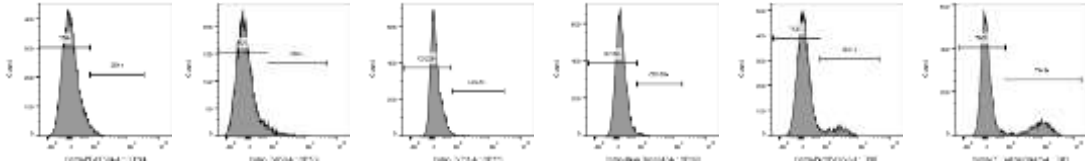
Supporting document 3 B Gating Strategy



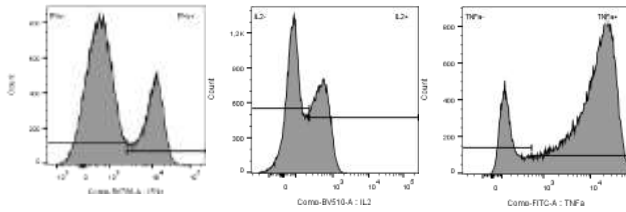
g) Inhibitory receptors and CD226 expression: gated on non-naive CD4+ T cells



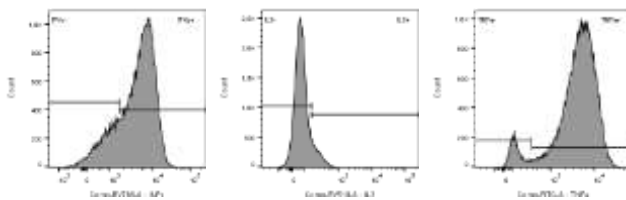
h) Inhibitory receptors and CD226 expression: gated on non-naive CD8+ T cells



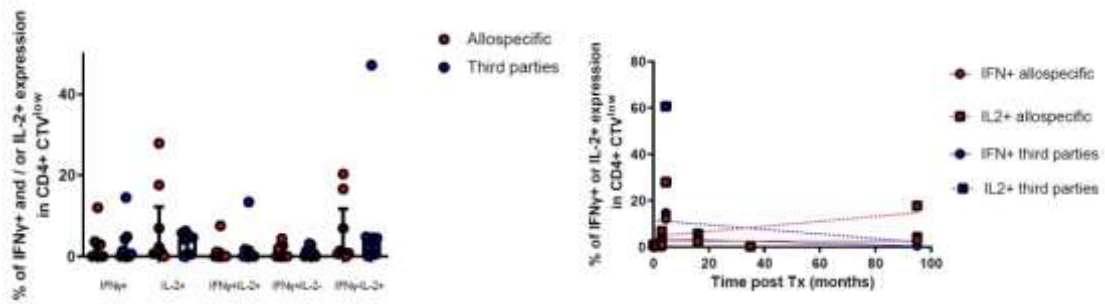
i) Functional analyses, gated on non-naive CD4+ T cells



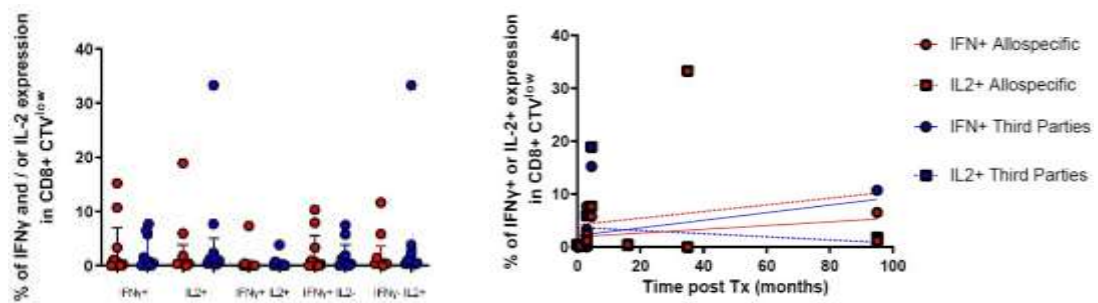
j) Functional analyses, gated on non-naive CD4+ T cells



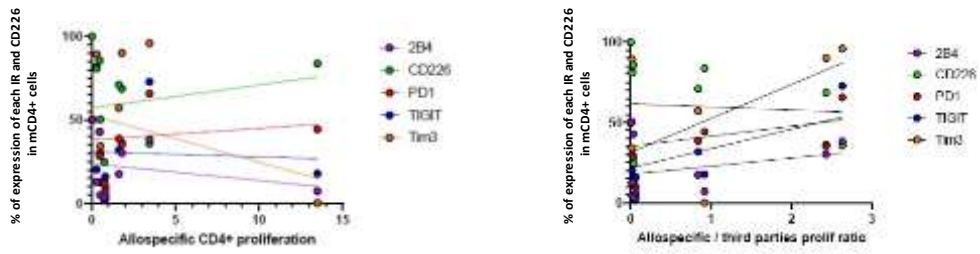
Supporting Figure 3C



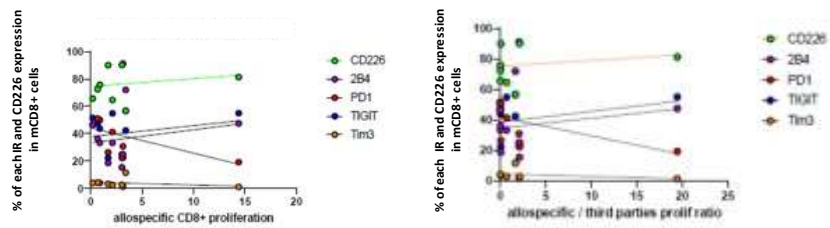
Supporting Figure 3D



Supporting Figure 3E



Supporting Figure 3F



3. Absence d'efficacité des inhibiteurs du checkpoint immun chez les patients greffés rénaux atteints d'une LEMP

Ce travail a fait l'objet d'une publication scientifique dans Emerging Infectious Disease

La Leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP) est causée par le virus JC (John Cunningham poliovirus). C'est une infection opportuniste d'une gravité extrême chez le patient greffé d'organe solide, mortelle dans une très grande majorité de cas. A ce jour, des traitements spécifiques ont été évoqués (comme les lymphocytes T spécifiques du BK-virus, d'origine allogénique) mais restent du domaine de la recherche car leur mise en place est extrêmement complexe. D'autres traitements comme les inhibiteurs du checkpoint immun (anti-PD-1, nivolumab et pembrolizumab) ont été décrits comme potentiellement efficaces principalement des patients atteints du VIH.

Nous avons traité et rapporté notre expérience au sujet de trois patients transplantés rénaux, atteint de LEMP et traités par nivolumab. Aucun des trois patients n'a répondu au traitement. Une analyse de l'expression des récepteurs inhibiteurs a montré la persistance à taux élevés de 2B4 et du CD160 après l'injection du traitement.

Immune checkpoint inhibitors do not improve the outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy in transplant patients

Chloé Medrano M.D^{1,2}, François Vergez D.V.M, PhD^{2,3}, Catherine Mengelle MD, PhD^{4,5}, Stanislas Faguer M.D, PhD^{1,2}, Nassim Kamar M.D, PhD^{1,2,5}, Arnaud Del Bello M.D^{1,2,5}

¹ Department of Nephrology and Organ Transplantation, CHU Rangueil, Toulouse, France

² Université Paul Sabatier, Toulouse, France

³ Cancer Research Center of Toulouse and Laboratoire d'Hématologie, Hôpital de Toulouse, France

⁴ Laboratoire de Virologie, Institut Fédératif de Biologie, Hopital de Toulouse, France

⁵INSERM U1043, IFR–BMT, CHU Purpan, Toulouse, France

Corresponding Author:

Dr Del Bello Arnaud

Tel +33561323923

Mail delbello.a@chu-toulouse.fr

ORCID numbers: Francois Vergez 0000-0002-3170-1905, Stanislas Faguer 0000-0003-0553-0927, Nassim Kamar 0000-0003-1930-8964, Arnaud Del Bello 0000-0003-3115-868X

Abstract word count: 48

Manuscript word count: 564

Table: 1

Additional Figures 4

Article summary line: Immune checkpoint inhibitors failed to improve PML outcome in 3 kidney transplant recipients.

Running title: Immune checkpoint inhibitors for PML after KT

Keywords: PML, Immune checkpoint inhibitors, Nivolumab, T-cell exhaustion, kidney transplantation.

Abstract

It was suggested that anti-PD1 antibodies could be an effective treatment for progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). We have treated three kidney-transplant recipients presenting a PML with nivolumab. All patients died within the first 8 weeks after diagnosis. Hence, after transplantation nivolumab did not improve the outcome of PML.

The role of T-cell exhaustion in the development of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) prompted clinicians to use immune checkpoint inhibitor molecules to treat JC virus-infected patients. Recently, Cortese et al (1) treated 8 patients presenting PML (6 with a history of blood disorders and 2 HIV infected patients) with anti-PD1 antibodies. An improvement or a stabilization of symptoms was observed in 5 patients, while no benefit was noticed in the remaining patients.

Since 2017, we have treated three kidney-transplant recipients with a definite PML according to the AAN consensus that was diagnosed 5 (2-17) years after transplantation. Clinical and radiological findings are presented in the supplementary figures (1 to 3). They were receiving mycophenolic acid and steroids with either belatacept (n=1) or tacrolimus (n=2). At PML diagnosis, immunosuppressants were immediately withdrawn, and anti-PD1 antibodies (nivolumab, Opdivo®, Bristol Myers Squibb, New York, NY) were given at 3 mg/kg every 15 days (2 injections in 2 patients and three for the last one) (Table 1). Three apheresis sessions were also performed before nivolumab initiation for one patient in order to remove the belatacept. All patients died within the first 8 weeks after diagnosis because of rapid progression in neurological symptoms. No signs of immune reconstitution inflammatory syndrome were observed on magnetic resonance imaging that were performed before each injection and few days before death. Conversely, MRIs have shown a progression of PML features. As expected, the percentage of T-cells expressing PD1 that was assessed in 2 patients dramatically decreased after nivolumab (Figure S4). Conversely, others inhibitory receptors tested (2b4, and CD160) remained stable or increased. In addition, functional analysis showed a reduction of cytokine production by CD4+ and CD8+ T-cells, as well as an improvement of cytotoxic ability, a phenotype compatible with more terminally differentiate exhausted cells, less likely to respond to anti-PD1 immune checkpoint inhibitor (2).

It was previously suggested that PML could occur at any time post-transplantation (3), even several years after engraftment. This was the case in our three patients.

Conversely to the results reported, by Cortese and colleagues (1), our kidney-transplant patients treated by nivolumab had a very bad outcome that is in line with the one usually reported after solid-organ-transplant patients, i.e. a median survival time lower than 6 months (3). The difference between treated-patients by Cortese et al. and ours is probably due to the use of immunosuppressive agents (calcineurin inhibitors or co-stimulation blockers) that can lead to persistent T-cell dysfunction, despite withdrawal of these treatments, resulting in refractory T-cell dysfunction after anti-PD1 blockers use, as previously reported in *ex-vivo* experiments (4). This hypothesis is supported by the absence of kidney rejection in 2 out of the 3 patients. Interestingly, all five cases reported by Cortese et al. (1) in whom anti-PD1 blockers were efficient, were not receiving immunosuppressive therapy at PML diagnosis. Moreover, our three patients had a profound lymphopenia at diagnosis that was not improved with nivolumab in two of them (Table 1). Although, there is no established relationship between the severity of lymphopenia and the response to anti-PD1, one can note that the three patients with unfavorable outcome from the study by Cortese et al. (1) had also a severe lymphopenia. This suggests that immunotherapies can be ineffective in case of severe lymphopenia.

Hence, in kidney-transplant patients, the use of nivolumab, associated to immunosuppressive therapy withdrawal did not restore efficient immune response and did not improve the outcome of PML. The use of *ex-vivo* expanded, BK virus– specific T-cells (5), should be tested in this setting.

References

1. Cortese I, Muranski P, Enose-Akahata Y, [Ha SK](#), [Smith B](#), [Monaco M](#), et al. Pembrolizumab Treatment for Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 2019 Apr 25; 380 (17): 1597–605.
2. Blackburn SD, Shin H, Freeman GJ, Wherry EJ. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 Sep 30; 105 (39): 15016-21.
3. Mateen FJ, Muralidharan R, Carone M, [Van De Beek D](#), [Harrison DM](#), [Aksamit AJ](#), et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in transplant recipients. *Ann Neurol* 2011 Aug; 70 (2): 305–22.
4. Dekeyser M, De Goër de Herve MG, Hendel-Chavez H, [Labeyrie C](#), [Adams D](#), [Nasser GA](#), et al. Refractory T-Cell Anergy and Rapidly Fatal Progressive Multifocal Leukoencephalopathy After Prolonged CTLA4 Therapy. *Open Forum Infect Dis* 2017 May 16; 4 (2): oxf100.
5. Muftuoglu M, Olson A, Marin D, Ahmed S, Mulanovich V, Tummala S et al. Allogeneic BK Virus–Specific T Cells for Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 2018 Oct 11; 379 (15): 1443–51.

Figures legends:

Figure S1 Clinical course of patient 1

A 81 years-old man had undergone a kidney transplantation in 2012 because of end-stage renal disease related to nephroangiosclerosis. He was given induction therapy by basiliximab followed by a triple immunosuppressive regimen including tacrolimus, mycophenolate mofetil, and prednisone. No acute rejection occurred after transplantation. Five years after kidney transplantation, the patient presented with behavioral disorders and confusion, without fever. At admission, brain-MRI showed several bilateral hyperintense lesions, involving left frontal and right parietal lobe. At day 11, because of worsening of neurological symptoms (patient unable to sit, psychomotor retardation and somnolence), nivolumab was initiated, and repeated two weeks later. One month after the first symptoms, MRI sequences showed several bilateral confluent hyperintense lesions, extended to both frontal lobes, and right parietal lobe without evidence of an inflammatory reaction with edema, mass effect, or gadolinium enhancement suggesting the occurrence of immune reconstitution inflammatory syndrom. The patient became bed bound, fell into coma and died roughly one month and a half after admission.

Figure S2: Clinical course of patient 2

A 77-year-old Caucasian man had undergone a kidney transplantation in 2015 because of nephroangiosclerosis and diabetic nephropathy. No induction therapy was given. Maintenance immunosuppression included tacrolimus, MMF, and prednisolone. One year after transplantation, the patient was converted from tacrolimus to belatacept because of biopsy-proven calcineurin inhibitors nephrotoxicity. At conversion, serum creatinine level was at 33 mg/L.

Two years after transplantation (one year after belatacept initiation), the patient presented with profound weakness. At admission, brain FLAIR-MRI sequences revealed bilateral hyperintense lesions in both frontal lobes. Belatacept and MMF were stopped immediately after the diagnosis. In addition, the patient had undergone three sessions of double filtration plasmapheresis (DFPP) in order to eliminate rapidly belatacept. Immediately after the 3 sessions of DFPP, nivolumab was started (3mg/kg each 15 days). Gamma-interferon (Intravenous perfusion of Imukin, 100 µg) was added to the second and third injection of nivolumab because of neurologic symptoms deterioration (somnia, bed-ridden). The second and third MRI showed extension of lesions, without signs of IRIS. The patient died one month and half after admission. `

Figure S3: Clinical course of patient 3

A 67-years-old woman had undergone a kidney transplantation in 2007 due to interstitial nephropathy. She was given induction therapy by basiliximab, followed by a triple immunosuppressive therapy including belatacept, MMF, and prednisone. Eleven years after transplantation, belatacept was replaced by tacrolimus, for patient personal suitability. The posttransplantation period was uneventful and no acute rejection occurred. Two months after the switch, the patient was admitted for left hemiparesis worsening for the past month. At admission, brain MRI showed PML-compatible bilateral lesions, with hyperintense lesions in corpus callusum in FLAIR sequences. The diagnosis of PML was confirmed by the detection of JCV DNA in CSF (2.93 log-copies/mL). Tacrolimus and MMF were stopped immediately after the diagnosis. Prednisolone was maintained, and mirtazapine was added (15mg/d). Nivolumab (3mg/kg) was started immediately. Because of rapid neurological symptoms impairment one week after the first injection (bed-ridden, somnolence), the patient was given a

second injection of nivolumab (3 mg/kg). A brain MRI performed one week after the second injection of nivolumab, confirmed the PML progression without argument for IRIS. The patient presented went into coma and died four weeks after admission.

Figure S4 Expression of surface T cells inhibitory molecules in Patient 2 and 3 at diagnosis and after nivolumab injection

Phenotypic analysis of T-cells inhibitory molecules (PD-1, 2b4, CD160) expression in CD4+ (A) and CD8+ (B) cells before and after nivolumab injection in patient 2.

Phenotypic analysis of T-cells inhibitory molecules (PD-1/2b4/CD160) in CD4+ (C) and CD8+ (D) cells before and after nivolumab injection in patient 3.

In vitro CD4+ T cells production of TNF α , IL-2, IFN γ , Granzyme B (GZB) and IL-17, after unspecific stimulation with PMA/ionomycin, before and after nivolumab injection in patient 3 (E). In vitro CD8+ T cells production of TNF α , IL-2, IFN γ , Granzyme B (GZB) and IL-17, after unspecific stimulation with PMA/ionomycin, before and after nivolumab injection in patient 3 (F).

Authors contributions:

Chloé Medrano, Stanislas Faguer, Nassim Kamar and Arnaud Del Bello wrote the paper, and followed the patients

Francois Vergez performed the cytometric tests

Disclosure: Nothing to disclose according to Emerging Infectious Disease policy

Figure S1

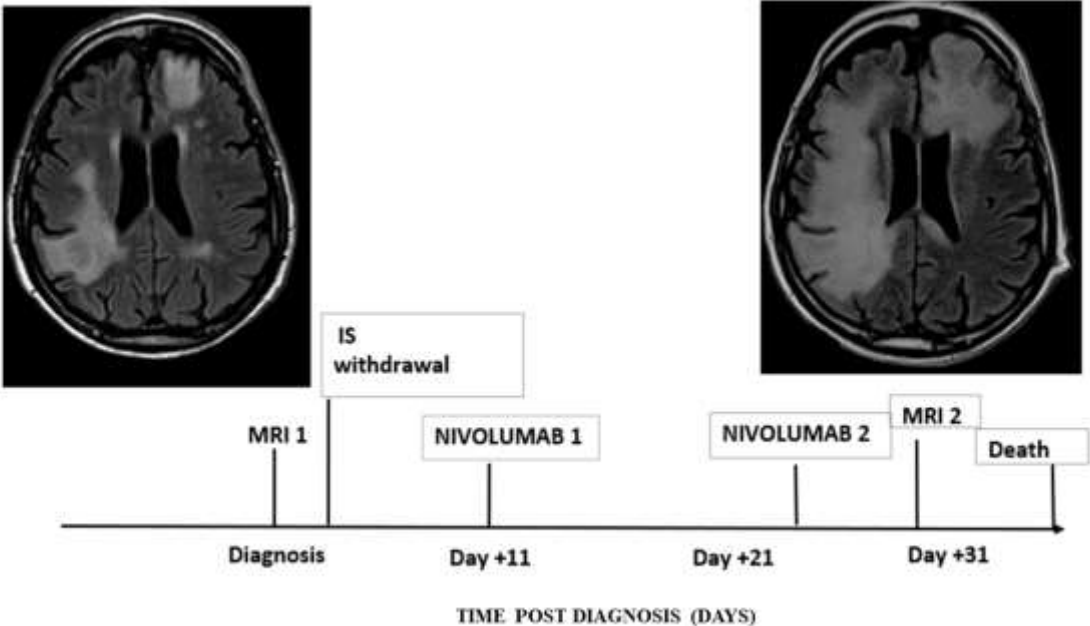


Figure S2

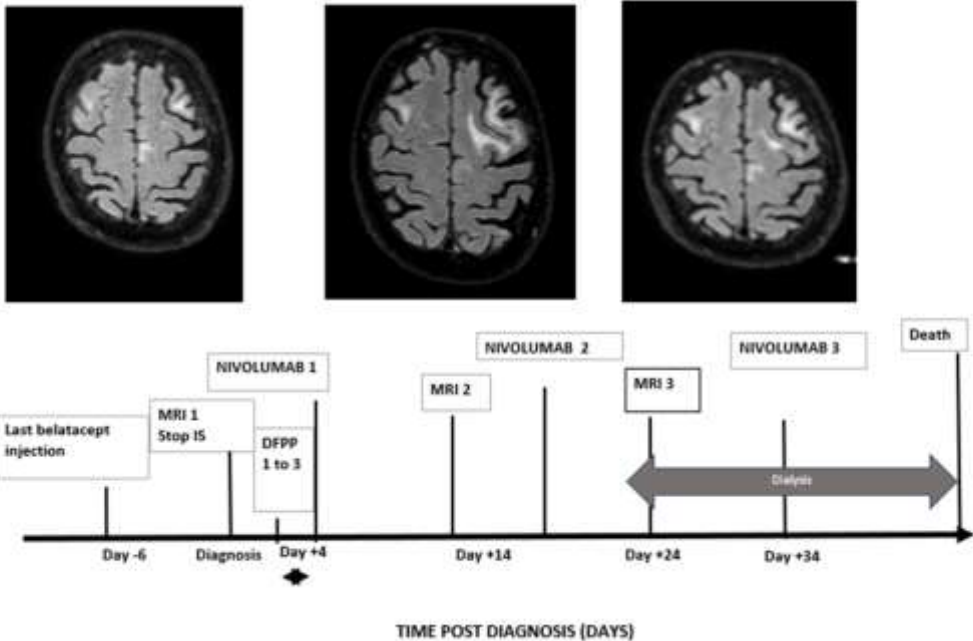


Figure S3

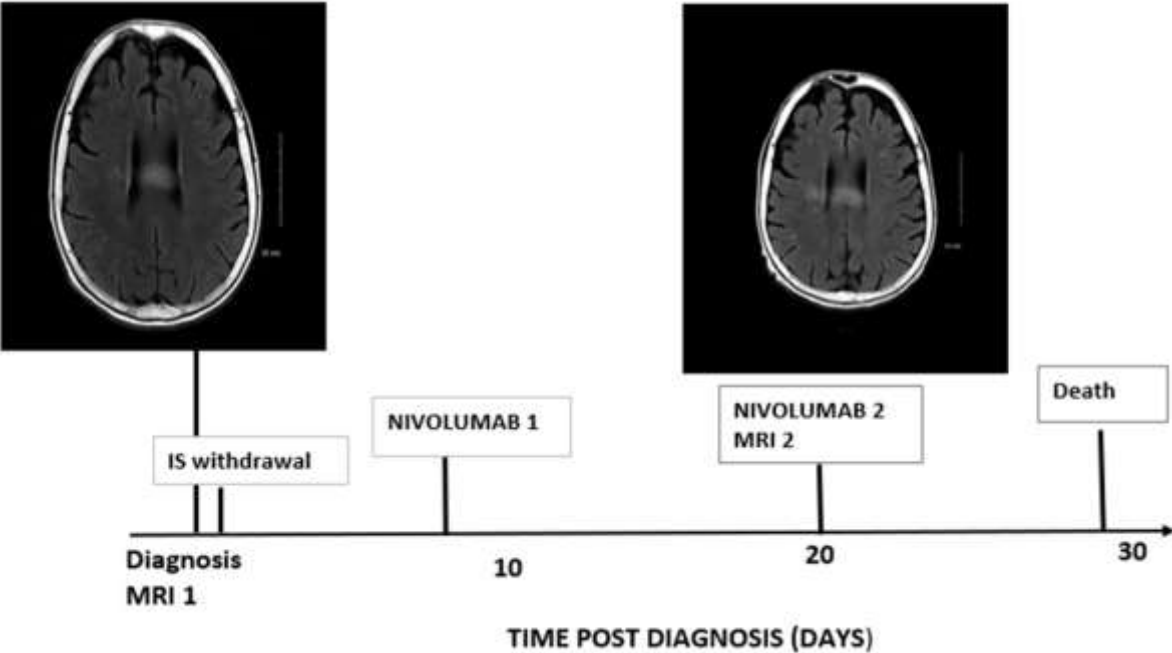


Figure S4

Figure S4A

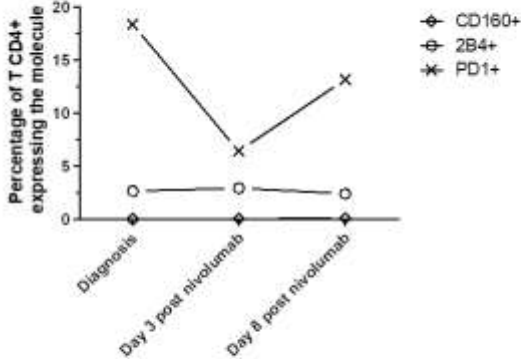


Figure S4B

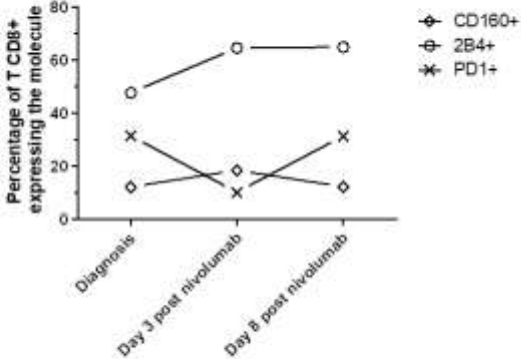


Figure S4C

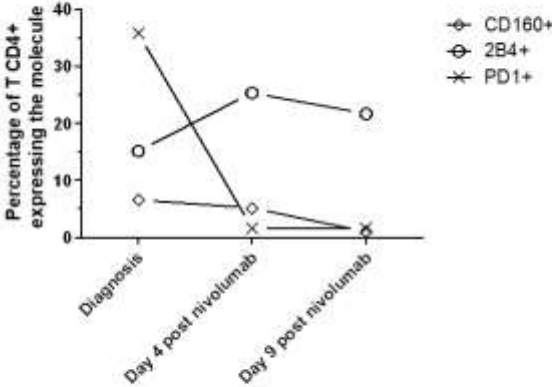


Figure S4D

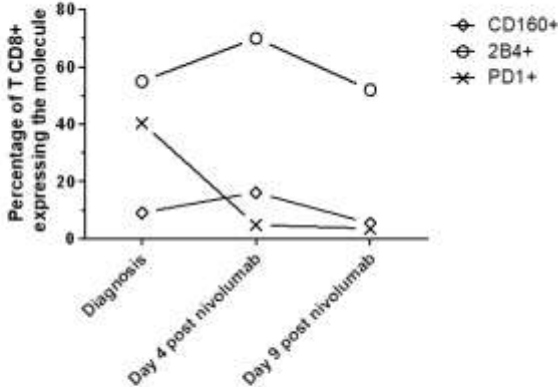


Figure S4E

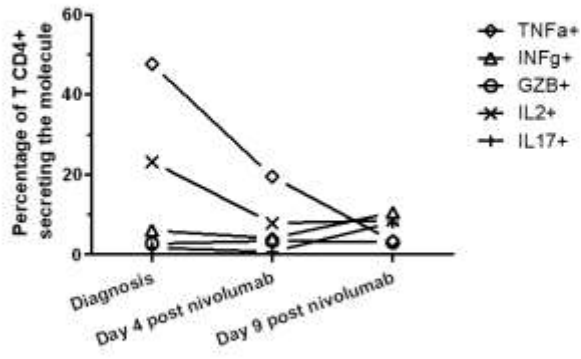
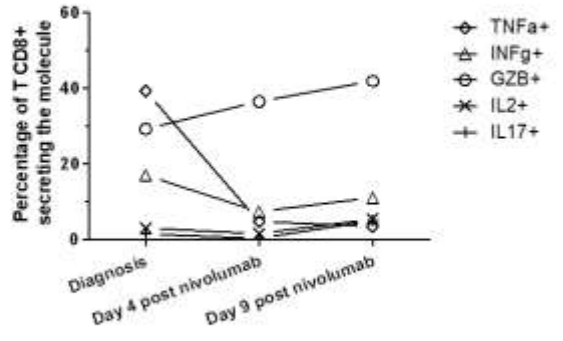


Figure S4F



4. Analyse du profil lymphocytaire adaptatif au cours des formes légères et sévères des infections à COVID-19 chez des patients transplantés d'organe solide.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Kidney International*

Les patients transplantés d'organe solide sont à haut risque de développer une forme sévère des infections à Sars-CoV-2, les conduisant dans près d'un tiers des cas après infection en réanimation. Alors que le profil de réponse immune innée et acquise a été bien étudié, peu de données étaient disponibles concernant la réponse immune sous traitement immunosuppresseur au long cours.

Dans cette étude rétrospective, nous avons exploré par cytométrie de flux les modifications du compartiment T, B et NK à l'entrée en hospitalisation, puis régulièrement au cours de l'évolution de l'infection à COVID chez des patients transplantés (principalement du rein).

Nous avons pu mettre en évidence des profils similaires dans les changements de l'immunité adaptative T, B et NK avec une profonde lymphopénie T (CD3 et CD8+) et NK, un taux de lymphocytes T CD4+ activés et de T régulateurs plus élevés dans les formes sévères.

Nous avons également exploré certains récepteurs inhibiteurs (TIGIT, PD-1 et CD39) et observé dans les formes sévères une corrélation positive en l'expression de TIGIT par les CD4+ et CD8+ et le taux de lymphocytes T régulateurs. Cette corrélation était également retrouvée

pour le CD39+ dans les CD4+ et PD-1 dans les CD8+. Nous avons aussi retrouvé une corrélation négative entre l'expression de TIGIT et les fréquences de LT CD4+ produisant perforine / granzyme B.

Adaptive lymphocyte profile analysis discriminates mild and severe forms of COVID-19 after solid organ transplantation

Arnaud Del Bello MD ^{1,2,3}, Nassim Kamar MD, PhD ^{1,2,3}, Francois Vergez VetD, PhD ^{3,4,5}, Stanislas Faguer MD, PhD ^{1,3,6}, Olivier Marion MD, PhD ^{1,2,3}, Audrey Beq CRA¹, Yasmine Lathrache PharmD⁷, Florence Abravanel MD, PhD^{2,3,8}, Jacques Izopet MD, PhD^{2,3,8}, and Emmanuel Treiner PharmD, PhD ^{2,3,7}

1 Département de Néphrologie, Dialyse et Transplantation d'Organes, Centre Hospitalier et Universitaire de Toulouse, F-31000 Toulouse, France

2 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale- Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan, Inserm UMR 1043- CNRS 5282, F-31000 Toulouse, France

3 Université Paul Sabatier Toulouse III, Toulouse, France

4 Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse Oncopole, 31059 Toulouse, France

5 Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, UMR 1037- INSERM, ERL5294 CNRS, F-31100 Toulouse, France

6 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaire, Inserm UMR 1297, F-31000 Toulouse, France

7 Laboratory of Immunology, Biology Department, CHU Toulouse, Toulouse, France

8 Laboratory of Virology, Biology Department, CHU Toulouse, Toulouse, France

Corresponding Author

Arnaud Del Bello, MD

Nephrology and Organ Transplant Department, CHU de Toulouse, 1 av. Jean Poulhès 31059 Toulouse Cedex 9

Tel.: +33561323923

Fax: +33561322864

Email: delbello.a@chu-toulouse.fr

[Running title : lymphocyte profile after transplant during COVID-19](#)

Authorship:

ADB, ET, NK, SF and OM designed the study

ADB and AB collected the data

ADB, YL, FA, JI, FV and ET analyzed the data and wrote the paper

NK, SF, OM, and ADB followed the patients

NK, SF and OM reviewed the paper

Disclosure:

The authors declare no conflicts of interest

Funding:

None

Acknowledgments

ET wishes to thank the technical staff of the laboratory of Immunology for help with cytometry analysis

ADB wishes to thanks the nurses from the Department of Nephrology and Organ Transplantation

Abbreviations

SOT, Solid Organ Transplantation; COVID-19, Coronavirus Disease; mTOR, mammalian Target of Rapamycin; NK, Natural Killer cells; Tregs, regulatory T cells.

Abstract

Solid Organ Transplant recipients are at high risk for the development of severe forms of COVID-19. However, the role of immunosuppression in the morbidity and mortality of immune phenotype during COVID-19 in transplant recipients remains unknown. In this retrospective study, we compared peripheral blood T and B cell functional and surface markers, as well as serum antibody development during mild (n=29) and severe (n=22) forms of COVID-19 in solid organ transplant recipients hospitalized in our center.

Patients who developed severe forms of COVID-19 presented lower CD3+ ($344/\text{mm}^3$ (197; 564) vs. $643/\text{mm}^3$ (397; 1251), $p= 0.04$), and CD8+ T cell counts ($124/\text{mm}^3$ (76; 229) vs. $240/\text{mm}^3$ (119; 435), $p= 0.05$). However, activated CD4+ T cells were more frequent in severe forms (2.9% (1.37; 5.72) vs. 1.4% (0.68; 2.35), $p= 0.005$), counterbalanced by a higher proportion of Tregs (3.9% (2.35; 5.87) vs 2.7% (1.9; 3.45), $p= 0.02$). A marked decrease in the proportion of NK cells was noted only in severe forms. In the B cell compartment, transitional B cells were significantly lower in severe forms (1.2% (0.7; 4.2) vs. 3.6% (2.1; 6.2), $p= 0.03$). Nonetheless, a majority of transplant recipients developed antibodies against SARS-CoV-2 (77% and 83% in mild and severe forms respectively).

Our data revealed accurate immunological differences between mild and severe forms of COVID 19 in solid organ transplant recipients, similarly to previous reports in immunocompetent population.

Keywords

Organ Transplantation, COVID-19, Lymphopenia, Exhaustion, regulatory T cells, NK-cells

Introduction

Solid Organ Transplant (SOT) recipients are a high-risk population for the development of severe forms of COVID-19, with an in-hospital mortality rate reported ranging from 20% to 30%^{1,2}. Although comorbidities associated with severe SARS-CoV-2 infection^{2,3} such as cardiovascular diseases, obesity, hypertension, and diabetes are frequent in this population, factors that influence a substantial proportion of severe disease are not well understood. For instance, it is unknown whether the immune response changes that are observed in the general population are also present during COVID-19 in SOT patients².

A significant immune dysregulation correlated with COVID-19 severity, with an increase in the level of pro-inflammatory cytokines⁴ and impaired interferon type-I response to elevated interleukin-6⁵, dysregulation of innate immune cells (HLA class II downregulation on monocytes⁶ or dysregulation of the mTOR pathway in dendritic cells⁷), and acquired immune cell changes (lymphopenia⁸ and T cell exhaustion⁹). Song et al¹⁰ reported a sharp difference between mild and severe cases of COVID-19 in 41 immunocompetent patients, with a major CD3+, CD4+ and CD8+ and NK cell lymphopenia, excessive T-cell activation, a higher expression of T-cell inhibitory molecules, and a higher expression of cytotoxic molecules in CD8+ T cells in severe cases compared to mild cases. Zheng et al⁹ reported an overexpression of the inhibitory molecule NKG2A in CD8+T cells and NK cells in patients with severe forms, suggesting a state of functional exhaustion in cytotoxic lymphocytes in severe forms of COVID-19, in 55 immunocompetent patients with COVID-19.

Standard immunosuppression after solid organ transplantation may have variable consequences on lymphocyte homeostasis and functions. Therefore, we retrospectively

examined the impact of SARS-Cov2 infection on innate and adaptive lymphocytes in immunocompromised SOT recipients with moderate or severe COVID-19.

Patients and Method

Patients

This retrospective study was conducted in the Department of Nephrology of Toulouse (registration number RnIPH 2021 sou-16 s, Supporting information 1).

From March to November 2020, 69 SOT recipients who were hospitalized in our department for a COVID infection proven by the detection of SARS-CoV-2 by PCR in nasopharyngeal swab. Fifty-one of them were included in this retrospective cohort. The eighteen remaining patients, that presented a mild form, were excluded from the analysis because of lack of immunological data.

COVID-19 severity was assessed at admission and then each day, in accordance with the World Health Organization (WHO) 9-point Ordinal Scale (WOS) for clinical improvement consisting of the following categories: 0) Uninfected - no evidence of infection; 1) Ambulatory - no limitation of activities; 2) Ambulatory - limitation of activities; 3) Hospitalized, mild - no oxygen therapy; 4) Hospitalized, mild - oxygen by mask or nasal cannula; 5) Hospitalized, severe - non-invasive ventilation or high flow oxygen; 6) Hospitalized, severe - intubation and mechanical ventilation; 7) Hospitalized, severe - ventilation + additional organ support; 8) Death. Patients were then divided into two categories, according to the worst score obtained during the follow-up: Mild (WOS 3, 4) and Severe (WOS 5, 6, 7, 8).

Immunological analysis

The first immunological analysis was performed during the first five days post admission to our department. Serial analyses were then performed, if possible, during hospitalization, each week until the discharge.

All staining was performed on fresh (<24h) whole blood samples drawn by venipuncture in EDTA coated tubes. Membrane immunostaining was performed as follows: 100µl of blood was incubated with the appropriate amount of antibodies for 15 mins at room temperature, followed by red cell lysis with either FACS Lyse buffer (BD Biosciences) or Versalyse (Beckman Coulter). After washing with Cellwash™ (BD Biosciences), the cell pellet was re-suspended in the same buffer before rapid analysis by flow cytometry. Intracellular staining was performed as follows: 100µl of blood was fixed and permeabilized with the Perfix-nc kit (Beckman Coulter), according to the manufacturer's instructions. Fixed/permeabilized blood was then incubated with the appropriate amount of mAbs for 1h, washed and processed for flow cytometry analysis. Lymphocyte subsets were enumerated by addition in the appropriate stained samples of 100µl of Flow-Count fluorospheres (Beckman Coulter), as per the manufacturer's instructions.

Data was acquired using a Navios flow cytometer (Beckman Coulter), and data analysis was carried out with the Kaluza analysis software (Beckman Coulter). The gating strategy is presented in the Supporting Information 2.

Virological analysis

Positivity for SARS-CoV-2 was diagnosed through nasopharyngeal swab samples using a home-brew real-time PCR (RT-PCR) or a TMA assay on the Panther instrument (Hologic®).

The total antibody against SARS-CoV-2 in serum samples were tested using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit supplied by Beijing (Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co., Ltd., China), according to the manufacturer's instructions. Briefly, the ELISA for total antibodies detection (IgG/IgM/IgA) was developed based on double-antigens sandwich immunoassay, using mammalian cell expressed recombinant antigens contained the receptor binding domain (RBD) of the spike protein of SARS-CoV-2 as the immobilized and HRP conjugated antigen. Samples were considered as positive if the S/Co was > 1.

Statistical analyses

Results were expressed as median with interquartile ranges, unless stated otherwise. Continuous variables between groups were compared by unpaired T test and categorical variables by two-sided chi-square or two-sided Fisher's exact test, when necessary. Unpaired parametric or non-parametric tests were chosen according to the Gaussian-based data analysis. Spearman coefficient was used for correlation analyses and Pearson coefficient was established for linear regression analyses. All statistical analyses were performed with GraphpadPrism® 8.4.2 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A p value <0.05 was considered statistically significant.

Results

1. Patient's characteristics

Fifty-one Solid Organ Transplant (SOT) patients were included in the analysis (29 (57%) mild forms and 22 (43%) severe forms) (Table 1). A large majority of patients were kidney transplant recipients (21/29 (72%) and 19/22 (86%) in mild and severe forms respectively ($p=0.31$)). Three kidney transplant patients with a mild form, and one kidney recipient with a severe form received a re-transplantation. A large majority of patients received a triple, tacrolimus-based therapy. Immunosuppression management was protocolized for all patients as follows: mycophenolic Acid (MPA), mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors and costimulation signal blockers were immediately stopped at diagnosis of COVID19, whereas tacrolimus was maintained (or introduced) with a trough target of 3-5 ng/ml. It was the first year post transplantation for twelve patients (41%) with a mild form and eight (36%) with a severe form (4/12 and 2/8 respectively received anti-T lymphocyte globulin ($p>0.99$), 0/12 and 1/8 received a course of anti-CD20 monoclonal antibodies ($p=0.40$)); among them 8 mild cases and 7 severe cases were in the first 3 months post transplantation (3/8 and 2/7 respectively received anti-T lymphocyte globulin ($p=0.99$), 0/8 and 1/7 respectively received anti-CD20 monoclonal antibodies ($p=0.47$)). At admission, eGFR was lower in patients who later developed a severe form compared to mild forms. Among the 22 SOT recipients with severe COVID-19, 17 (77%) required mechanical ventilation. One patient in each group had a thromboembolism. Four patients with a severe form died from COVID-19 (18.2%), compared to none among the mild forms ($p=0.03$).

2. Mild vs Severe forms of COVID 19 in solid organ transplant recipients

We first compared patients affected by mild versus severe COVID-19 using data collected at the closest time before the worst clinical situation (Table 1). The time between the first symptom of COVID-19 and sample analysis was comparable in both groups (3 days (1; 5) and 6 days (0; 16) days respectively in mild and severe forms, $p= 0.16$). The lymphocyte count was lower in patients presenting a severe form ($526/\text{mm}^3$ (278; 782) in severe forms, vs. $815/\text{mm}^3$ (560; 1506) in mild forms, $p= 0.04$), (figure 1A). The NK cell count was comparable in both groups ($100/\text{mm}^3$ (63; 135) in severe forms vs. $49/\text{mm}^3$ (23; 156) in mild forms, $p= 0.16$). CD3+ T cells were lower in severe forms ($344/\text{mm}^3$ (197; 564) vs. $643/\text{mm}^3$ (397; 1251), $p= 0.04$), as well as the number of CD8+ T cells ($124/\text{mm}^3$ (76; 229) vs. $240/\text{mm}^3$ (119; 435), $p= 0.05$). Naive and memory T cell subsets (both in the CD4+ and the CD8+ compartments) were similar between both groups (Figure 1B). However, the proportion of Tregs (3.9% (2.35; 5.87) vs 2.7% (1.9; 3.45), $p= 0.02$), and CD4+ DR+/CD38+ T cells (2.9% (1.37; 5.72) vs. 1.4% (0.68; 2.35), $p= 0.005$) was higher in severe forms compared to mild forms. We also analyzed markers associated with exhaustion (PD-1, TIGIT, CD39), effector differentiation (CD57), and cytotoxic functions (perforin, granzyme B). We did not find any statistical difference for these markers between mild and severe COVID-19. Nonetheless, in severe forms a positive correlation was found between Tregs frequencies and the percentage of CD4 and CD8 T cells expressing TIGIT, CD39+ (for CD4+) and PD-1 (for CD8+). Further a negative correlation was observed between CD4+TIGIT+ and CD4+ perforin/granzyme B + frequencies (Figure 1C). The

proportion of unconventional $\gamma\delta$ T cells was comparable in both groups (2.5% T cells (1.25; 7.00) in mild forms, vs. 3.5% (2.35; 5.70) in severe forms), $p= 0.31$). Similar results were obtained when kidney transplant patients alone were analyzed (Supporting information 3). Therefore, severe forms presented a more important lymphopenia, with an intense activation of adaptive immunity, associated with suggestive signs of exhaustion.

B cell numbers did not differ between the two groups (Figure 1A); However, the proportion of CD24^{high}CD38^{high} transitional B cells was lower in severe forms than in mild forms (1.2% (0.7; 4.2) vs. 3.6% (2.1; 6.2), $p= 0.03$) (Figure 1D). We also observed in severe forms a positive correlation between the proportion of memory CD27+ B cells and the proportion of CD4+ EM cells (Figure 1E), suggestive of a co-regulation of these two subsets. Similar results were obtained when kidney transplant patients alone were analyzed (Supporting information 3). The results remained unchanged when we had excluded two patients from the mild form group and one patient from the severe form group in whom samples were obtained after the administration of dexamethasone (n=2) or tocilizumab (n=1) (data not shown).

3. The kinetics of expression of the different T cell compartments during COVID-19

Serial blood tests were carried out for seventeen patients (9 mild and 8 severe forms, supporting information 4). During hospitalization, a negative correlation was observed in the number of NK cells and the duration of severe forms (Spearman $r= -0.36$, $p= 0.05$), whereas a weak positive correlation was observed in mild forms (Spearman $r=0.27$, $p= 0.02$), (Figure 2A). Similar results were obtained when kidney transplant patients alone were analyzed (Supporting information 3).

We then compared the differential expression of T and B cell markers in patients who had had a mild form whether or not it developed into a severe form during hospitalization (Figure 2B). A decrease in the proportion of NK cells was observed only in severe forms during the first week (20.0% (10.7; 33.0) on the first analysis vs 7.2% (4.4; 13.8) during the first week, $p= 0.08$). An increase in CD3+ T cells was observed in both groups, but later in the severe forms. However, CD4+ T cell distribution was stable in both groups. Tregs and the different CD4+ memory subsets presented a similar evolution in both groups (Supporting information 5). Nonetheless, the proportion of activated CD4+, as well as CD4+ T cells expressing perforin and granzyme B, PD1+ CD4+ and CD39+ CD4+ exhaustion markers tended to be at a higher level in severe forms compared to mild forms. CD8+ T cell counts tended to be lower over time in severe forms compared to mild forms. The change in B cell compartment was similar in both groups, except for CD21^{low} memory B cells, which were more elevated in severe forms at admission ($p= 0.03$), and remained at a higher level when the disease worsened.

4. SARS-CoV-2 antibody detection

Among the 44 (26 mild, 18 severe) patients screened for anti-SARS-CoV-2 antibodies (time of screening 28 (18.5; 58) and 21 (15; 46) days post diagnosis ($p=0.46$)): 20 /26 (76.9%) with a mild form and 15/18 (83.3%) with a severe form developed a positive serology ($p= 0.72$). Fourteen of the fifteen patients that presented a COVID-19 during the first three months post transplantation seroconverted. Among them, four patients had receive a T cell depleting agent and one patient had receive both T and B cell depleting agents for ABO incompatible kidney transplantation. The latter was the sole patient who did not seroconvert. Among the 20 patients that presented a COVID-19 during the first-year post transplantation, three of

them did not seroconvert. The use of a depleting agent was not associated with no seroconversion (4/6 patients that had receive a T and or B cell depleting agent have seroconvert, vs. 13/14 patients without depleting agents, $p= 0.20$).

Patients with a negative serology presented higher level of CD4+PD1+ ($p= 0.06$) or CD8+PD1+ ($p=0.04$) comparing with patients that seroconverted (Supporting information 6).

Discussion

During 2020, the pandemic caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 had a marked impact on solid organ transplant recipients. While SARS-CoV-2 infection is frequently asymptomatic in the general population, severe forms seem to be higher by 13 to 50% in solid organ transplant recipients¹¹. The course of infection in the general population is now well documented. A comprehensive understanding of immune responses in COVID-19 transplant recipients is fundamental to defining the best management for these patients.

The first step in immune response is driven by the secretion of pro-inflammatory cytokines by innate immune cells to inhibit viral replication, recruit other immune cells to the infection site and stimulate adaptive immune response¹². A dysregulated innate immune response, mainly with a type I interferon response driven by genetic susceptibilities such as inborn errors of Toll-like receptor-3, IRF-7 dependent type I interferon, or neutralizing antibodies to interferon, was previously associated with severe forms of COVID 19^{5,13-15}. Moreover, T and B cell responses are implicated in preventing SARS-CoV-2 viral clearance, and are detectable as early as the first week after the onset of COVID-19 symptoms¹⁶. As previously demonstrated in the immunocompetent population^{1,4,5,17}, we found that severe forms of COVID-19 in SOT recipients were associated with lower CD3+ T cells. There are several hypotheses to explain this phenomenon, including a direct cytopathic effect on infected immune cells, pulmonary recruitment of lymphocytes from blood, or T cell apoptosis during infection^{18,19}. Memory CD8+ T cells can recognize the MHC-class I molecules of cells infected by viruses, leading to their elimination and subsequent clearance of many viruses including SARS-CoV-2²⁰. Lymphopenia could be directly associated with a higher level of viral load or

delayed viral clearance, leading to a cytokine storm and destructive tissue inflammation¹⁸. Lymphopenia is frequent in SOT recipients, and could at least partially explain the high proportion of severe forms of COVID-19 in this population. A recent study²¹ suggested a delayed SARS-CoV-2 specific T cell response in kidney transplant recipient, which may also participate in the development of severe forms in this population. In addition, we found a higher level of regulatory T cells in severe forms compared to mild forms. Interestingly, we observed in severe forms only a correlation between the percentage of Tregs and the expression of exhaustion-related markers TIGIT, CD39 in CD4+ T cells and PD1+ and CD39+ in CD8+ T cells. Conflicting results were observed concerning the frequency of Tregs and outcomes in general population²²⁻²⁴. Exhaustion was suspected to be a mechanism to maintain immune cell homeostasis²⁵, and to participate in the progression of the disease severity^{20,26}. The correlation between the percentage of Tregs and the expression of exhaustion markers in severe forms of COVID-19 in our patients might be seen as a reflection of the intense and prolonged activation of the immune system. However, further studies are required to better understand the role of Tregs in acute infections, and relations with CD4+ and CD8+ T inhibitory receptors expression in immunocompromised recipients.

As previously shown in immunocompetent population^{20,27,28}, our data also suggest, a marked difference in the change in NK cell count during infection in mild and severe cases. The exact reasons for these kinetics could involve lung sequestration during pneumonia and an apoptosis mechanism directly due to SARS-CoV-2²⁹. In any event, the decrease in circulating NK cells during infection could facilitate viral spread²⁹.

We observed changes in the B cell compartment during infection that were similar to those described in non-transplant, immunocompetent patients³⁰. First, we observed a sharp

difference in CD24^{high}CD38^{high} transitional B cells between mild and severe patients. A higher percentage of transitional B cells during mild COVID 19 infection compared to severe cases was previously reported in the general population³⁰. Infectious diseases could promote the expansion of transitional B cells which play a direct protective role by differentiation into antibody secreting cells³¹. We also observed in severe forms a positive correlation between the proportion of memory B cells and CD4+ EM T cells, suggesting a strong activation of T and B cells during COVID-19. Nonetheless, although most patients seroconverted during the course of the infection, a significant proportion did not (23% and 17% of moderate and severe COVID-19, respectively). These numbers are higher than those described in the general population. Two out of nine seronegative patients had been treated with anti-T lymphocyte globulin and/or anti-CD20 therapies and displayed no detectable circulating B cells. Recently Burack and colleagues³² reported similar results in a cohort of 70 solid organ transplant recipients, in which only 51% of patients developed antibodies after COVID-19. Interestingly, time post transplantation (OR=1.26, $p= 0.002$) and the use of more than 2 immunosuppressive agents (OR=0.26, $p= 0.03$) were significantly associated with the seroconversion³².

Based on these different observations, one could hypothesize that delayed and weak specific T cell and neutralizing humoral response to SARS-Cov-2 caused by immunosuppression lead to virus immune neutralization escape³³, prevent rapid clearance of the virus leading to severe disease forms. Early reports investigating the response to vaccines tend to demonstrated also a weak and delayed response to vaccination in solid organ transplant recipients^{34,35}.

The expression of different T and B cell markers differed between patients that presented mild forms and those initially mild who developed severe forms. Patients who

developed severe forms presented since the diagnosis a lower CD3+, CD8+ T cell, a higher expression of PD1 or CD39 in CD4+ T cells, comparing with mild forms that did not developed severe forms. Further studies including a larger number of patients are needed to identify the optimal biomarker that predicts disease severity.

Interestingly, as previously demonstrated in general population, we observed a higher proportion of male recipients and lower kidney function in severe forms of COVID-19³⁶. Acute kidney injury occurs frequently among patients with COVID-19 and is associated with poor prognosis³⁷⁻³⁹. Kidney susceptibility to SARS-CoV-2 infection is in part related to the expression of angiotensin-converting enzyme 2 receptor which is used as a port of the viral entry into targeted cells⁴⁰. Case series of naïve kidney biopsies identified acute tubular necrosis as the main histological finding^{41,42}, but some patients with genetical predisposition (i.e apolipoprotein L1 G1 risk allele homozygosity) could develop collapsing focal segmental glomerulosclerosis^{43,44}. Renal dysfunction could participate in dysregulation of inflammation (e.g, CRP and IL-6 levels), nitrogen, carbon (glucose and free fatty acid) metabolism, fueling viral proliferation⁴⁵.

Our study has various limitations. First, anti-rejection treatment used in our patients can have a dramatic impact on lymphocyte numbers and phenotype. Unfortunately, these parameters are not accessible; therefore, the influence that the immune status of our patients had on the course of COVID-19 and the dynamics of immune cells that we studied cannot be inferred. Specifically, due to the relative low number of patients recently transplanted that received a T or B cell depleting agent, we were not able to draw robust conclusions about the role of induction on the outcome. Further studies investigating the impact of depleting agents and the durability of antibodies in patients having received depleting agents is required.

Second, some patients with mild forms were not included in our study due to the absence of immunological samples. However, our large cohort of SOT recipients was well defined, with clear clinical differences between mild and severe patients, comparable to previously published data⁴⁶. Third, since all patients received the same immunosuppressive treatment, with only the maintenance of a low dose of tacrolimus (and mTOR inhibitors, antimetabolites, or second signal inhibitor withdrawal), we were unable to investigate the best strategy to reduce severe forms of COVID-19. However, the uniform immunosuppressive regimen allowed us to exclude biases in the interpretation of immunological analysis. Future large studies concerning the management of immunosuppressive therapies during COVID 19 are required to address this issue, especially concerning the role of the most lymphopenia-inducing treatments, such as T cell depleting agents. Similarly, it should be noted that in our study, treatments against SARS-CoV-2 such as antibiotics, convalescent patient plasma, or immunomodulatory agents (e.g. anti-IL-6 receptor blockers) changed over time. However, since these treatments were proposed only for patients who experienced a worsening clinical status associated with COVID-19 therapies, this did not influence the immunological results.

In summary, our data revealed sharp differences between mild and severe forms of COVID 19 infections that are similar to what is observed in the general population. CD3 and CD8 lymphopenia was highly associated with severe COVID 19 infections in solid organ transplant recipients. Prospective studies to investigate the effect of immunosuppression management are urgently needed.

References

1. Akalin E, Azzi Y, Bartash R, et al. Covid-19 and Kidney Transplantation. *N Engl J Med*. April 2020;NEJMc2011117. doi:10.1056/NEJMc2011117
2. Nair V, Jandovitz N, Hirsch JS, et al. COVID-19 in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2020;20(7):1819-1825. doi:10.1111/ajt.15967
3. Wu C, Chen X, Cai Y, et al. Risk Factors Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients with Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*. 2020;180(7):934-943. doi:10.1001/jamainternmed.2020.0994
4. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5
5. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science (80-)*. 2020;369(6504):718-724. doi:10.1126/science.abc6027
6. Wilk AJ, Rustagi A, Zhao NQ, et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(7):1070-1076. doi:10.1038/s41591-020-0944-y
7. Arunachalam PS, Wimmers F, Mok CKP, et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science (80-)*. 2020;369(6508):1210-1220. doi:10.1126/SCIENCE.ABC6261
8. Cao X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(5):269-270. doi:10.1038/s41577-020-0308-3
9. Zheng M, Gao Y, Wang G, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(5):533-535. doi:10.1038/s41423-020-0402-2
10. Song JW, Zhang C, Fan X, et al. Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. *Nat Commun*. 2020;11(1). doi:10.1038/s41467-020-17240-2
11. Azzi Y, Bartash R, Scalea J, Loarte-Campos P, Akalin E. COVID-19 and Solid Organ Transplantation: A Review Article. *Transplantation*. 2021;105(1):37-55. doi:10.1097/TP.0000000000003523
12. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(6):363-374. doi:10.1038/s41577-020-0311-8
13. Zhang Q, Bastard P, Liu Z, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science (80-)*. 2020;370(6515). doi:10.1126/SCIENCE.ABD4570
14. Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020;370(6515). doi:10.1126/science.abd4585
15. Van Der Made CI, Simons A, Schuurs-Hoeijmakers J, et al. Presence of Genetic Variants among Young Men with Severe COVID-19. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;324(7):663-673. doi:10.1001/jama.2020.13719
16. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020;181(7):1489-1501.e15. doi:10.1016/j.cell.2020.05.015

17. Guan W, Ni Z, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1708-1720. doi:10.1056/nejmoa2002032
18. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2020;75(7):1564-1581. doi:10.1111/all.14364
19. Cizmecioglu A, Cizmecioglu HA, Goktepe MH, et al. Apoptosis-Induced T Cell Lymphopenia Is Related to COVID-19 Severity. *J Med Virol*. December 2020;jmv.26742. doi:10.1002/jmv.26742
20. Zheng HY, Zhang M, Yang CX, et al. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(5):541-543. doi:10.1038/s41423-020-0401-3
21. Favà A, Donadeu L, Sabé N, et al. SARS-CoV-2-specific serological and functional T-cell Immune responses during acute and early COVID-19 convalescence in Solid Organ Transplant patients. *Am J Transplant*. March 2021:ajt.16570. doi:10.1111/ajt.16570
22. Sadeghi A, Tahmasebi S, Mahmood A, et al. Th17 and Treg cells function in SARS-CoV2 patients compared with healthy controls. *J Cell Physiol*. 2021;236(4):2829-2839. doi:10.1002/jcp.30047
23. Galván-Peña S, Leon J, Chowdhary K, et al. Profound Treg perturbations correlate with COVID-19 severity. *bioRxiv*. December 2020. doi:10.1101/2020.12.11.416180
24. Meckiff BJ, Ramírez-Suástegui C, Fajardo V, et al. Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4+ T Cells in COVID-19. *Cell*. 2020;183(5):1340-1353.e16. doi:10.1016/j.cell.2020.10.001
25. Wang W, Su B, Pang L, et al. High-dimensional immune profiling by mass cytometry revealed immunosuppression and dysfunction of immunity in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(6):650-652. doi:10.1038/s41423-020-0447-2
26. Zheng M, Gao Y, Wang G, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(5):533-535. doi:10.1038/s41423-020-0402-2
27. Wen W, Su W, Tang H, et al. Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing. *Cell Discov*. 2020;6(1). doi:10.1038/s41421-020-0168-9
28. Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe*. 2020;27(6):992-1000.e3. doi:10.1016/j.chom.2020.04.009
29. Masselli E, Vaccarezza M, Carubbi C, et al. NK cells: A double edge sword against SARS-CoV-2. *Adv Biol Regul*. 2020;77. doi:10.1016/j.jbior.2020.100737
30. Sosa-Hernández VA, Torres-Ruíz J, Cervantes-Díaz R, et al. B Cell Subsets as Severity-Associated Signatures in COVID-19 Patients. 2020;11:1. doi:10.3389/fimmu.2020.611004
31. Oliviero B, Varchetta S, Mele D, et al. Expansion of atypical memory B cells is a prominent feature of COVID-19. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(10):1101-1103. doi:10.1038/s41423-020-00542-2
32. Burack D, Pereira MR, Tsapepas DS, et al. Prevalence and Predictors of SARS-CoV-2 Antibodies among Solid Organ Transplant Recipients with Confirmed Infection. *Am J Transplant*. February 2021. doi:10.1111/ajt.16541
33. Clark SA, Clark LE, Pan J, et al. SARS-CoV-2 evolution in an immunocompromised host reveals

- shared neutralization escape mechanisms. *Cell*. March 2021. doi:10.1016/j.cell.2021.03.027
34. Benotmane I, Gautier-Vargas G, Cognard N, et al. Weak anti–Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 antibody response after the first injection of an mRNA Coronavirus Disease 2019 vaccine in kidney transplant recipients. *Kidney Int*. March 2021. doi:10.1016/j.kint.2021.03.014
 35. Chavarot N, Ouedrani A, Marion O, et al. Poor Anti-SARS-CoV-2 Humoral and T-cell Responses After 2 Injections of mRNA Vaccine in Kidney Transplant Recipients Treated with Belatacept. *Transplantation*. April 2021. doi:10.1097/TP.0000000000003784
 36. Gao Y dong, Ding M, Dong X, et al. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2021;76(2):428-455. doi:10.1111/all.14657
 37. Cheng Y, Luo R, Wang K, et al. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int*. 2020;97(5):829-838. doi:10.1016/j.kint.2020.03.005
 38. Hirsch JS, Ng JH, Ross DW, et al. Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. *Kidney Int*. 2020;98(1):209-218. doi:10.1016/j.kint.2020.05.006
 39. Ng JH, Hirsch JS, Wanchoo R, et al. Outcomes of patients with end-stage kidney disease hospitalized with COVID-19. *Kidney Int*. 2020;98(6):1530-1539. doi:10.1016/j.kint.2020.07.030
 40. Shang J, Wan Y, Luo C, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(21). doi:10.1073/pnas.2003138117
 41. Su H, Yang M, Wan C, et al. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int*. April 2020. doi:10.1016/j.kint.2020.04.003
 42. Sharma P, Uppal NN, Wanchoo R, et al. COVID-19–Associated Kidney Injury: A Case Series of Kidney Biopsy Findings. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(9):1948-1958. doi:10.1681/ASN.2020050699
 43. Kissling S, Rotman S, Gerber C, et al. Collapsing glomerulopathy in a COVID-19 patient. *Kidney Int*. 2020;98(1):228-231. doi:10.1016/j.kint.2020.04.006
 44. Wu H, Larsen CP, Hernandez-Arroyo CF, et al. AKI and collapsing glomerulopathy associated with covid-19 and apol1 high-risk genotype. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(8):1688-1695. doi:10.1681/ASN.2020050558
 45. Thomas T, Stefanoni D, Reisz JA, et al. C L I N I C A L M E D I C I N E COVID-19 infection alters kynurenine and fatty acid metabolism, correlating with IL-6 levels and renal status. 2020. doi:10.1172/jci.insight.140327
 46. Cravedi P, Mothi SS, Azzi Y, et al. COVID-19 and kidney transplantation: Results from the TANGO International Transplant Consortium. *Am J Transplant*. 2020;20(11):3140-3148. doi:10.1111/ajt.16185

Tables

1. Main patient characteristics

Variable	Mild forms (n=29)	Severe forms (n=22)	p-value
Medical past			
Medical history of			
- Chronic respiratory insufficiency, yes (%)	8 (27.6)	7 (31.8)	0.74
- Cardiovascular events, yes (%)	10 (34.5)	11 (50)	0.26
- Hypertension, yes (%)	21 (72.4)	19 (86.3)	0.23
- Cancer, yes (%)	4 (13.8)	2 (9)	0.61
- Diabetes mellitus, yes (%)	8 (27.6)	11 (50)	0.10
- Smoking, yes (%)	5 (17.2)	4 (18.1)	0.89
Dialysis at admission, yes (%)	1 (3.4)	1 (4.5)	0.85
Transplanted organ			
- Kidney, n (%)	21 (72.4)	19 (86.5)	0.28
- Liver, n (%)	4 (13.84)	1(4.5)	
- Combined Kidney-Pancreas, n (%)	0	1 (4.5)	
- Heart, n (%)	4 (13.8)	1 (4.5)	
Parameters at admission			
Recipient age, mean (± SD)	55 ± 11	56 ± 15	0.63
Recipient gender, male (%)	17 (57)	19 (86)	0.06
Body Mass Index (kg/m ²), mean (SD)	27.3 ± 5.0	28.8 ± 7.2	0.70
IS at admission, n (%)			0.64
Tac / MMF/ S	23	17	
Tac / mTORi ± S	4	2	
Co-stimulation inhibitors* /MMF/S	1	2	
mTORi/S	0	1	
Time between transplantation – Sars-CoV-2 diagnosis, months (median, IQR ₂₅₋₇₅)	49.4 (2; 108)	26.7 (0.9; 77)	0.39
Time between first symptom of COVID-19 – hospitalization (days) median, (IQR ₂₅₋₇₅)	4 (2; 6)	3 (1; 5)	0.40
Time between SARS-CoV-2 diagnosis – first immunological analysis (days) median, (IQR ₂₅₋₇₅)	3 (1; 5)	6 (0; 16)	0.18
CT-scan evidence of COVID-19 pneumonia n (%)	22 (75.9)	19 (86)	0.48
Severity of CT-scan lesions (%)			0.31
<25	12 (41.4)	4 (18)	
25-50	8 (27.6)	12 (54.5)	
>50	2 (6.9)	3 (13.6)	
Oxygen requirement, yes n (n%)	6 (20.7)	9 (40.9)	0.13
SaO ₂ (%)	97.8 ± 1.6	96.6 ± 3.4	0.22
Biologic parameters mean (± SD)			
- Serum creatinine (µmol/L)	125 ± 52	163 ± 58	0.008
- CKD-EPI eGFR (mL/min/1.73m ²)	52.2 ± 23.5	35.8 ± 14.9	0.0007
- Ferritin (µg/L)	802 ± 1018	786 ± 508	0.15
- Troponin (µg/L)	23.6 ± 24	60.7 ± 76	0.08
- C-Reactive Protein (mg/L)	61 ± 81	95 ± 81	0.02
- Serum albumin (g/L)	31.1 ± 6	31.5 ± 10	0.72
- Platelets (G/mm ³)	195 ± 79	194 ± 99	0.37

- Serum Interleukin 1 β (pg/mL), median, (IQR ₂₅₋₇₅)	0.6 (0.3-1.0)	0.7 (0.5; 0.9)	0.51
- Serum Interleukin 6 (pg/mL), median, (IQR ₂₅₋₇₅)	10.0 (7.3- 53.9)	14.7 (4.3; 55.9)	0.99
- Serum TNF α (pg/mL), median, (IQR ₂₅₋₇₅)	18.7 (12.9; 26.4)	16.2 (11.0; 28.0)	0.99
- Serum IL8 (pg/mL), median, (IQR ₂₅₋₇₅)	10.8 (8.35; 13.5)	8.6 (4.0; 11.2)	0.22
Hospitalization follow-up			
Treatments n (%)			
Azithromycin	9 (31)	6 (27)	0.77
Third generation cephalosporin	23 (79)	21 (95)	0.12
Hydroxychloroquine	4 (14)	0	0.12
Dexamethasone	8 (28)	17 (77)	0.0006
Time (days) between Dexamethasone – sample analysis*	-1.5 (-3.5 ; 0)	-2.5 (-12 ; 0)	0.23
IL6-R blockers	0	4 (18)	0.03
Time (days) between IL6-R blockers- sample analysis**	-	-1 (-7 ; 4)	-
Convalescent plasma therapy	1 (3)	2 (9)	0.57
Outcomes, n (%)			0.05
Oxygen therapy	7 (24)	22 (100)	
Non-invasive ventilation / High flow oxygen	0	5 (23)	
Invasive ventilation	0	17 (77)	

Abbreviations: IS, Immunosuppression; Tac, tacrolimus; MMF, mycophenolate mofetil; S; Steroids; mTORi, inhibitors of mammalian target of rapamycin; eGFR, Estimated Glomerular Filtration Rate.

Costimulation inhibitors were represented by anti-CD40 monoclonal antibodies in mild (n=1) and severe case (n=1), and belatacept in one case with severe disease.

*Blood sample analyses were performed before dexamethasone for 6/8 mild forms and 16/17 severe forms.

** Blood sample analyses were performed before IL6-R blockers therapy in 3 / 4 severe forms.

Figures legend

Figure 1 A-E. Comparison of NK, conventional and regulatory T, and B cell compartment in mild and severe forms of COVID-19

Severe forms were analyzed using the immunological sample taken at the closest time before the worse clinical situation.

A: Total lymphocyte count, CD3+, CD4+, CD8+ T cell count, proportion of NK cells, $\delta\gamma$ T cells, and CD19+ B cells.

B: T cell compartment: CD4+ memory T cell compartment, Tregs, activation senescence and exhaustion markers, and functional markers. CD8+ memory T cell compartment, activation senescence and exhaustion markers, and functional markers.

C: Correlation between the percentage of Tregs and CD4+ TIGIT+ or CD4+ CD39+ cells, and CD8+ PD1+ or CD8+ CD39+, and CD4+TIGIT+ and CD4+perforin+/granzyme B + in mild and severe forms.

The linear regression analysis was assessed using a Pearson correlation.

D: B cell compartment: naive, transitional, activated, memory B cells, and plasmablasts.

Data are represented as median with interquartile ranges.

E: Correlation between the percentage of CD27+ memory B cells and CD4+ EM T cells in mild and severe forms.

The linear regression analysis was assessed using a Pearson correlation.

*: $p < 0.05$

Figure 2 A-B: Comparison of NK and conventional, T, and B cell compartment in an initially mild case that became severe after the first blood test, and those that remained mild

A. NK cell count over time in mild and severe forms.

B. CD3+, activated CD4+, PD1+ and CD39+ CD4+ T cells, Perforin+ / Granzyme B + CD4+ T cells, CD8+ T cells, and memory CD19+ CD21^{low} B cells.

Data are represented as mean with standard error of the mean.

*: $p < 0.05$

Supporting information

Supporting information 1

Registration information

Supporting information 2

Gating strategy.

Supporting information 3

Comparison of NK, conventional and regulatory T, and B cell compartment in mild and severe forms of COVID-19 in kidney transplant recipients

Supporting information 4

Clinical, biological and radiological description of patients included in the kinetic evaluation of NK and conventional, T, and B cell compartment during COVID-19

Supporting information 5

Kinetic of expression of CD4+ and CD8+ T cell subsets during the hospitalization

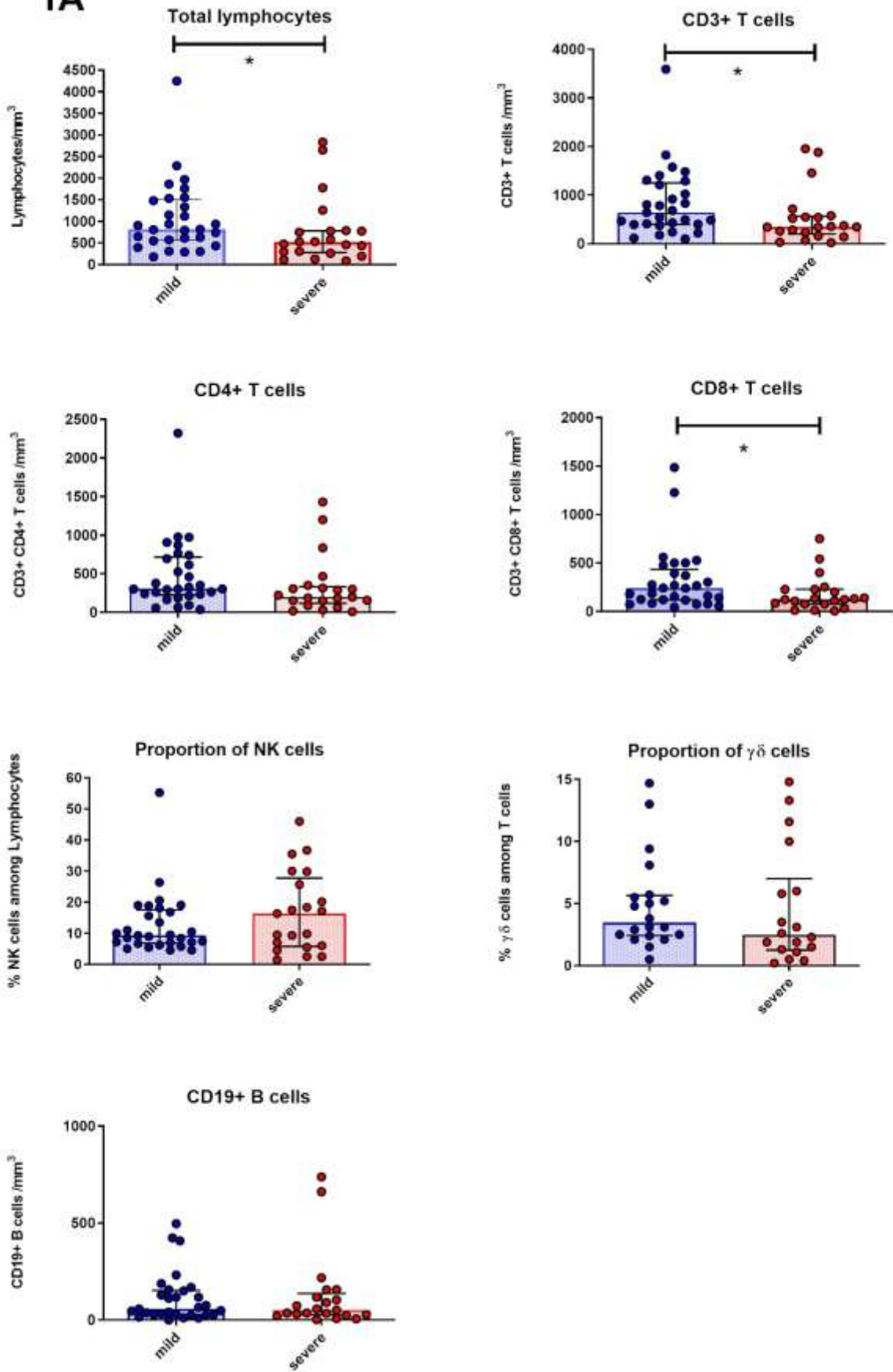
Data are expressed as mean with standard error of the mean

*: $p < 0.05$

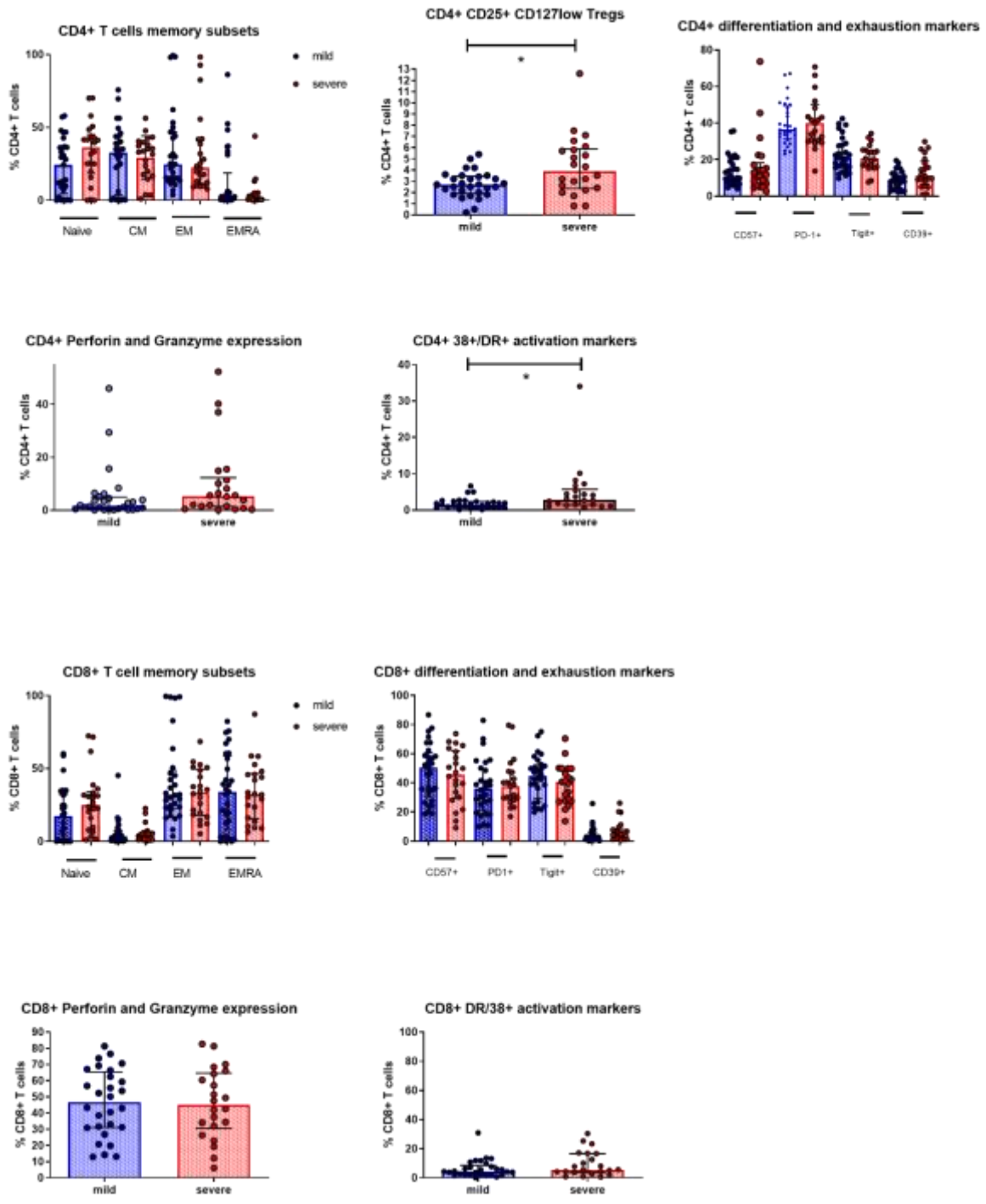
Supporting information 6

Comparison between patients that developed or not a positive serology after COVID-19.

1A

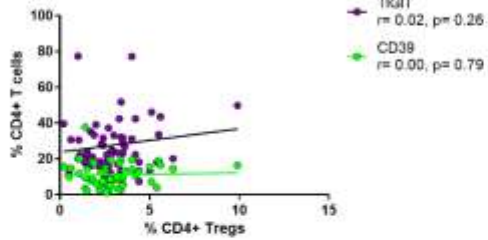


1B

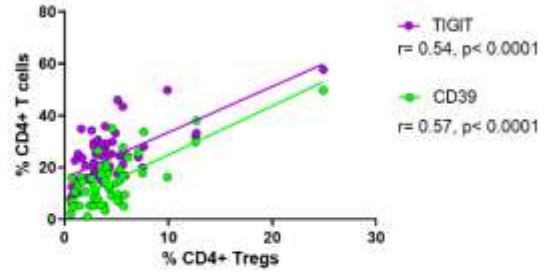


1C

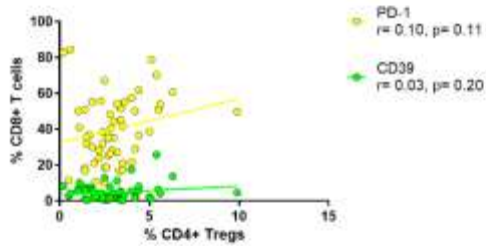
**% CD4+ TIGIT+ and CD4+ CD39+ / % Tregs
in mild forms**



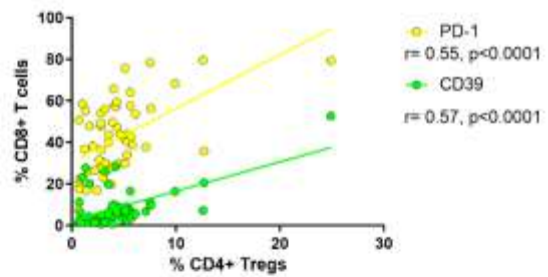
**% CD4+ TIGIT+ or CD4+ CD39+ / % Tregs
in severe forms**



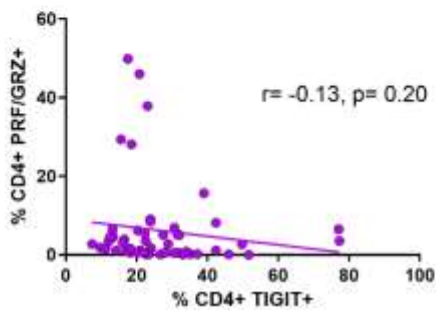
**% CD8+ PD1+ or CD8+ CD39+ / % Tregs
in mild forms**



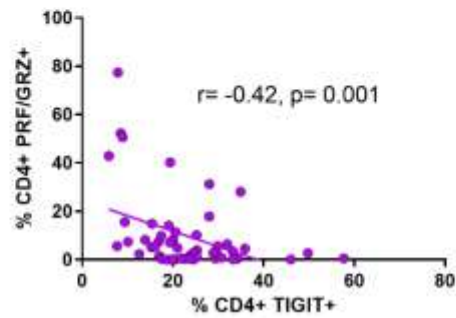
**% CD8+ PD1+ or CD8+ CD39+ / % Tregs
in severe forms**



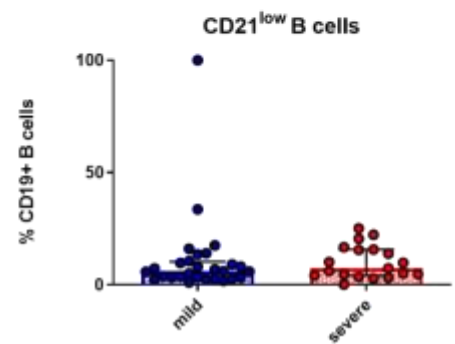
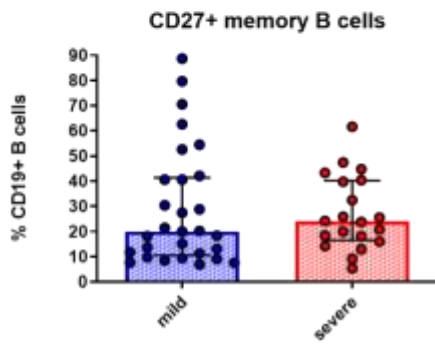
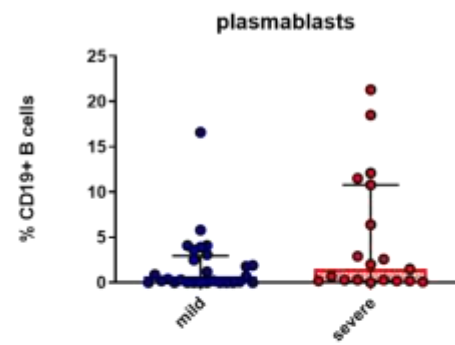
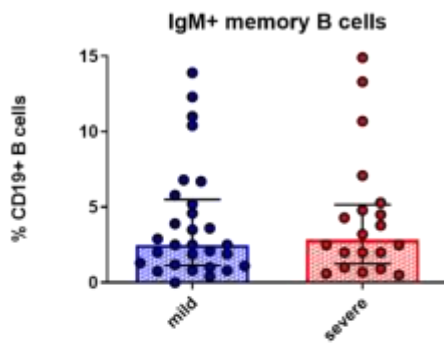
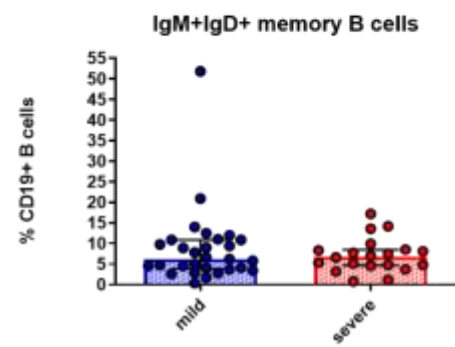
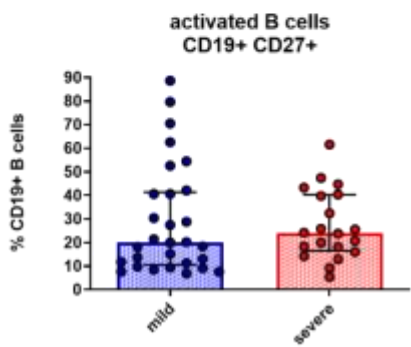
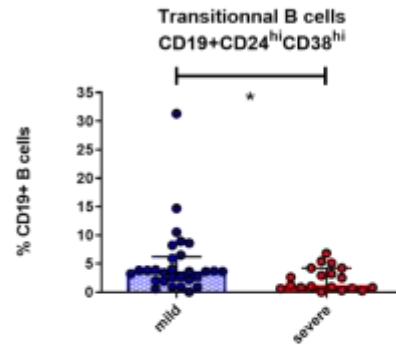
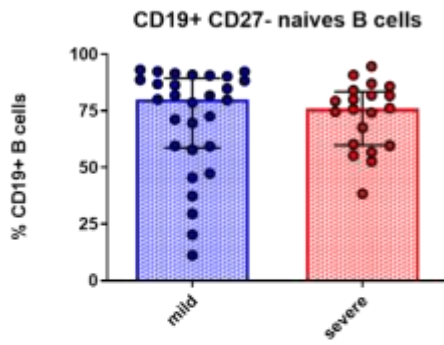
**% CD4+ PRF/GZM+ / CD4+ Tigt+
in mild forms**



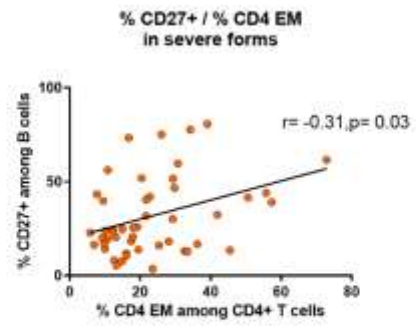
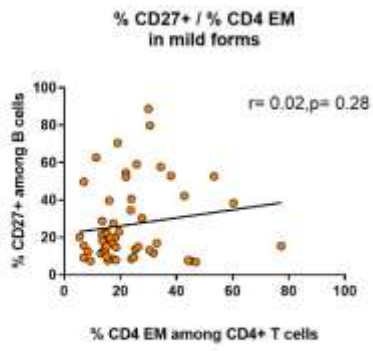
**% CD4+ PRF/GZM+ / CD4+ TIGIT+
in severe forms**



1D

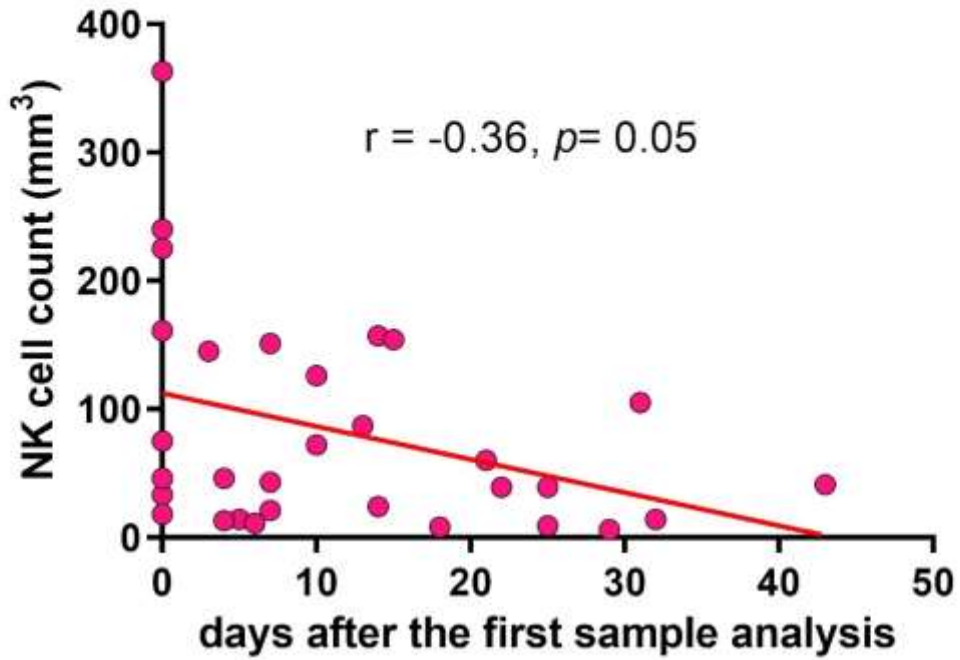


1E

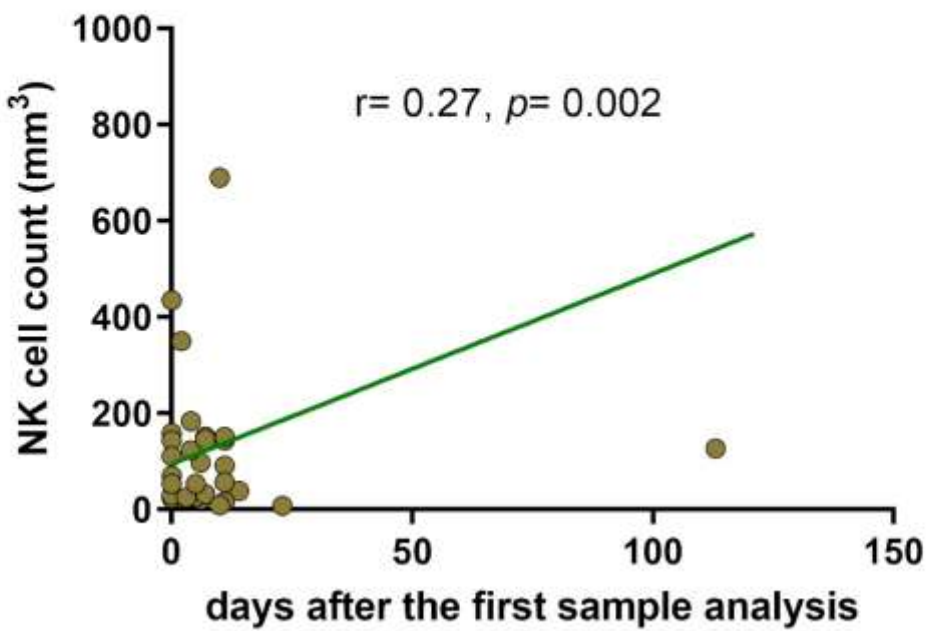


A

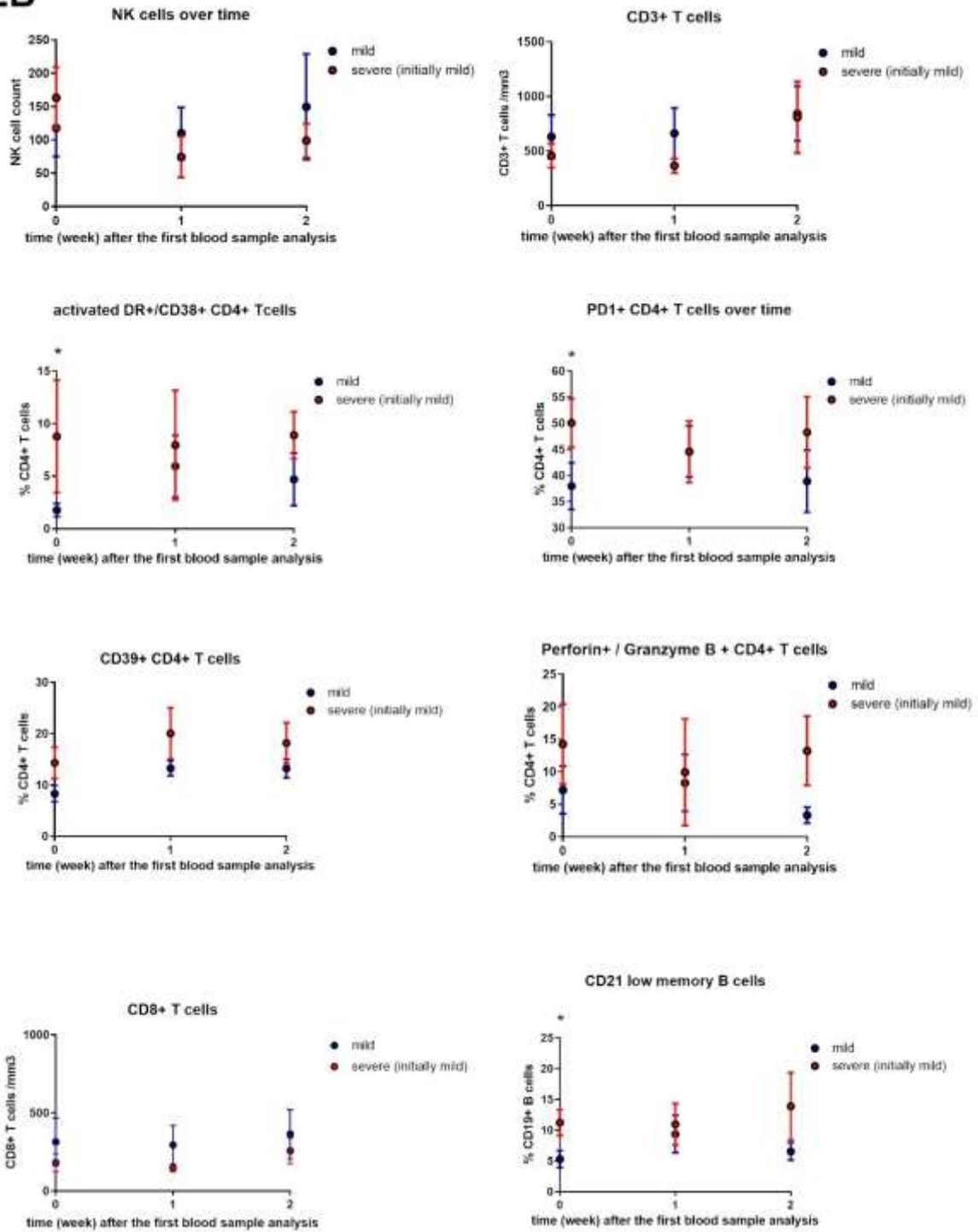
NK cells over time in severe forms



NK cells over time in mild forms



2B



Supporting Information 1

A *retrospective* analyze of the data of organ transplant patients with COVID-19, over the period March to November 2020 was performed in the Toulouse university-hospital. 51 patients were analyzed.

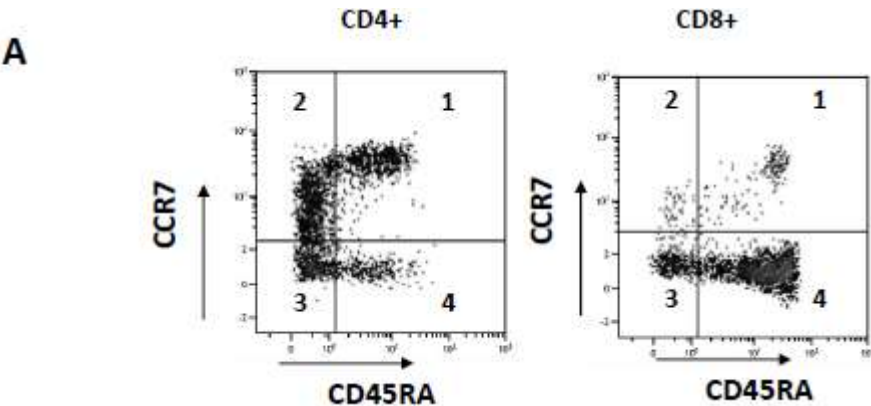
According to French law on ethics, patients were informed that their codified data will be used for the study.

According to the French ethic and regulatory law (public health code) *retrospective* studies based on the exploitation of usual care data don't should be submit at an ethic comitee but they have to be declare or cover by reference methodology of the French National Commission for Informatics *and Liberties* (CNIL).

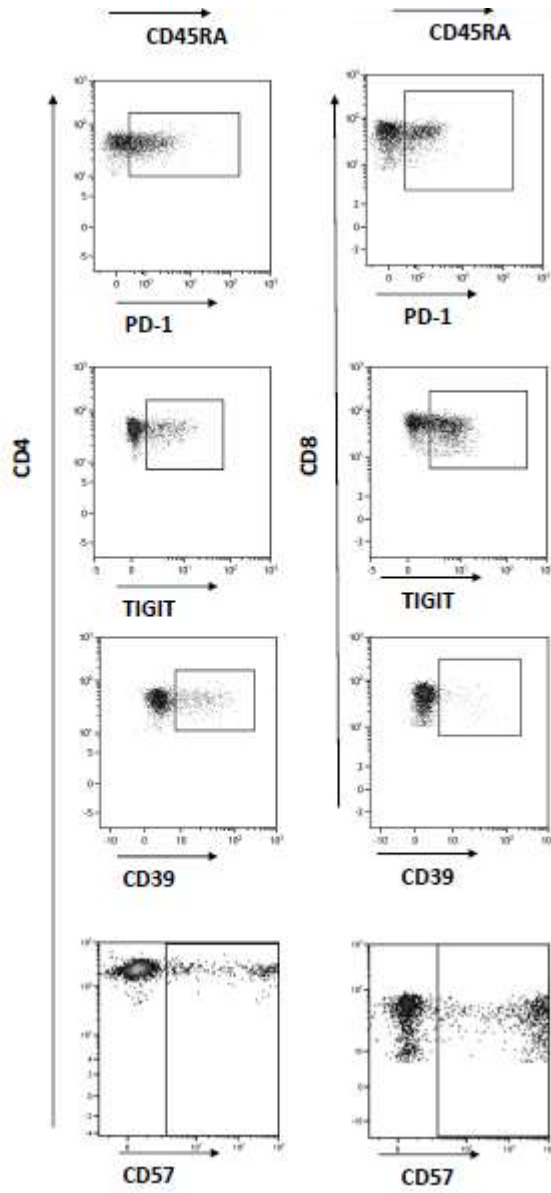
A collection and computer processing of personal and medical date was implemented to analyze the results of the research. Toulouse University Hospital signed a commitment of compliance to the reference methodology MR-004 of the French National Commission for Informatics and Liberties (CNIL). After evaluation and *validation by the data protection officer and according to the General Data Protection Regulation**, this study completing all the criteria, it is register in the register of retrospective study of the Toulouse University Hospital (number's register: *RnIPH 2021 sou-16 s*) and cover by the MR-004 (CNIL number: 2206723 v 0).

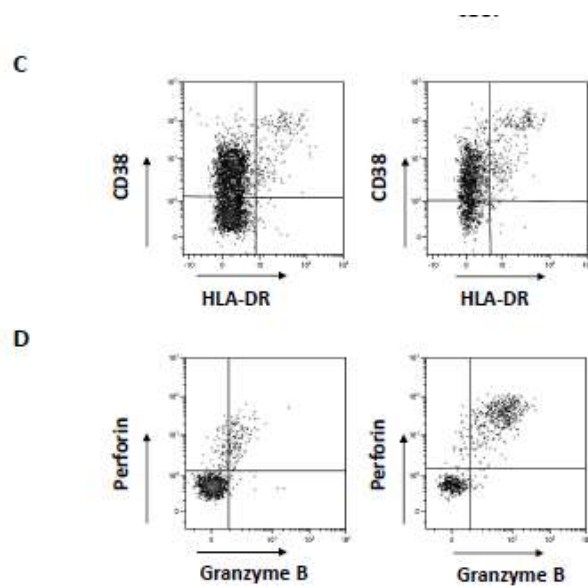
This study was approved by Toulouse University Hospital and confirm that ethic requirements were totally respected in the above report.

*Regulation (EU) 2016/679 of the European Parliament and of the Council of 27 April 2016



B





Example of stainings for CD4+ (left panels) and CD8+ (right panels). (A) Naive and memory phenotype, delimiting naive T cells (1), central memory (2), effector memory (3), and EMRA (4) subsets. (B) Immune checkpoints and CD57 expression, gated on non-naive CD4 and CD8 T cells. (C) Activated CD38+/HLA-DR+ T cells. (D) Intracellular expression of Perforin and Granzyme B.

Supporting Information 3A. Main kidney transplant recipients characteristics

Variable	Mild forms (n=21)	Severe forms (n= 19)	p-value
Medical past			
Medical history of			
- Cardiovascular events, yes (%)	7 (33.3)	11 (57.9)	0.20
- Hypertension, yes (%)	17 (80.9)	17 (89.5)	0.66
- Cancer, yes (%)	2 (9.5)	1 (5.3)	>0.99
- Diabetes mellitus, yes (%)	7 (33.3)	10 (52.6)	0.34
- Smoking, yes (%)	3 (14.3)	2 (10.5)	>0.99
Parameters at admission			
Recipient age, mean (± SD)	54 ± 12	57 ± 16	0.27
Recipient gender, male (%)	13 (61.9)	16 (84.2)	0.16
Body Mass Index (kg/m ²), mean (SD)	27.0 ± 5.0	29.0 ± 7.0	0.70
IS at admission, n (%)			0.64
Tac / MMF/ S	19	15	
Tac / mTORi ± S	1	1	
Co-stimulation inhibitors* /MMF/S	1	2	
mTORi/S	0	1	
Time between transplantation – Sars-CoV-2 diagnosis, months (median, IQR ₂₅₋₇₅)	49 (8; 117)	28 (1; 82)	0.46
Time between first symptom of COVID-19 – hospitalization (days) median, (IQR ₂₅₋₇₅)	4 (3; 6)	3 (1; 5)	0.23
Time between SARS-CoV-2 diagnosis – first immunological analysis (days) median, (IQR ₂₅₋₇₅)	3 (1; 16)	4 (1; 11)	0.49
CT-scan evidence of COVID-19 pneumonia n (%)	16 (76.2)	18 (94.7)	0.19
Severity of CT-scan lesions (%)			0.20
<25	8 (38.1)	4 (21)	
25-50	6 (28.6)	12 (63.2)	
>50	2 (9.5)	2 (10.5)	
Oxygen requirement, yes n (n%)	4 (20.7)	8 (40.9)	0.17
SaO ₂ (%)	97.5 ± 0.4	93.5 ± 3.9	0.61
Biologic parameters mean (± SD)			
- Serum creatinine (µmol/L)	159 ± 22	205 ± 22	0.04
- CKD-EPI eGFR (mL/min/1.73m ²)	49.9 ± 5.3	35.5 ± 3.6	0.03
- Ferritin (µg/L)	594 ± 198	817 ± 189	0.13
- Troponin (µg/L)	26.5 ± 8.4	60.7 ± 22.8	0.17
- C-Reactive Protein (mg/L)	63 ± 21	98.9 ± 19.6	0.04
- Serum albumin (g/L)	32.8 ± 3	33.2 ± 4.5	0.58
- Platelets (G/mm ³)	212 ± 17	195 ± 23	0.14
- Serum Interleukin 1β (pg/mL), median, (IQR ₂₅₋₇₅)	0.7 (0.3-1.6)	0.7 (0.6; 2.0)	0.42
- Serum Interleukin 6 (pg/mL), median, (IQR ₂₅₋₇₅)	11.9 (8.5- 65.9)	118.0 (2.7; 72.0)	0.96
- Serum TNFα (pg/mL), median, (IQR ₂₅₋₇₅)	16.8 (10.6; 29.9)	20.1 (13.1; 28.1)	0.96
- Serum IL8 (pg/mL), median, (IQR ₂₅₋₇₅)	9.9 (6.7; 18.6)	9.5 (3.2; 12.8)	0.69
Hospitalization follow-up			
Treatments n (%)			
Azithromycin	6 (29)	6 (32)	0.77
Third generation cephalosporin	11 (52)	19 (100)	<0.001

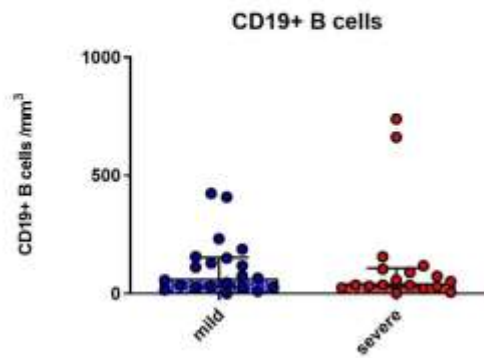
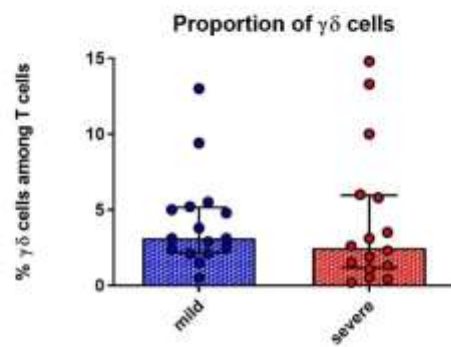
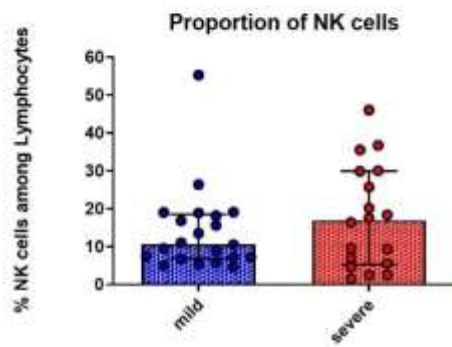
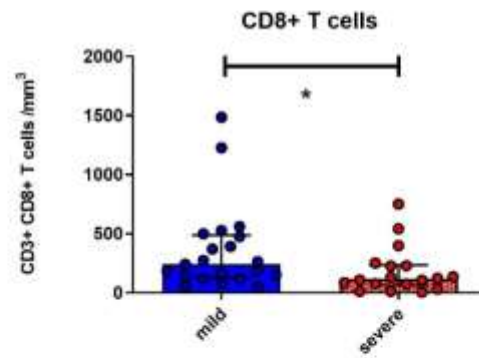
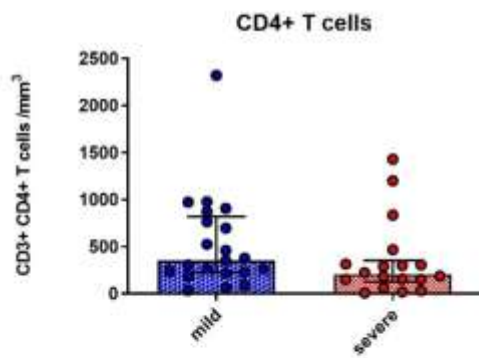
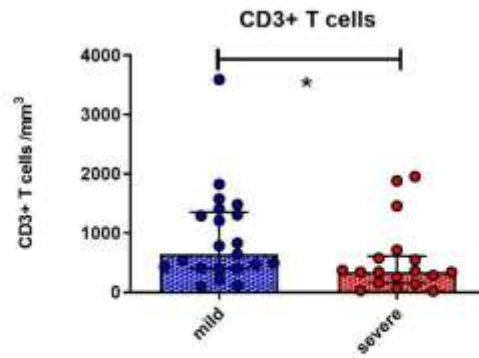
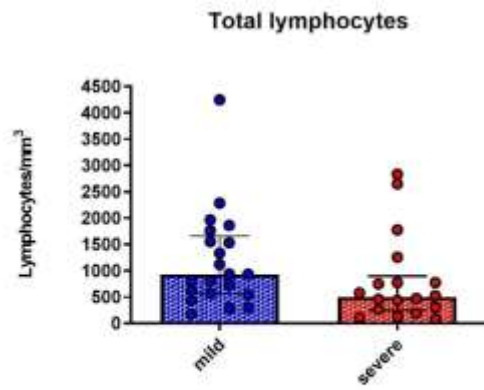
Hydroxychloroquine	4 (19)	0	0.11
Dexamethasone	4 (19)	17 (89)	<0.001
IL6-R blockers	0	4 (21)	0.04
Convalescent plasma therapy	0	2 (10)	0.22
Outcomes, n (%)			0.07
Oxygen therapy	6 (24)	19 (100)	
Non-invasive ventilation / High flow oxygen	0	2 (11)	
Invasive ventilation	0	17 (89)	

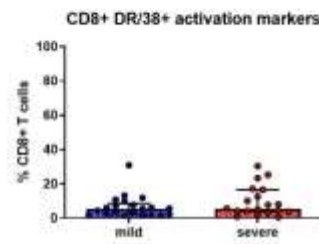
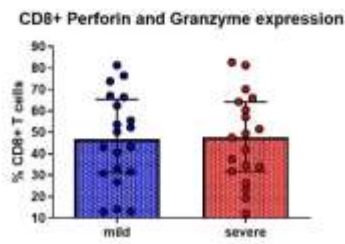
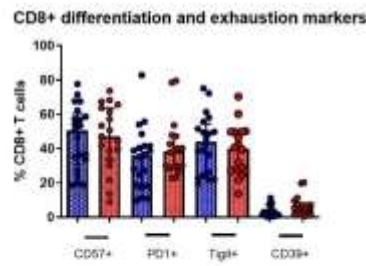
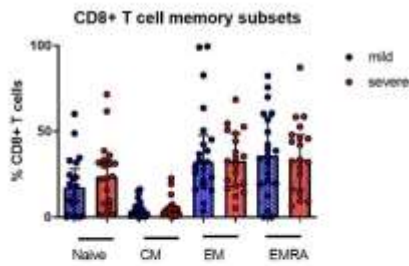
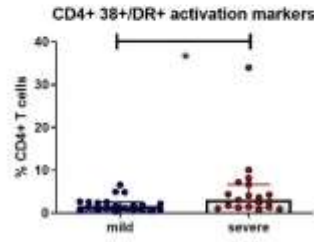
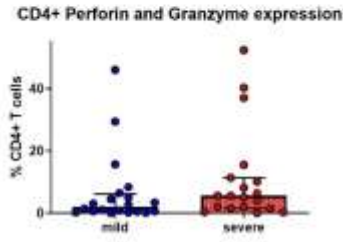
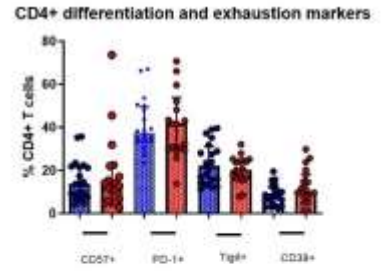
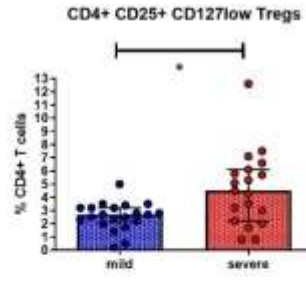
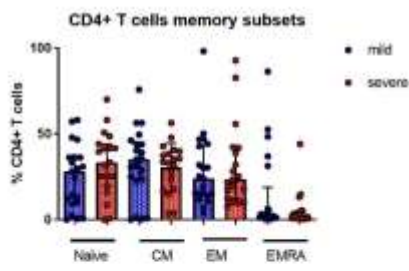
Supporting Information 3B. Clinical, biological and radiological description of patients included in the kinetic evaluation of T and B cell compartment during COVID-19.

Variable	Mild forms (n=6)	Severe (initially mild) forms (n= 8)	p-value
Parameters at admission			
IS at admission, n (%)			0.62
Tac / MMF/ S	3	6	
Tac / mTORi/ S	1	0	
Iscalimab/MMF/S	1	1	
Belatacept/MMF/S	1	1	
Time between transplantation – Sars-CoV-2 diagnosis, months median, (IQR ₂₅₋₇₅)	10 (6; 59)	26 (1; 82)	0.27
Time between first symptom of COVID-19 – hospitalization (days) median, (IQR ₂₅₋₇₅)	4 (2; 5)	3 (1; 5)	0.99
Time between first symptom of COVID 19- first immunological analysis (days), median (IQR ₂₅₋₇₅)	1 (0; 2)	2 (1; 8)	0.15
CT-scan evidences of COVID-19 pneumonia n (%)	6	5	0.36
Severity of CT-scan lesions (%)			
<25	1	0	
25-50	5	4	
>50	0	1	
Biologic parameters mean (± SD)			
- Serum creatinine (µmol/L)	138 ± 18	199 ± 86	0.29
- Ferritin (µg/L)	323 ± 79	786 ± 508	0.40
- Troponin (µg/L)	27 ± 11	66 ± 78	0.57
- C-Reactive Protein (mg/L)	39 ± 11	100 ± 81	0.36
- Serum albumin (g/L)	33.5 ± 4.5	31.5 ± 10	0.55
- Platelets (G/mm3)	154 ± 130	195 ± 86	0.29
Clinical presentation, n (%)			
Oxygen therapy	0	2 (25)	0.47
Non-invasive ventilation / High flow oxygen	0	0	>0.99
Invasive ventilation	0	0	>0.99
Follow-up: Immunological analysis after one week			
Treatments at immunological analysis # Week 1, n (%)			
Dexamethasone	3 (50)	4 (50)	>0.99
IL6-R blockers	0	4 (50)	0.08
Convalescent plasma therapy	1 (17)	0	0.43
Outcomes at immunological analysis # week 1, n (%)			
Oxygen therapy	2 (33.3)	8 (100)	0.01
Non-invasive ventilation / High flow oxygen	0	2 (25)	0.47
Invasive ventilation	0	6 (75)	0.01
Follow-up: Immunological analysis after two weeks			
Treatments, n (%)			

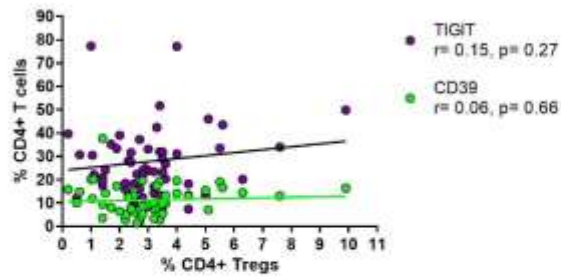
Dexamethasone	3 (50)	4 (50)	>0.99
IL6-R blockers	0	5 (63)	0.03
Convalescent plasma therapy	1 (17)	1 (13)	>0.99
Clinical presentation, n (%)			
Oxygen therapy	2 (33.3)	8 (100)	0.01
Non-invasive ventilation / High flow oxygen	0	2 (25)	0.47
Invasive ventilation	0	6 (75)	0.01

Abbreviations: IS, Immunosuppression; Tac, tacrolimus; MMF, mycophenolate mofetil; S; Steroids; mTORi, inhibitors of mammalian target of rapamycin.

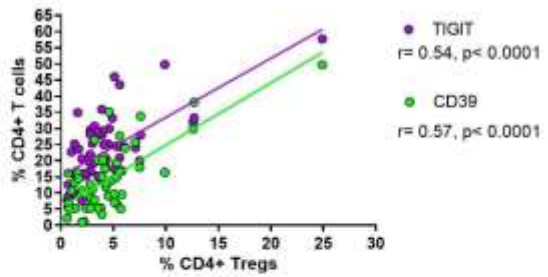




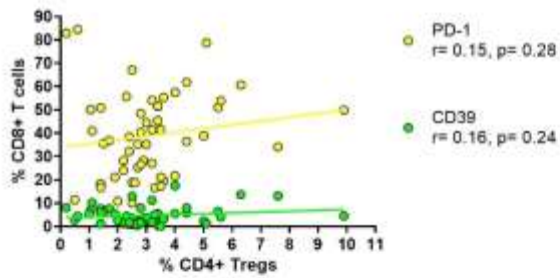
% CD4+ TIGIT+ and CD4+ CD39+ / % Tregs in mild forms



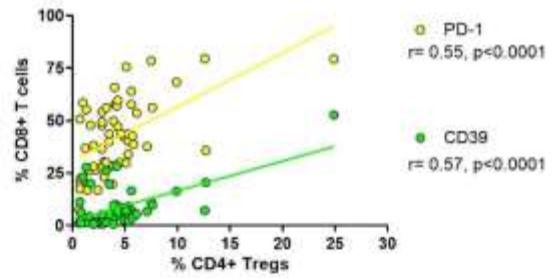
% CD4+ TIGIT+ or CD4+ CD39+ / % Tregs in severe forms



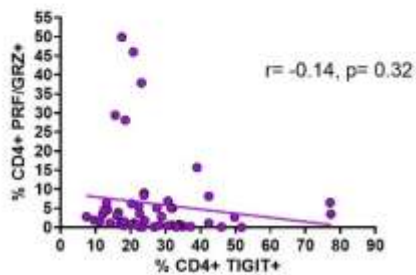
% CD8+ PD1+ or CD8+ CD39+ / % Tregs in mild forms



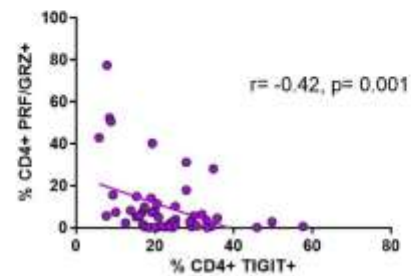
% CD8+ PD1+ or CD8+ CD39+ / % Tregs in severe forms

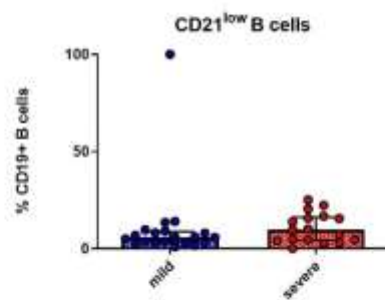
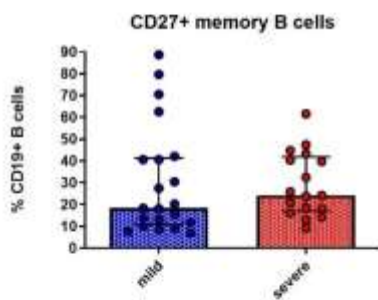
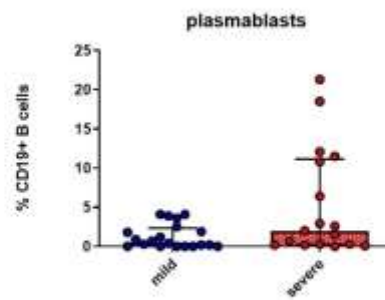
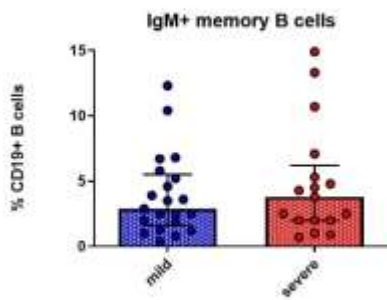
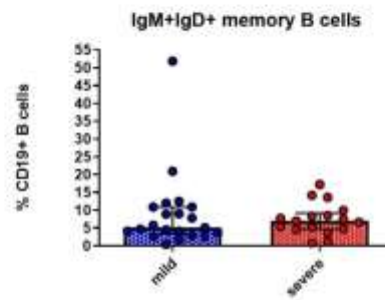
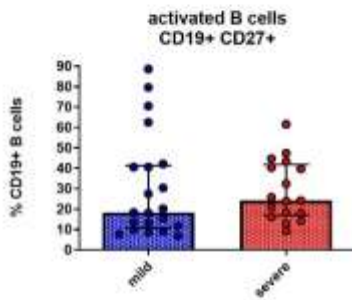
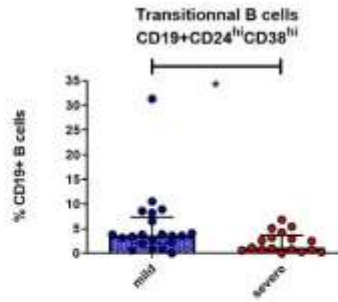
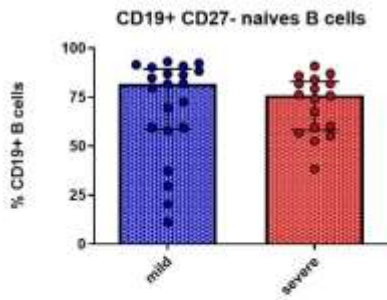


% CD4+ PRF/GZM+ / CD4+ Tigit+ in mild forms

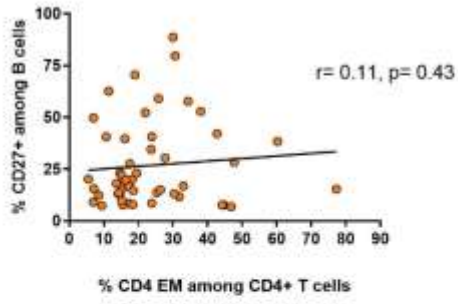


% CD4+ PRF/GZM+ / CD4+ TIGIT+ in severe forms

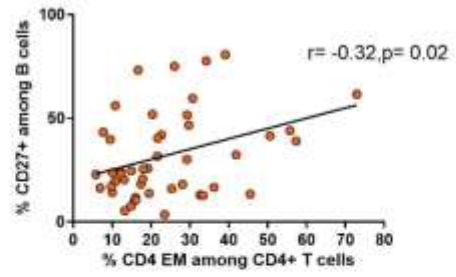




**% CD27+ / % CD4 EM
in mild forms**



**% CD27+ / % CD4 EM
in severe forms**



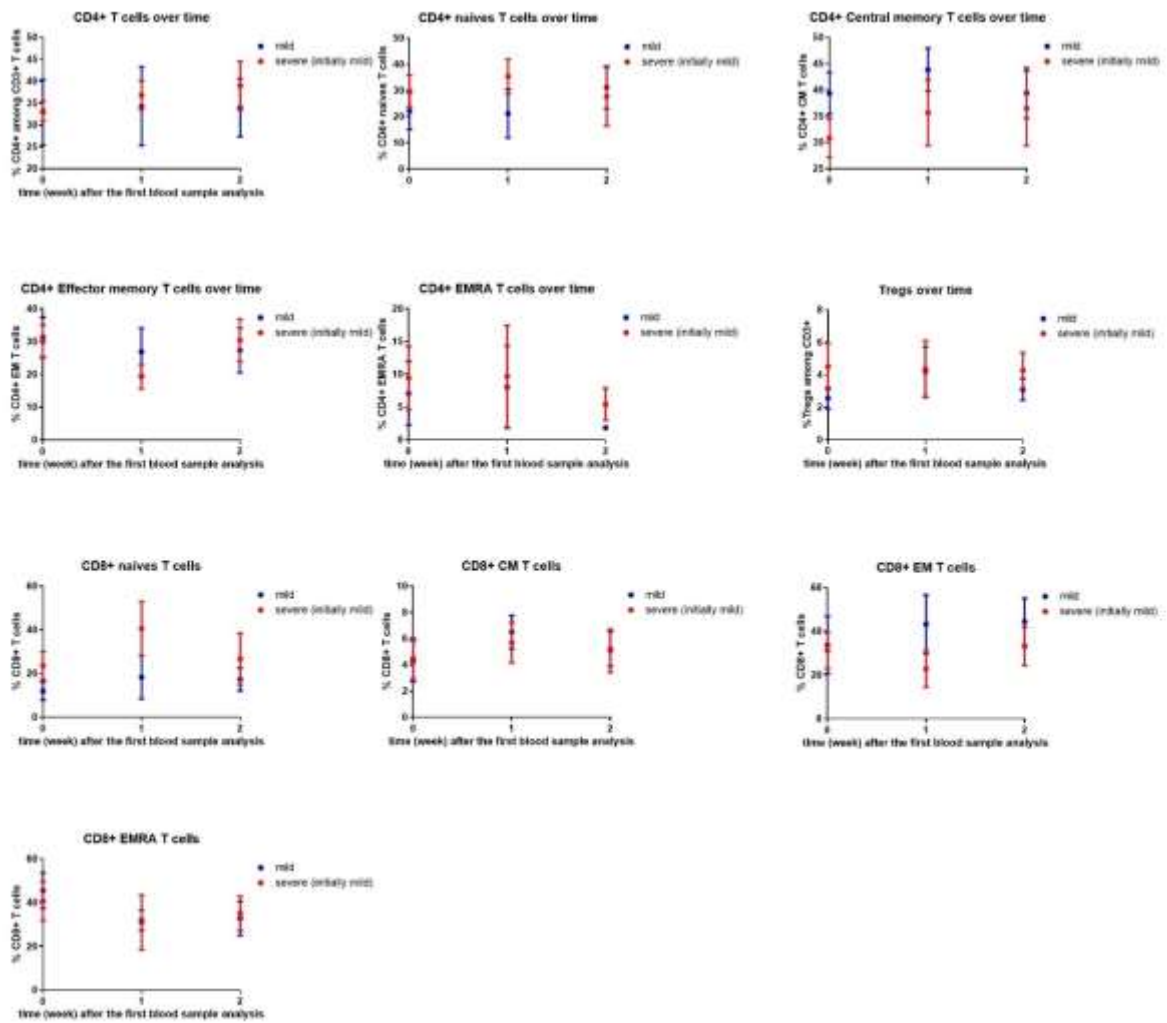
Supporting content 4. Clinical, biological and radiological description of patients included in the kinetic evaluation of T and B cell compartment during COVID-19.

Variable	Mild forms (n=9)	Severe (initially mild) forms (n= 8)	p-value
Parameters at admission			
IS at admission, n (%)			0.83
Tac / MMF/ S	7	6	
Tac / mTORi/ S	1	0	
Iscalimab/MMF/S	1	1	
Belatacept/MMF/S	1	1	
Time between transplantation – Sars-CoV-2 diagnosis, months median, (IQR ₂₅₋₇₅)	26 (3; 107)	26 (1; 82)	0.08
Time between first symptom of COVID-19 – hospitalization (days) median, (IQR ₂₅₋₇₅)	4 (2; 5)	3 (1; 5)	0.66
Time between first symptom of COVID 19- first immunological analysis (days), median (IQR ₂₅₋₇₅)	2 (1; 9)	2 (1; 8)	0.19
CT-scan evidences of COVID-19 pneumonia n (%)	7	5	0.62
Severity of CT-scan lesions (%)			
<25	1	0	
25-50	5	4	
>50	1	1	
Biologic parameters mean (± SD)			
- Serum creatinine (µmol/L)	167 ± 130	199 ± 86	0.06
- Ferritin (µg/L)	876 ± 1066	786 ± 508	0.80
- Troponin (µg/L)	31 ± 26	66 ± 78	0.57
- C-Reactive Protein (mg/L)	55 ± 68	100 ± 81	0.18
- Serum albumin (g/L)	30 ± 4.5	31.5 ± 10	0.55
- Platelets (G/mm3)	167 ± 130	195 ± 86	0.12
Clinical presentation, n (%)			
Oxygen therapy	0	2 (25)	0.21
Non-invasive ventilation / High flow oxygen	0	0	>0.99
Invasive ventilation	0	0	>0.99
Follow-up: Immunological analysis after one week			
Treatments at immunological analysis # Week 1, n (%)			
Dexamethasone	4 (44)	4 (50)	>0.99
IL6-R blockers	0	4 (50)	0.03
Convalescent plasma therapy	1 (11)	0	>0.99
Outcomes at immunological analysis # week 1, n (%)			
Oxygen therapy	4 (44)	8 (100)	0.03
Non-invasive ventilation / High flow oxygen	0	2 (25)	0.21
Invasive ventilation	0	6 (75)	0.01
Follow-up: Immunological analysis after two weeks			
Treatments, n (%)			

Dexamethasone	5 (56)	4 (50)	>0.99
IL6-R blockers	0	5 (63)	0.01
Convalescent plasma therapy	1 (11)	1 (13)	>0.99
Clinical presentation, n (%)			
Oxygen therapy	4 (44)	8 (100)	0.03
Non-invasive ventilation / High flow oxygen	0	2 (25)	0.21
Invasive ventilation	0	6 (75)	0.01

Abbreviations: IS, Immunosuppression; Tac, tacrolimus; MMF, mycophenolate mofetil; S; Steroids; mTORi, inhibitors of mammalian target of rapamycin.

Supporting content 5



Supporting information 6

Comparison between patients that developed or not a positive serology after COVID-19

Variable	Negative serology (n= 9)	Positive serology (n=35)	p
Kidney Tx, y (%)	8 (89)	25 (71)	0.41
Time between Tx – diagnosis (months)	56.7 (1.5; 104.0)	20.0 (1.0; 103)	0.96
Time between diagnosis – serologic test (days)	48 (4; 221)	18 (10; 25)	0.50
C reactive protein (mg/L)	36 (10; 69)	67 (30; 106)	0.10
Severe infection	3 (33)	15 (43)	0.72
Lymphocyte count (mm ³)	906 (131; 2022)	646 (397; 1248)	0.73
CD3+ T cell count (/mm ³)	786 (252; 1653)	469 (241; 917)	0.56
CD4+ T cell count (/mm ³)	189 (126; 700)	303 (157; 461)	0.82
CD8+ T cell count (/mm ³)	265 (121; 894)	142 (77; 284)	0.23
CD19 B cell count (/mm ³)	31 (7; 154)	57 (28; 129)	0.37
NK cell count (/mm ³)	78 (34; 185)	84 (46; 133)	0.99
Tregs (% of T cells)	2.3 (1.3; 3.0)	2.7 (2.0; 4.2)	0.20
CD4+ PD1+ (% of CD4+)	45.7 (37.6; 66.6)	36.3 (30.7; 48.2)	0.06
CD4+ Tigit+ (% of CD4+)	22.6 (17.6; 26.0)	19.4 (14.8; 26.0)	0.46
CD4+ CD39+ (% of CD4+)	12.5 (2.9; 16.9)	8.5 (5.2; 12.9)	0.49
CD8+ PD1+ (% of CD8+)	48.5 (30.0; 68.5)	30.1 (23.0; 39.6)	0.04
CD8+ Tigit+ (% of CD8+)	36.1 (24.9; 52.7)	43.7 (32.5; 53.4)	0.32
CD8+ CD39+ (% of CD8+)	3.5 (1.4; 9.7)	2.8 (1.3; 6.4)	0.65
CD27- (% of B cells)	79.0 (31.5; 89.8)	81.9 (67.5; 89.4)	0.49
CD24hiCD38hi (% of B cells)	2.0 (0.7; 5.4)	3.6 (1.7; 6.2)	0.30
CD21low (% of B cells)	8.0 (3.6; 15.6)	4.7 (2.6; 9.3)	0.12

Abbreviation Tx, Transplantation

III- Perspectives

1. ELT en greffe rénale : limites du travail et perspectives

Au cours des différents travaux présentés, des éléments en faveur de la survenue d'un état dysfonctionnel de la réponse immune T s'approchant de la définition de l'ELT peuvent être soulignés. Dans une population de patients transplantés stable au plan néphrologique, et indemnes de complications infectieuses, nous avons retrouvé une altération des réponses fonctionnelles T CD4+ et CD8+ chez les patients à distance de la greffe, en comparaison aux patients précoces. De plus, nous avons également retrouvé une diminution de la réponse T (principalement CD4+) allo-spécifique en comparaison aux « third parties ». Nous avons aussi observé une augmentation de l'expression de certains récepteurs inhibiteurs classiquement associés à l'ELT dans les CD4+ (augmentation du ratio d'expression TIGIT/CD226) et les CD8+ (principalement augmentation des CD8+ coexprimant PD-1 et TIGIT). Prises conjointement, ces données plaident en faveur de l'hypothèse de l'installation d'un état proche de l'ELT après transplantation d'organe, qui semble aller au-delà de la seule réponse spécifique du donneur. L'intense expression de certains des récepteurs inhibiteurs étudiés (PD-1, CD160, 2B4) lors de la survenue d'une complication infectieuse opportuniste (Leucoencephalopathie multifocale progressive, LEMP) apporte également un argument à la présence d'un épuisement lymphocytaire chez les patients sous immunosuppresseur au long cours présentant des réplifications virales chroniques (comme le JC-virus dans le cas de la LEMP). Cependant, ces données préliminaires méritent d'être confirmées avant d'affirmer un rôle de l'ELT après greffe rénale chez l'homme. Concernant l'impact de l'ELT dans la survenue d'un rejet, nous n'avons pas pu réaliser d'étude de réaction lymphocytaire mixte en cinétique, pour un même

couple donneur-receveur. Cet élément est primordial pour affirmer la réalité d'un ELT et son impact dans la survenue ou la protection vis-à-vis d'un rejet de greffe. Nous avons donc décidé de poursuivre ce travail et collecté plusieurs couples donneur/receveur à différents temps post greffe, afin de compléter ces données. Une autre difficulté à laquelle nous nous sommes heurtés lors de l'étude de l'ELT spécifique au donneur réside dans la nécessité d'utiliser une méthode d'exploration basée sur la prolifération, alors que nous cherchions à observer les cellules ayant perdu tout ou partie de cette capacité. Afin de contourner ce problème, nous avons prévu de compléter nos études par l'étude des marques épigénétiques des cellules T CD4+ et CD8+ allo-réactives. Le remodelage épigénétique associé à l'ELT est majeur (plus de 6000 régions de la chromatine ont été retrouvées différentes entre cellules mémoires, effectrices, et épuisées)¹. Ce remodelage épigénétique est considéré comme robuste, et non modifié par le blocage de la voie PD-1². La publication récente d'atlas des marques épigénétiques reliées à l'ELT au cours de pathologies infectieuses ou de cancers^{3,4} permet d'envisager l'étude de ces marques après transplantation d'organe. L'ATAC-seq est une technique de biologie moléculaire, (basée sur le mode d'action de la transposase Tn5 sur l'ADN) permettant d'étudier et de caractériser les régions accessibles de la chromatine de manière rapide, et avec une quantité de moindre de cellules⁵, ce qui permet d'envisager la réalisation de ce type de caractérisation après prolifération par réaction lymphocytaire mixte. Nous souhaitons prochainement étudier le développement de marques épigénétiques sur les T CD4+ et CD8+ allo-spécifiques, après greffe rénale, et ce de manière cinétique chez des patients greffés à partir d'un donneur vivant.

L'axe TIGIT/CD226/CD155 semble une voie de recherche intéressante en transplantation d'organe. Nous avons pu observer qu'au cours de la reconstitution immune post sérum anti-lymphocytaire, l'expression de TIGIT était plus importante chez les patients

transplantés avec anticorps spécifiques du donneur préformés, et qu'une perte des corrélations entre expression des récepteurs inhibiteurs et capacités fonctionnelles était perdue. L'augmentation de l'expression de TIGIT dans les CD4 et CD8 mémoires des patients avec anticorps spécifiques préformés est à mettre en parallèle avec l'augmentation du risque de complications infectieuses observé dans ce groupe de patients, recevant après induction, une immunosuppression de maintenance souvent élevée, du fait du risque accru de rejet chronique anticorps médié. De plus, au cours des infections à COVID-19, nous avons pu mettre en évidence une corrélation positive entre le taux de lymphocytes T régulateurs et le taux de lymphocytes T CD4 exprimant TIGIT, ainsi qu'entre le taux de lymphocytes T CD4 et le taux de CD4 capables de produire les cytokines cytotoxiques perforine et granzyme B. Enfin, nous avons observé une augmentation progressive du ratio d'expression de TIGIT/CD226 par les CD4 mémoires, avec le temps post transplantation. Ceci nous incite à poursuivre les explorations sur le rôle de cet axe au cours de la greffe, et le rôle spécifique de TIGIT dans les lymphocytes T régulateurs, où la molécule semble ici jouer un rôle fondamental de stabilisation des T régulateurs, ainsi que dans l'inhibition des voies Th1 et Th17⁶.

2. ELT en pratique clinique

Bien que la survie des greffons rénaux augmente progressivement, les résultats à long terme demeurent perfectibles, avec une espérance de vie des patients supérieure à celle des greffons ⁷. Après un an de transplantation, les complications principales rencontrées sont relatives soit à une sur-immunosuppression (cancers, infections principalement) soit à une

sous-immunosuppression (rejets aigus, et surtout chroniques). Actuellement, le monitoring du niveau d'immunosuppression des patients greffés est imparfait (reposant sur les biopsies rénales, le dosage de certains immunosuppresseurs) car reposant sur des cibles définies au sein d'une population : individualiser la prescription des traitements est nécessaire, pour limiter les effets indésirables des traitements immunosuppresseurs pour les patients qui représentent le risque le plus faible, et à l'inverse pour entreprendre des stratégies plus agressives chez les patients à haut risque. Les tentatives de minimisation de l'immunosuppression, même à distance de la transplantation, se sont révélées désastreuses en augmentant le risque de rejet et les pertes de greffons, lorsque les objectifs ne sont pas individualisés¹⁰. Afin d'établir des cibles propres à chaque patient post greffe, il est nécessaire de mieux connaître les mécanismes impliqués dans la diminution de la réponse T au cours du temps. Une meilleure compréhension de la cinétique d'expression et du rôle des récepteurs inhibiteurs dans l'alloréactivité pourrait permettre d'élaborer de nouveaux outils comprenant outre les antécédents cliniques, et les données biologiques classiques, les taux d'expression de ces récepteurs inhibiteurs.

Nous avons ainsi pu observer une signature spécifique aux capacités alloréactives dans les CD4m (TIGIT+CD226+Tim3-PD1-2B4-) après réaction lymphocytaire mixte. Le suivi au cours du temps de ce groupe de cellule, et la poursuite du travail exploratoire afin d'affiner cette signature en situation stable, mais aussi au cours du rejet, pourrait permettre d'optimiser les résultats obtenus par les outils de prédictions actuellement en cours de développement.

Nous avons également pu étudier la présence d'un ELT global au cours d'infections graves (COVID-19, LEMP) chez des patients transplantés d'organe solide. L'absence d'issue

positive chez des patients traités par anti-PD-1 au cours d'une LEMP confirme la profondeur de l'ELT chez ces patients, et le caractère multiple et redondant des différentes voies amenant à cette hypo-réponse. Cette absence de réponse illustre la difficulté à ramener des cellules T épuisées de manière terminale, vers des cellules T capables de répondre efficacement et durablement à un agent pathogène. Pauken et collègues ont montré que les cellules T « revigorées » par anti-PD-1 ne l'étaient que transitoirement, et ce car les marques épigénétiques associées à l'épuisement lymphocytaire T n'étaient que très peu modifiées par le traitement².

Ces différentes constatations ouvrent de nouvelles pistes de recherche concernant les implications de l'ELT dans les complications liées à la sur-immunosuppression post greffe:

- D'une part, plusieurs pathologies virales chroniques pourraient faire intervenir un mécanisme d'épuisement lymphocytaire T permettant d'expliquer les différentes trajectoires observées en pratique clinique. Alors que le VHB et le VHC, sur lesquels le rôle de l'ELT a été montré ne représentent plus actuellement un enjeu clinique majeur du fait de traitement spécifiques efficaces disponibles, les infections à BK-virus restent responsable de près de 10 % des pertes de greffon¹¹. Alors que certains patients maintiennent une virémie sans développer de néphropathie à BK-virus cliniquement significative, d'autres évoluent après un temps aléatoire vers une perte de greffon liée au virus. Nous avons ainsi collecté de manière prospective les PBMCs de patients transplantés ayant développé successivement une BK-virurie, puis une BK-virémie, puis une néphropathie à BK-virus. Nous souhaitons prochainement étudier l'expression des différents récepteurs inhibiteurs précédemment évoqués, et les réponses fonctionnelles T spécifiques et non spécifiques du BK-virus, afin de définir d'éventuelles signatures pouvant guider les adaptations thérapeutiques en pratique

clinique. L'hépatite E est également un virus pouvant chez l'immunodéprimé induire une répllication chronique responsable de cirrhose¹². A ce jour aucun traitement n'a prouvé de réelle efficacité pour réduire le risque de développement d'une infection chronique, et seule la baisse de l'immunosuppression permet d'éliminer le virus¹². Nous avons collecté de nombreux patients présentant une infection aiguë à VHE, et ayant progressivement évolué vers une forme chronique malgré la baisse protocolaire de l'immunosuppression. Nous espérons pouvoir identifier des signatures basées sur l'expression de récepteurs inhibiteurs sur les lymphocytes T afin de stratifier le risque d'évolution vers une hépatite E chronique.

- La survenue d'un cancer représente une cause majeure de décès post greffe actuellement. Les patients transplantés d'organe solide ont un risque de présenter une néoplasie deux fois supérieure à la population générale¹³. Les cancers viro-induits comme le sarcome de Kaposi, ou les lymphomes EBV-induits sont très significativement augmentés¹³. Cependant d'autres cancers non viro-induits sont également concernés (comme les cancers du rein à cellules claires)¹³. Au-delà des traditionnels facteurs de risque de développer une néoplasie (le tabac au premier plan¹⁴), le rôle de l'immunosuppression est ici majeur. La difficulté quotidienne en clinique s'illustre par l'impossible équilibre entre le maintien d'une immunosuppression afin d'éviter un rejet de greffe, et la baisse de la pression sur le système immunitaire afin de rétablir la vigilance immune antinéoplasique. Nous souhaitons ici proposer l'étude de l'ELT chez des patients greffés nouvellement diagnostiqués pour un cancer, et l'évolution de l'ELT au cours de la prise en charge, afin de guider la prise en charge dans ce contexte.

- La survenue d'infections secondaires après une prise en charge en réanimation reste peu étudiée chez le patient transplanté d'organes. Des modèles murins ont montré que

la survenue d'un premier sepsis grave entraînait une propension à développer une forme grave d'infection chronique du LCMV-clone 13, associée à un phénotype d'ELT par les lymphocytes T CD8+ circulants. Notre groupe a pu précédemment montré une corrélation entre l'expression de certains récepteurs inhibiteurs et une issue défavorable en réanimation¹⁵. Nous souhaitons poursuivre ce travail en étudiant les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles lymphocytaires T de manière dynamique au décours de la prise en charge d'un choc septique chez le transplanté d'organe solide, ainsi que lors de la survenue de complications infectieuses virales et non virales (comme les infections mycotiques aspergillaires ou candidosiques), afin d'extraire des signatures corrélées à des évolutions défavorables qui pourraient nécessiter une prise en charge plus agressive.

Conclusion

Par nos différents travaux, nous avons pu mettre en lumière des arguments plaidant pour la survenue d'un état dysfonctionnel T se rapprochant de la définition proposée pour l'épuisement lymphocytaire T, après greffe rénale. Ces nouvelles données viennent compléter les informations jusqu'à présent peu nombreuses disponibles dans la littérature. Cependant, de nombreux travaux doivent encore être menés afin de mieux comprendre la cinétique d'installation, la profondeur et le rôle de cet état dysfonctionnel. Ceci pourrait permettre à terme d'élaborer de nouveaux outils de suivi du patient transplanté, afin de limiter les complications liées aux périodes de sur ou sous-immunosuppression.