

ANNÉE 2018

N° 32

**MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional

Le 28 septembre 2018

Par **Clara LATEUR**

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

**THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Etude de la population lymphocytaire T CD8 innée chez
l'Homme : l'hypothèse d'une reprogrammation sous l'effet
d'un traitement immunosuppresseur**

Président du jury : Mme Muriel DUFLOS, Professeur de Chimie Organique
Directeur de thèse : M. Jean-Marc GOMBERT, Professeur d'Immunologie
Membres du jury : Mme Sylvie HERMOUET, Maître de Conférences en Hématologie
Mme Florence JACOMET, Praticien Hospitalier en Immunologie

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Muriel Duflos, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

A Monsieur le Professeur Jean-Marc Gombert, pour m'avoir aiguillé tout au long de ce travail et pour votre encadrement au cours de mon internat.

Au Docteur Sylvie Hermouet, pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Au Docteur Florence Jacomet, pour avoir accepté de juger ce travail.

A mes parents et mes sœurs, pour m'avoir soutenue et surtout supportée pendant ces longues années d'étude, merci de votre patience !

A Mathilda, pour avoir été présente pour la plus grande partie de mes études, merci de ton soutien précieux, nos conversations et nos fous rires me manquent.

A Louise, pour m'avoir soutenue lors de la préparation de l'internat et encore après, heureusement que tu étais là !

A Valou, Claire, Paul, Valentin & Julie, pour tous les bons moments passés en amphitheâtre et en dehors.

A Claire, Anaïs, Marion, Dalila et Nina, mes amies d'enfance et de lycée, merci d'être encore là et d'avoir su me changer les idées !

A Anahita (mon chouchou), merci pour ta bonne humeur quotidienne et pour avoir toujours été là pour moi tout au long de l'internat, j'ai hâte de partager notre grande aventure avec Soso et toi !

A mes colocataires de maintenant et d'avant (Soso, Isa, Antoinette, Nesrine, Eliette, Clémence, JB et les autres), ma deuxième famille, merci pour tous les bons moments passés à la maison, quel bonheur d'avoir vécu ces années à vos côtés!

A tous les copains de Jack O' Bear (Marjo & Choupi, Rayou, Beubeu, Paulo, Dédé & Marie, Doudou, Anne-Lise...), je suis si heureuse de vous avoir rencontrés à l'internat, ces moments passés avec vous m'ont tellement apporté...

A mes cointernes, Sophie, Rémi, Clémence, Caro, Céline, Lauranne, Manue, merci de m'avoir accompagnée tout au long de mon internat et pour votre soutien moral.

A Héloïse et Niels, mes copains de M2, c'était bien sympa de passer cette dernière année avec vous.

A André et Alice, pour m'avoir également guidée dans ce travail.

A toute l'équipe du PBS et de l'UBM, merci pour votre bonne humeur et la bonne ambiance que vous amenez.

RESUME

Les lymphocytes T CD8 innés constituent une nouvelle population de lymphocytes T CD8 possédant à la fois des caractéristiques de lymphocytes innés (expression de marqueurs NK et réponse à une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires) et mémoires (expression du facteur de transcription Eomes) et qui sont documentés pour leur arsenal anti-tumoral. Ici, partant de l'observation d'une augmentation de la fréquence des LT CD8 innés chez des patients transplantés rénaux traités par un immunosuppresseur, la ciclosporine, par rapport aux donneurs sains, nous émettons l'hypothèse d'une reprogrammation des LT CD8 naïfs en LT CD8 innés par acquisition de l'expression d'Eomes, sous l'effet de la ciclosporine. Pour éprouver cette hypothèse, les LT CD8 innés de patients transplantés rénaux traités par ciclosporine ont été analysés (prolifération cellulaire, activation, épuisement et statut fonctionnel) et des cultures cellulaires de LT CD8 de donneurs sains ont été réalisées en présence de ciclosporine. Les résultats obtenus *ex vivo* confirment l'augmentation de la fréquence des LT CD8 innés en présence de ciclosporine chez les patients, parallèlement à une diminution des LT CD8 naïfs, et nous montrons que les LT CD8 innés sont fonctionnels en présence de ciclosporine. De manière remarquable, les résultats obtenus *in vitro* corroborent ceux obtenus *ex vivo*. Un troisième compartiment cellulaire s'est distingué chez les patients lors de cette étude, caractérisé par l'expression de récepteurs KIRs et l'absence d'expression d'Eomes, dont la prolifération est augmentée et qui exprime faiblement PD-1, pouvant correspondre à un compartiment transitionnel lors de la différenciation des LT CD8 naïfs en LT CD8 innés. L'objectif secondaire de cette étude était de rechercher l'existence d'une signature des LT CD8 innés chez les patients avec un cancer comparativement aux patients sans cancer, l'immunosuppression étant un facteur favorisant l'apparition de cancer chez les patients transplantés. Nos résultats n'ont pas permis de faire la distinction entre les LT CD8 innés des patients sans cancer par rapport aux patients avec un cancer. Cette étude a permis d'apporter de nouvelles données concernant les LT CD8 innés chez l'Homme, en particulier dans une nouvelle situation pathologique qui combine la greffe rénale et le cancer.

SOMMAIRE

Introduction	1
1. Caractéristiques des lymphocytes T CD8 innés	1
1.1. Les LT CD8 « innés mémoires » murins	1
1.2. Les LT CD8 innés humains	2
1.2.1. Découverte et caractéristiques	2
1.2.2. Différenciation des LT CD8 innés	3
1.2.3. Fonctions des LT CD8 innés	4
2. Transplantation rénale et immunosuppression	5
2.1. Physiopathologie du rejet de greffon	5
2.2. La prévention du rejet de greffon	6
2.2.1. Les voies moléculaires de l'activation des LT	6
2.2.2. Les traitements immunosuppresseurs	7
2.2.3. Immunosuppression et cancers	9
2.3. La cohorte ELITE : immunosuppression et LT CD8 innés	10
3. Hypothèses et objectifs	10
Matériel et méthodes	12
1. Patients et donneurs sains	12
2. Culture cellulaire et tests fonctionnels	12
3. Cytométrie en flux	12
4. Analyses statistiques	14
Résultats	15
1. Etude <i>ex vivo</i> des différents compartiments cellulaires Eomes/KIRs au sein des LT CD8+ chez les patients et les donneurs sains	15
1.1. Fréquences des compartiments cellulaires Eomes/KIRs	15
1.2. Prolifération des compartiments cellulaires Eomes/KIRs	15
1.3. Expression de PD-1 à la surface des compartiments cellulaires Eomes/KIRs	17
1.4. Expression du marqueur précoce d'activation CD69 à la surface des compartiments cellulaires Eomes/KIRs	18
1.5. Expression de la perforine et de l'IFN- γ par les compartiments cellulaires Eomes/KIRs	20
1.6. Existence d'une corrélation inverse entre le nombre de lymphocytes T totaux et la fréquence de LT CD8 innés chez les patients	22
2. Modélisation <i>in vitro</i> des effets de la CsA sur la génération des LT CD8 innés	23
2.1. La CsA favorise la génération des LT CD8 innés	23
2.2. Effets de la CsA sur les autres compartiments cellulaires Eomes/KIRs	24
Discussion	25
Conclusion	29
Bibliographie	30
Annexe	32

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
AP-1 : activator protein-1
Aza : azathioprine
CCR7 : C-C chemokine receptor type 7
CD : cluster de différenciation
CHU : centre hospitalier universitaire
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMN : cellules mononucléées
CNI : calcineurine inhibitor
CsA : ciclosporine
CPA : cellules présentatrices d'antigènes
DMSO : diméthylsulfoxyde
DS : donneur sain
DSA : donor specific antibodies
EMRA : effecteur mémoire exprimant le marqueur RA
Eomes (E) : eomesodermin
FKBP : FK binding protein
FMO : fluorescence minus one
FSC : forward scatter
HLA : human leukocyte antigen
IFN : interféron
IgIV : immunoglobulines intraveineuses
I κ B : inhibitor of kappa B
IKK : I κ B kinase
IL : interleukine
IM : inné mémoire
iNKT : invariant natural killer T cell
ITK : inducible T cell kinase
JNK : c-Jun N-terminal kinase
KIR (K) : killer cell immunoglobulin-like receptor
LMC : leucémie myéloïde chronique
LT : lymphocyte T
MAPK : mitogen-activated protein kinase
mTOR : mammalian target of rapamycin
NFAT : nuclear factor of activated T cells
NF κ B : nuclear factor-kappa B
NK : natural killer
NKT : natural killer T cell
PD-1 : programmed cell death-1
PI3K : phosphoinositide 3-Kinase
PLZF : promyelocytic leukemia zinc finger
PD-L1/L2 : programmed cell death ligand 1 and 2
RLK : resting lymphocyte kinase
SAL : sérum anti-lymphocytaire
SSC : side scatter
SVF : sérum de veau foetal
TCR : T cell receptor
TNF- α : tumor necrosis factor alpha
VM : virtuel mémoire

Introduction

L'un des paradigmes de la réponse immune est sa division en deux grandes branches : l'immunité innée et l'immunité adaptative, chacune comprenant des types cellulaires différents collaborant entre eux. Récemment, une nouvelle population immunitaire intermédiaire a été mise en évidence, représentée par les lymphocytes T (LT) CD8 innés. Les LT CD8 innés possèdent des caractéristiques à la fois de l'immunité adaptative (phénotype de cellules mémoires) et de l'immunité innée (réponse rapide à une stimulation de type inné par des cytokines pro-inflammatoires), et auraient un rôle dans l'immunité anti-infectieuse et possiblement dans l'immunité anti-cancéreuse.

1. Caractéristiques des lymphocytes T CD8 innés

1.1 Les LT CD8 « innés mémoires » murins

La population de LT CD8 innés a d'abord été découverte chez la souris dans les années 2000 avec la dénomination « inné mémoire » (CD8 IM). Ces cellules ont ainsi été dénommées car elles possèdent un phénotype mémoire sans stimulation préalable par un antigène et sont capables de sécréter rapidement des cytokines en grandes quantités en réponse à des *stimuli* de type inné, sans engagement du TCR (pour « T cell receptor »). Leur existence a été mise en évidence chez des souris déficientes pour la protéine kinase ITK (pour « inducible T cell kinase ») chez lesquelles le développement des LT CD8 conventionnels est altéré et la fréquence des LT CD8 IM augmentée. Les kinases ITK et RLK (pour « resting lymphocyte kinase ») appartiennent à la famille des Tec kinases impliquées dans la signalisation en aval du TCR et joueraient un rôle dans les sélections positive et négative des thymocytes. Il a été proposé que la force du signal du TCR au cours du développement thymique des lymphocytes déterminerait leur différenciation en LT conventionnels ou LT innés (Prince et al., 2009), un faible signal favorisant la différenciation en LT innés. La signature principale de ces cellules est l'expression élevée (br) du facteur de transcription Eomesodermin (Eomes ou E) de la famille T-box, impliqué dans la différenciation des LT CD8 mémoires (les LT CD8 déficients en Eomes sont capables de subir une prolifération clonale primaire en réponse à un antigène mais sont incapables de survivre à long terme (Banerjee et al., 2010)). L'expression d'Eomes par les LT CD8 IM est associée à l'expression de CD122 (chaîne β commune des récepteurs de l'interleukine (IL)-2 et de l'IL-15). Ces LT CD8 particuliers ont été décrits plus tard dans la rate et les organes lymphoïdes périphériques

et ont été dénommés virtuels mémoires (VM). L'expression de l'intégrine CD49d (une sous-unité $\alpha 4$ intégrine) par les LT CD8 IM est utilisée pour les distinguer des LT CD8 VM (Haluszczak et al., 2009). Les LT CD8 IM possèdent des fonctions cytotoxiques de type inné car ils sont capables de produire l'interféron (IFN)- γ après stimulation par le couple de cytokines pro-inflammatoires IL-12/IL-18 et sont susceptibles de contrôler une infection à *Listeria monocytogenes in vivo* en l'absence d'antigène spécifique des LT CD8 IM (Hu et al., 2007).

1.2 Les LT CD8 innés humains

1.2.1. Découverte et caractéristiques

Simultanément, des études ont montré l'existence d'une population lymphocytaire similaire chez l'Homme, exprimant des marqueurs de LT conventionnels comme CD8, CD3 et TCR- $\alpha\beta$, et des marqueurs de cellules NK comme les récepteurs KIR, NKG2D et CD56. Ces LT CD8⁺ KIR⁺ possèdent un phénotype effecteur mémoire de différenciation terminale (EMRA) CD45RA⁺ CCR7⁻ et ont un répertoire TCR restreint (Björkström et al., 2012). Mon laboratoire d'accueil a montré que les LT CD8⁺ KIR⁺ ou NKG2A⁺ exprimaient préférentiellement Eomes et que les LT CD8⁺ KIR/NKG2A⁺ Eomes⁺ avaient un phénotype EMRA et partageaient des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles avec les LT CD8 IM murins (Jacomet et al., 2015). Chez l'Homme, 60-70% des LT CD8 produisant l'IFN- γ en réponse au couple IL-12/IL-18 sont des cellules Eomes⁺KIR/NKG2A⁺, et la stimulation de type inné par les cytokines IL-12/IL-18 semble plus efficace que la stimulation du TCR par les anticorps monoclonaux anti-CD3 et anti-CD28 pour la sécrétion d'INF- γ . Ces cellules contiennent des molécules cytotoxiques (perforine et granzyme B) et expriment le CD107a qui est un marqueur de dégranulation en réponse à une stimulation par des anticorps anti-CD16 (Jacomet et al., 2015). La présence de LT CD8⁺ Eomes⁺ KIR/NKG2A⁺ dans le sang de cordon est un argument de plus en faveur de l'origine innée de ces lymphocytes car le sang de cordon est normalement dépourvu de tout antigène susceptible de stimuler les lymphocytes. Ces LT CD8 possédant des marqueurs innés (KIR, NKG2A, CD56) et la capacité à répondre à des *stimuli* de type inné chez l'Homme appartiennent à la famille des LT innés et ont été dénommés LT CD8 innés. En se basant sur les marqueurs utilisés chez la souris pour identifier les LT CD8 IM, le marqueur CD49d a été étudié chez l'Homme pour isoler les LT CD8 innés. Les résultats obtenus au laboratoire montrent que le CD49d est exprimé par plus de 70% des LT CD8⁺ KIR/NKG2A⁺ Eomes⁺ alors qu'une faible fraction des LT CD8 totaux l'exprime (environ 30%), et la majorité des cellules exprimant fortement le CD49d exprime

aussi l'IFN- γ en réponse à une stimulation par l'IL-12 et l'IL-18 (**Figure 1**). Cependant, l'expression de CD49d doit uniquement être évaluée au sein des cellules KIR/NKG2A⁺Eomes⁺ car seules 20 à 40% des cellules CD49d⁺ parmi les LT CD8⁺ sont des LT CD8 innés.

1.2.2. Différenciation des LT CD8 innés

La présence de LT CD8 de phénotype mémoire dans le thymus et la rate de fœtus murins et humains (Min et al., 2011) est en faveur d'une voie alternative de différenciation de ces cellules puisque le fœtus est considéré comme étant dépourvu de microbiote digestif et d'antigènes étrangers. Plusieurs facteurs ont été identifiés pour leur rôle dans la différenciation des LT CD8 IM chez la souris, parmi lesquels l'IL-4 sécrétée par les cellules exprimant le facteur de transcription PLZF (pour « promyelocytic leukemia zinc finger ») que sont les iNKT (pour « invariant natural killer T cell ») (Weinreich et al., 2010), qui constituent une sous-population des NKT, lymphocytes T particuliers exprimant des marqueurs de surface de type NK. Les iNKT expriment un TCR invariant restreint au CD1d (molécule de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I non classique présentant des glycolipides). L'IL-4 sécrétée par les iNKT favoriserait l'expression d'Eomes (Weinreich et al., 2010). Les IFN de type I tels que l'IFN- α et l'IFN- β induisent également l'expression d'Eomes et le développement de LT CD8 IM chez la souris (Martinet et al., 2015). Enfin, chez la souris, l'homéostasie des LT CD8 IM et VM est sous le contrôle de l'IL-15 en l'absence de lymphopénie (Sosinowski et al., 2013).

La lymphopénie physiologique en période néonatale semble en outre favoriser la prolifération homéostatique des LT CD8 issus du thymus chez la souris, qui acquièrent un phénotype mémoire en l'absence d'infection, permettant d'équiper le système immunitaire adulte de cellules T CD8 pré-activées susceptibles d'initier une réponse immune rapide chez l'adulte (Schüler et al., 2004). Chez l'Homme, peu d'études se sont intéressées aux facteurs de différenciation des LT CD8 innés. Les résultats précédemment obtenus dans le laboratoire montrent l'existence d'une corrélation entre l'expression de PLZF dans les iNKT et l'expression d'Eomes dans les LT CD8 innés de sang de cordon (Jacomet et al., 2015), corroborant les données acquises chez la souris. De plus, la présence d'IL-4 en culture *in vitro* permet l'expression d'Eomes dans les LT CD8 humains issus de cellules mononucléées (CMN) ainsi que l'expansion de ces cellules (**Figure 1**), un argument supplémentaire en faveur d'un rôle de l'IL-4 dans le développement des LT CD8 innés (Barbarin et al., 2017).

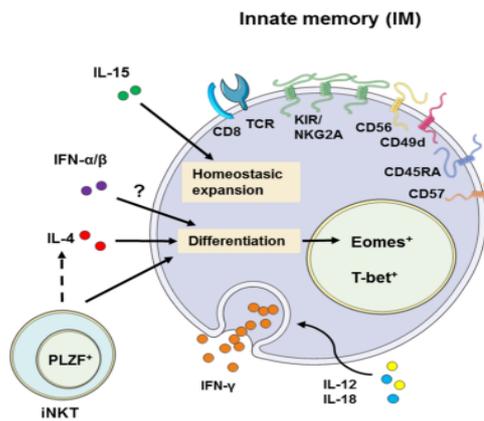


Figure 1 : Les LT CD8 innés

Chez l'Homme, ces cellules sont définies par leur expression des marqueurs membranaires KIR/NKG2A, CD56, CD57, CD45RA et CD49d, et leur expression du facteur de transcription Eomes. Elles sont capables de sécréter l'IFN- γ en réponse à une stimulation par l'IL-12 + IL-18. Leurs développement et homéostasie sont régulés par l'IL-15, l'IL-4 et probablement les IFN de type I.

1.2.3. Fonctions des LT CD8 innés

Comme mentionné ci-dessus, la fonction des LT CD8 innés a surtout été étudiée dans les modèles infectieux (rôle protecteur au cours des infections bactériennes à *Listeria monocytogenes* chez la souris). La présence des LT CD8 innés au cours de la période néonatale permettrait d'engendrer une réponse immunitaire rapide lors de futures infections. Le laboratoire s'est intéressé au rôle de ces LT CD8 innés dans le cancer, en particulier au cours de la leucémie myéloïde chronique (LMC). En effet, ces cellules pourraient avoir des propriétés anticancéreuses liées à leur cytotoxicité de type inné. Il a ainsi été démontré au laboratoire que les LT CD8 innés étaient déficients en nombre et en fonction au diagnostic de la LMC et qu'ils étaient restaurés chez les patients en rémission traités par des inhibiteurs de tyrosine kinase, tels que l'Imatinib, le Dasatinib ou le Nilotinib, en association ou non avec l'IFN- α . Au diagnostic de LMC, le nombre de LT CD8 innés chez les patients est significativement diminué par rapport aux donneurs sains, et ce déficit est associé à une perte d'expression de l'IFN- γ après stimulation par le couple IL-12/IL-18 et un défaut de dégranulation après stimulation par un anticorps monoclonal anti-CD16. Ces fonctions cytotoxiques sont restaurées, au moins en partie, chez les patients en rémission complète (Jacomet et al., 2017). De plus, il semble exister un axe iNKT/LT CD8 innés puisqu'il existe une corrélation entre l'expression d'Eomes au sein des LT CD8 innés et l'expression de PLZF par les iNKT. L'expression d'IL-4 par les iNKT des patients atteints de LMC est également diminuée au diagnostic et restaurée chez les patients en rémission (Rossignol et al., 2012). Ce défaut d'expression d'IL-4 des iNKT pourrait en partie expliquer le déficit en LT CD8 innés puisque l'on sait que l'IL-4 participe à la différenciation des LT CD8 innés en favorisant l'expression d'Eomes. Une perte de sensibilité à l'IL-15 pourrait aussi expliquer la baisse de LT CD8 innés chez les patients au diagnostic, comme cela a été montré au laboratoire (Barbarin et al., 2017). En vue de déterminer si ces observations portant sur les LT CD8 innés

pouvaient s'appliquer au cancer en général, cette population cellulaire a été étudiée dans des cancers solides tels que le cancer du sein et le cancer de l'ovaire. Dans le cancer du sein, il a été mis en évidence la présence de LT CD8 innés dans les ganglions drainant la tumeur. Dans le cancer de l'ovaire, les LT CD8 innés sont observés dans la tumeur, la carcinose péritonéale, qui est une métastase proximale de la tumeur, et le liquide d'ascite. De plus, la fréquence de LT CD8 innés s'est avérée plus élevée au sein de la tumeur primitive qu'au sein de la carcinose (Barbarin et al., 2017). Par ailleurs, une corrélation a été trouvée entre l'expression d'Eomes dans les LT CD8 innés et l'expression de PLZF dans les iNKT, comme dans la LMC (Barbarin et al., 2017). Les LT CD8 innés sont donc présents au sein des tumeurs mais leur rôle dans l'immunité anticancéreuse reste à définir. Se pose également la question d'un possible épuisement de ces cellules, c'est-à-dire une incapacité à répondre aux *stimuli* extérieurs, induisant une tolérance, comme c'est le cas pour les LT CD8 conventionnels présents au sein des tumeurs, laquelle peut être recherchée et attestée par l'expression augmentée du marqueur membranaire PD-1 (pour « programmed cell death-1 »)

2. Transplantation rénale et immunosuppression

La transplantation rénale améliore de façon importante la qualité de vie et diminue la morbi-mortalité chez les patients atteints d'insuffisance rénale terminale par rapport au traitement de suppléance que constitue la dialyse (Oniscu et al., 2004). Le nombre total de candidats à une greffe rénale a atteint 17 698 en 2016 en France.

La transplantation rénale est de loin la plus réalisée avec 3615 greffes en France en 2016, ce nombre étant en constante augmentation.

Le principal défi à surmonter en greffe rénale est le rejet du greffon, lequel est causé par une réponse immunitaire du receveur dirigée contre des alloantigènes du donneur. Les alloantigènes peuvent être des antigènes de groupe sanguin ABO et/ou du système HLA (pour « human leukocyte antigen ») en cas de greffe ABO ou HLA incompatible entre donneur et receveur, la concordance parfaite entre les groupes HLA du donneur et du receveur étant quasi impossible à obtenir.

2.1 Physiopathologie du rejet de greffon

La réponse immunitaire déclenchée par la présence de molécules HLA étrangères (du « non soi ») dans le greffon est de type adaptative, et est médiée par les lymphocytes T et/ou les anticorps.

La physiopathologie de la greffe comprend les trois types de rejets suivants :

- Le rejet suraigu, médié par les anticorps préexistants chez le receveur avant la greffe et dirigés contre les antigènes de groupe sanguin ou les molécules de CMH étrangers (anticorps naturels ou immuns pour le groupe ABO ou anticorps immuns pour le CMH, acquis après une transfusion, une ancienne greffe, ou encore une grossesse...). Quelques minutes seulement après la transplantation, l'endommagement de l'endothélium du greffon entraîne la formation d'un caillot qui asphyxie le greffon.
 - Le rejet aigu, dû à l'intervention des LT CD4⁺ et CD8⁺ du receveur qui reconnaissent les molécules du CMH du « non soi » présentées par des CPA (pour « cellules présentatrices d'antigènes»). Les CPA peuvent être celles du donneur (présentes dans le greffon) ou du receveur. Ce processus se met en place au bout de quelques jours ou semaines.
 - Le rejet chronique qui correspond à l'artériosclérose des vaisseaux sanguins du greffon et qui a pour origine immunologique le développement progressif d'anticorps spécifiques du greffon (DSA pour « donor specific antibodies ») ou de lymphocytes T dirigés contre les cellules endothéliales du greffon, aboutissant à une fibrose qui réduit le diamètre des vaisseaux et finit par asphyxier le greffon. Le rejet chronique peut survenir des mois à des années après la transplantation et est associé à une perte progressive de la fonction du greffon.
- Outre le rejet chronique, la perte du greffon peut également être liée aux effets toxiques du traitement immunosuppresseur, dans ce cadre la toxicité rénale des inhibiteurs de calcineurine est bien documentée (Bennett et al., 1996) et (Peters et al., 1993)), aux conséquences tardives des lésions d'ischémie-reperfusion, aux infections causées par l'immunosuppression et à la réémergence de la pathologie ayant causé la perte de l'organe original. Le plus souvent la perte du greffon est secondaire à la sommation de plusieurs de ces événements.

2.2. La prévention du rejet de greffon

2.2.1. Les voies moléculaires de l'activation des LT

Les LT CD8 étant au cœur de la physiopathologie des rejets aigus et chroniques, il est important de comprendre les mécanismes de leur activation et les acteurs moléculaires impliqués. Plusieurs cascades d'activation sont déclenchées lors de l'activation des LT. La reconnaissance de l'antigène par le TCR du LT constitue le signal 1 et l'interaction des

molécules de co-stimulation CD80/CD86 sur la CPA avec CD28 sur le LT constitue le signal 2. Les signaux 1 et 2 déclenchent plusieurs voies de signalisation (**Figure 2**):

- la voie de la calcineurine, phosphatase activée par le calcium et responsable de la déphosphorylation du facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT), qui migre alors jusqu'au noyau cellulaire pour activer la transcription des gènes codant l'IL-2 (Stepkowski, 2000) ;
- la voie Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) aboutissant à l'activation du facteur de transcription AP-1 (formé des deux facteurs de transcription Jun et Fos) participant aussi à la synthèse de l'IL-2 ;
- la voie IKK/NFκB dans laquelle la phosphorylation de IκB entraîne sa dégradation et la libération de NFκB, pouvant alors transloquer dans le noyau et transcrire de nombreux gènes dont celui codant l'IL-2 (Gorentla and Zhong, 2012).

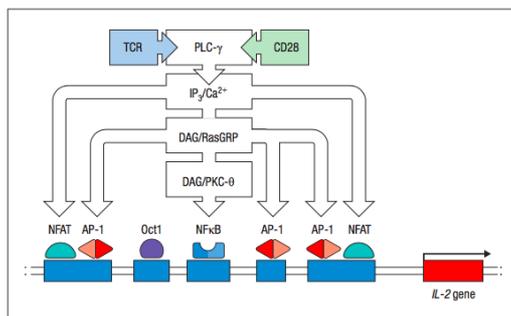


Figure 2 : Voies de signalisation activées après stimulation du TCR.

Les voies de signalisation aboutissant à l'activation des trois facteurs de transcription NFAT, NFκB et AP-1 conduisent à la prolifération cellulaire *via* la transcription du gène codant pour l'IL-2.

D'après K. Murphy et C. Weaver, Janeway's Immunology (2016).

L'IL-2 ainsi produite se fixe sur son récepteur CD25 à la surface des LT, déclenchant le signal 3 qui permet l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR, entraînant la prolifération cellulaire.

2.2.2. Les traitements immunosuppresseurs

Pour diminuer le risque de rejet, les traitements suivants ciblant certains acteurs de ces voies de signalisation peuvent être utilisés :

- Les glucocorticoïdes qui sont largement utilisés en transplantation et qui agissent notamment en bloquant les facteurs de transcription AP-1 et NFκB, inhibant la synthèse de certaines cytokines (IL-2, IFN-γ, TNF-α (pour « tumor necrosis factor »)) et la prolifération lymphocytaire T ;
- L'azathioprine qui fait partie des immunosuppresseurs de première génération analogue bases puriques. Elle est métabolisée en 6-mercaptopurine qui est le principe actif du médicament, interférant avec la synthèse des acides nucléiques ;

- Les inhibiteurs de la calcineurine (CNI) qui comprennent la Ciclosporine A (CsA) et le Tacrolimus :
 - La CsA a révolutionné la transplantation rénale. D'abord isolée et identifiée en 1973 à partir d'un extrait de champignon, *Tolypocladium inflatum*, par des industriels suisses de chez Sandoz, elle est depuis 1980 synthétisée chimiquement. Premier immunosuppresseur ciblant spécifiquement les LT, elle a permis d'améliorer grandement la durée de survie des greffons tout en minimisant les effets secondaires liés à la myélosuppression induite par l'Azathioprine jusqu'alors utilisée.

La CsA agit sur les trois voies de signalisation mentionnées ci-dessus. Elle pénètre dans les LT et se lie à son immunophiline intracytoplasmique, la cyclophiline. Le complexe cyclophiline/CsA inhibe l'activité phosphatasique de la calcineurine dans les LT activés, empêchant ainsi la déphosphorylation de NFAT et sa migration dans le noyau (**Figure 3**). La calcineurine est aussi impliquée dans la dégradation de I κ B, ce qui libère NF κ B. L'inhibition de la calcineurine aboutit donc à l'inhibition de l'activité de NF κ B. De plus, la CsA inhibe les kinases JNK (pour « c-Jun N-terminal kinase ») et p38, appartenant toutes deux à la famille des MAPK et régulant l'activité du complexe AP-1, indépendamment de la calcineurine. Ces mécanismes d'action aboutissent à l'inhibition de la synthèse d'IL-2, bloquant la prolifération lymphocytaire T, et aussi celle de l'IFN- γ (Barbarino et al., 2013).

 - Le Tacrolimus, ou FK506, se lie à FKBP (pour « FK binding protein ») et le complexe inhibe l'activité phosphatasique de la calcineurine de manière similaire au complexe cyclophiline/CsA.
- D'autres immunosuppresseurs ciblant spécifiquement les LT peuvent être utilisés en transplantation rénale, comme les inhibiteurs de mTOR (Sirolimus, Everolimus), les inhibiteurs de la synthèse de nucléotides (Mycophénolate Mofétil, Léflunomide), les anticorps anti-CD25 (Basiliximab, Daclizumab), le CD25 étant une des trois chaînes (chaîne α) composant le récepteur de l'IL-2 (**Figure 3**).

Les patients candidats à une greffe de rein porteurs d'anticorps anti-HLA, secondaires à une grossesse ou à une transplantation rénale antérieure ont un risque élevé de rejet. La prise en charge de ces patients dits à « risque immunologique » sera prévenu, outre les traitements immunosuppresseurs conventionnels, par une plasmaphérese préalable à la transplantation ou par l'injection d'immunoglobulines intraveineuses (IgIV). De plus ces patients peuvent bénéficier de l'utilisation d'un anti-CD25 tel que le Basiliximab ou de globuline de lapin anti-

thymocytes, aussi dénommée sérum anti-lymphocytaire (SAL) (Djamali et al., 2014). Les anticorps anti-CD20 comme le Rituximab peuvent aussi être utilisés en cas de rejet suraigu d'origine humorale.

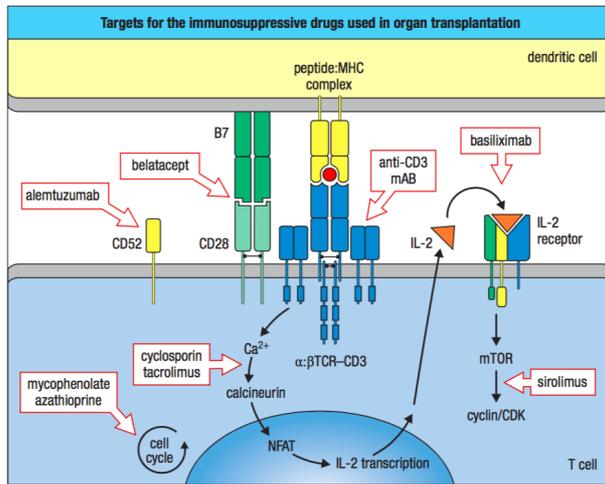


Figure 3: Les immunosuppresseurs agissent aux différents stades d'activation des LT.

La CsA interfère avec la translocation de NFAT dans le noyau par inhibition de la calcineurine.

D'après K. Murphy et C. Weaver, Janeway's Immunology (2016).

2.2.3. Immunosuppression et cancers

L'une des situations pour laquelle est observée une augmentation significative de la fréquence des cancers est la transplantation rénale. Les traitements immunosuppresseurs indispensables à la tolérance du greffon présentent des effets secondaires majeurs notamment liés à l'immunosuppression qu'ils induisent. Les infections sont plus fréquentes et l'incidence des cancers chez les patients transplantés est supérieure à celle de la population générale. Le risque augmenté de cancer s'explique à la fois par des dommages causés à l'ADN par les agents immunosuppresseurs, par l'augmentation de la fréquence des infections par des virus oncogènes et évidemment par la baisse de l'immunosurveillance liée au traitement immunosuppresseur, la balance entre la tolérance du greffon et l'apparition de cancers étant difficile à équilibrer. D'après l'étude de Kasiske *et al.* aux Etats-Unis, les mélanomes, leucémies, tumeurs hépatobiliaires, cervicales et vaginales sont cinq fois plus fréquents chez les patients transplantés rénaux par rapport à la population générale. Le cancer du rein est 15 fois plus fréquent et le sarcome de Kaposi, les lymphomes non hodgkiniens et les cancers cutanés non mélanomes sont 20 fois plus fréquents que dans la population générale. Par rapport aux patients dialysés, on note essentiellement une augmentation de la fréquence des cancers de la peau non mélanomes, des mélanomes, des lymphomes non Hodgkiniens, des sarcomes de Kaposi et des cancers de la bouche et du rein chez les patients transplantés (Kasiske et al., 2004).

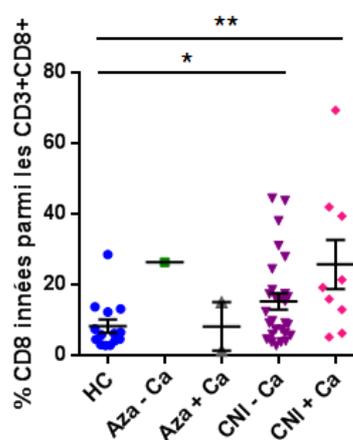
2.3. La cohorte ELITE : immunosuppression et LT CD8 innés

Afin de diminuer l'incidence des cancers chez les patients transplantés traités par immunosuppresseurs, une diminution progressive de l'immunosuppression peut être envisagée. Un essai clinique français a comparé l'impact d'un traitement à long terme par CsA à dose normale ou à faible dose chez les patients transplantés rénaux et a observé une moindre fréquence de cancers chez les patients sous CsA à faible dose (66% des cancers étaient des cancers cutanés), sans diminution de survie et de fonction du greffon (Dantal et al., 1998).

La cohorte ELITE constituée au CHU de Poitiers et étudiée par mon équipe d'accueil inclut des patients transplantés rénaux depuis au moins 10 ans, sans perte de fonction du greffon et ayant une immunosuppression minimisée (inhibiteur de calcineurine à faible dose ou azathioprine et glucocorticoïdes à faible dose). L'étude des populations immunitaires dans le sang périphérique chez ces patients a permis d'observer une augmentation significative de la fréquence des LT CD8 innés chez les patients traités par inhibiteurs de la calcineurine (majoritairement la CsA), indépendamment de la survenue de cancer, par rapport aux donneurs sains (données non publiées et **Figure 4**).

Figure 4: Fréquence des LT CD8 innés chez les patients de la cohorte ELITE.

Représentation de la fréquence de LT CD8 innés chez des donneurs sains (HC), des patients sous azathioprine (Aza) et des patients sous inhibiteurs de calcineurine (CNI), avec (+Ca) ou sans (-Ca) cancer. Le test non paramétrique de Mann et Whitney en séries non appariées a été utilisé (moyenne \pm écart-type). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.



3. Hypothèses et objectifs

Les LT CD8 innés semblent pouvoir être impliqués dans l'immunité anti-cancéreuse et il est admis que les traitements immunosuppresseurs favorisent l'apparition de cancers. Or, nous sommes en la présence d'une cohorte de patients dans laquelle a été observée une augmentation de la fréquence de LT CD8 innés chez les patients sous inhibiteurs de la calcineurine comparativement aux donneurs sains.

L'hypothèse principale formulée est donc celle d'un effet de l'immunosuppression, en particulier la CsA, sur les LT CD8 innés chez les patients transplantés rénaux. Pour y

répondre, leur fréquence sera étudiée à travers l'expression d'Eomes et des récepteurs KIRs/NKG2A par les LT CD8⁺, la prolifération cellulaire par l'expression du marqueur intranucléaire Ki67, leur état d'activation et d'épuisement, respectivement par l'expression des molécules de surface CD69 et de PD-1 respectivement, et enfin leur fonctionnalité par l'expression de la perforine et la capacité de sécrétion de l'IFN- γ .

Ces différents aspects seront évalués *ex vivo* chez les patients de la cohorte ELITE en comparaison à des donneurs sains et par modélisation *in vitro* par culture cellulaire de LT CD8⁺ de donneurs sains en présence ou non de CsA. L'hypothèse secondaire est celle d'une distinction du phénotype cancéreux des patients en fonction de la fréquence des LT CD8 innés dans le sang périphérique et/ou de l'expression des différents marqueurs étudiés.

Matériel et méthodes

1. Patients et donneurs sains

Les cellules mononucléées (CMN) de donneurs sains ont été fournies par l'Etablissement Français du Sang de Lyon et conservées en azote liquide.

Les patients de la cohorte ELITE ont été recrutés dans le service de Néphrologie du CHU de Poitiers (*cf* tableaux récapitulatifs en annexe). Les CMN de patients ont été isolées à partir de prélèvements de sang total par centrifugation en gradient de densité (Histopaque[®]-1077, Sigma-Aldrich), et conservées à -80°C dans du RPMI avec 50% de sérum de veau fœtal (SVF) et 10% de DMSO (pour « diméthylsulfoxyde »).

Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique Poitou-Charentes ; tous les participants ont signé un consentement éclairé.

2. Culture cellulaire et tests fonctionnels

Les LT CD8⁺ ont été enrichis par tri magnétique positif sur colonne MS (Miltenyi Biotec) à partir de CMN de sujets sains grâce à des billes recouvertes par un anticorps anti-CD8 (CD8 MicroBeads human, Miltenyi Biotec) (20 µL de billes pour 10⁷ cellules). Les LT CD8⁺ (100 000 cellules/200 µL) ont été mis en culture en plaque 96 puits dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF et des antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine) pendant 7 jours à 37°C. L'IL-15 (Miltenyi) a été utilisée à une concentration finale de 20 ng/mL et la CsA (Sigma) à une concentration finale de 100 ng/mL. Les billes de stimulation recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Dynabeads Human T-Activator CD3/28, Thermofisher) ont été ajoutées aux puits de culture à différents ratios cellules/billes (1/1 ; 5/1 ; 10/1 ; 100/1).

Pour la stimulation par IL-12 + IL-18, les CMN de sujets sains ou de patients ont été déposées à 1.10⁶ cellules/ml en plaque 24 puits et incubées pendant 48 heures avec 20 ng/ml de chaque cytokine (IL-12: R&D Systems; IL-18: MBL International). Un inhibiteur du transport des protéines entraînant l'accumulation de l'IFN-γ dans l'appareil de Golgi, le Golgistop (BD Biosciences), a été ajouté lors des 5 dernières heures de culture.

3. Cytométrie en flux

L'analyse des cellules des donneurs sains ou des patients a été effectuée par cytométrie en flux *ex vivo* ou après culture. L'expression des différents marqueurs a été

évaluée en marquant les cellules avec combinaisons appropriées des anticorps suivants :

<u>Anticorps</u>	<u>Fluorochrome</u>	<u>Clone</u>	<u>Fournisseur</u>
anti-TCR- $\alpha\beta$	BV421	IP26	BioLegend
anti-TCR- $\alpha\beta$	AF488	IP26	BioLegend
anti-CD8	PE-Cy7	RPA-T8	BioLegend
anti-CD49d	BV510	9F10	BioLegend
anti-CD49d	APC	9F10	BD Biosciences
anti- PD-1	APC	EH12.2H7	BioLegend
anti- <u>Eomes</u>	PerCP-eF710	WD1928	eBioscience
anti-Eomes	eF660	WD1928	eBioscience
anti- <u>perforine</u>	FITC	sigmaG9	BD Biosciences
anti-CD56	BV421	HCD56	BioLegend
anti-CD69	PerCP-Cy5.5	FN50	BioLegend
anti-Ki67	BV421	Ki-67	BioLegend
anti-CCR7	FITC	150503	RD systems
anti-CD45RA	BV510	HI100	BioLegend
anti-IFN γ	AF488	4S.B3	BioLegend
anti-KIR2D	PE	NKVFS1	Miltenyi Biotech
anti-KIR3DL1/KIR3DL2 (CD158e/k)	PE	5.133	Miltenyi Biotech
anti-NKG2A (CD159a)	PE	REA110	<u>Miltenyi Biotech</u>

Le marquage KIR/NKG2A fait référence au mélange des trois anticorps suivants : anti-KIR2D, anti-KIR3DL1/KIR3DL2 et anti-NKG2A.

Les cellules ont d'abord été marquées par un marqueur de viabilité pour exclure les cellules mortes en utilisant le kit Live/Dead[®] Fixable NearIR Dead Cell Stain (Life Technologies), puis le marquage membranaire a été effectué. Pour le marquage nucléaire d'Eomes et de Ki67 et intracytoplasmique de la perforine, les cellules ont été fixées et perméabilisées avec le kit de marquage anti-Foxp3 humain (eBioscience).

Les acquisitions ont été faites sur un cytomètre 8-couleurs FACSVerse[™] (BD Biosciences) avec le logiciel FACSuite[™] (BD Biosciences) et les données ont été analysées en utilisant le logiciel FlowJo v10.4 (TreeStar, Inc.).

La stratégie de « gating » de la population lymphocytaire T CD8 innée est décrite dans la **Figure 5**.

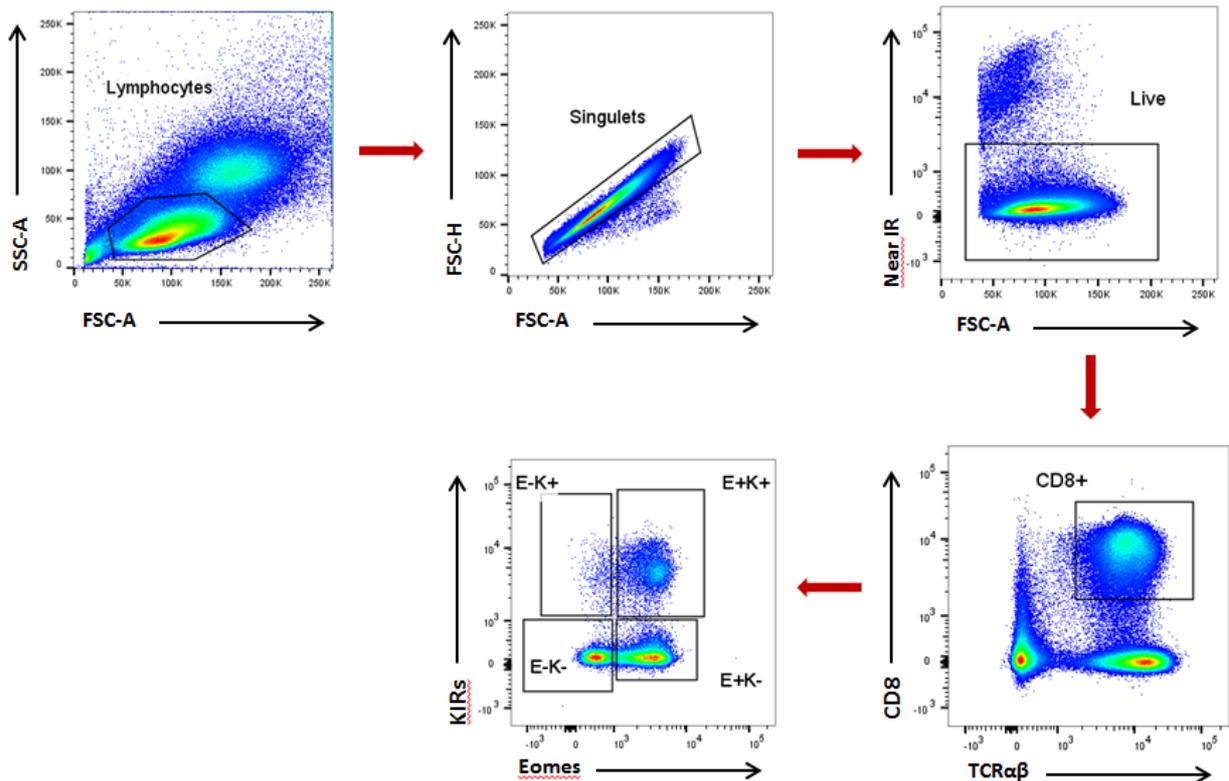


Figure 5 : Stratégie d'analyse en cytométrie en flux et définition de la population T CD8 innée.

Les lymphocytes ont été sélectionnés en fonction de leur taille (FSC-A) et de leur structure (SSC-A), les débris cellulaires et doublets étant éliminés pour ne garder que les singulets (fenêtre FSC-H/FSC-A). Puis ont été sélectionnés parmi les cellules vivantes (fenêtre NearIR/FSC-A), les LT CD8+ (fenêtre TCRαβ/CD8) et les LT CD8 innés ainsi que les autres compartiments cellulaires au sein des CD8 (fenêtre KIRs/Eomes).

4. Analyses statistiques

Les résultats expérimentaux sont exprimés en moyenne \pm écart-type. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant GraphPad Prism version 7.0 (logiciel GraphPad). Les tests non paramétriques de Mann et Whitney en séries non appariées et de Wilcoxon en séries appariées ont été utilisés.

Les valeurs aberrantes ont été exclues en utilisant le test de Grubb à partir du logiciel GraphPad QuickCalcs (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>).

Résultats

1. Etude *ex vivo* des différents compartiments cellulaires Eomes/KIRs au sein des LT CD8⁺ chez les patients et les donneurs sains

1.1. Fréquences des compartiments cellulaires Eomes/KIRs

Des données antérieures du laboratoire avaient montré l'existence d'une augmentation significative de la proportion des LT CD8 innés chez les patients de la cohorte ELITE traités par CsA à faible dose par rapport aux donneurs sains (**Figure 4** et données non illustrées). Dans le but de compléter cette étude, les LT CD8 innés ont ici été analysés par cytométrie en flux au sein des CMN des patients de la cohorte parallèlement aux CMN de donneurs sains. Les LT CD8 innés ont été définis par leur expression du facteur de transcription Eomes (E) et des récepteurs KIR2D, KIR3DL1/KIR3DL2 et NKG2A (K) au sein des LT CD8⁺ TCR- $\alpha\beta$ ⁺. Les résultats obtenus (**Figure 6A**) montrent une élévation significative ($p < 0.05$) de la fréquence (%) des LT CD8 innés (E⁺K⁺) chez les patients traités par CsA à faible dose (moyenne \pm écart-type : $11,8 \pm 9,69$) par rapport aux DS (moyenne \pm écart-type : $5,3 \pm 3,49$). Les autres compartiments cellulaires (définis par l'expression ou non d'Eomes et des KIRs) sont les suivants : E⁻K⁻ (LT CD8⁺ naïfs), E⁺K⁻ (LT CD8⁺ mémoires conventionnels) et E⁻K⁺. Au sein de ces compartiments cellulaires, nous pouvons noter chez les patients une tendance ($p = 0,068$) à l'augmentation de la fréquence (%) des cellules E⁺K⁻ (moyenne \pm écart-type : $46,65 \pm 20,19$ *versus* $34,2 \pm 14,8$ chez les sujets sains) jointe à une diminution significative ($p < 0,01$) de celle des cellules E⁻K⁻ (moyenne \pm écart-type : $31,57 \pm 20,73$ *versus* $54,74 \pm 16,52$ chez les sujets sains), suggérant qu'une reprogrammation des cellules E⁻K⁻ en cellules exprimant Eomes s'opère chez les patients traités par CsA à faible dose.

1.2. Prolifération des compartiments cellulaires Eomes/KIRs

La prolifération cellulaire a été évaluée par la fréquence (%) de cellules exprimant Ki67 dans le noyau cellulaire, celle-ci étant plus élevée dans les cellules en prolifération. Les LT CD8 innés ne prolifèrent pas plus chez les patients que chez les donneurs sains (**Figure 6B**), malgré leur supériorité numérique (**Figure 6A**). Une différence ($p = 0,0579$) du niveau de prolifération s'observe au sein des cellules E⁻K⁺ en faveur des patients (moyenne \pm écart-type : $2,67 \pm 1,18$ pour les patients *versus* $1,34 \pm 0,68$ pour les donneurs sains) (**Figure 6B**). Cette augmentation de fréquence de cellules E⁻K⁺ en prolifération pourrait s'expliquer par l'existence d'un stade transitionnel de différenciation des cellules E⁻K⁻ (compartiment

cellulaire diminué en fréquence chez les patients) en cellules E^+K^+ (compartiment cellulaire augmenté chez les patients), représenté par le compartiment E^-K^+ .

Aucune différence n'est observée entre les patients ayant un cancer et ceux n'en ayant pas, qu'il s'agisse de la fréquence des différents compartiments cellulaires ou de leur prolifération.

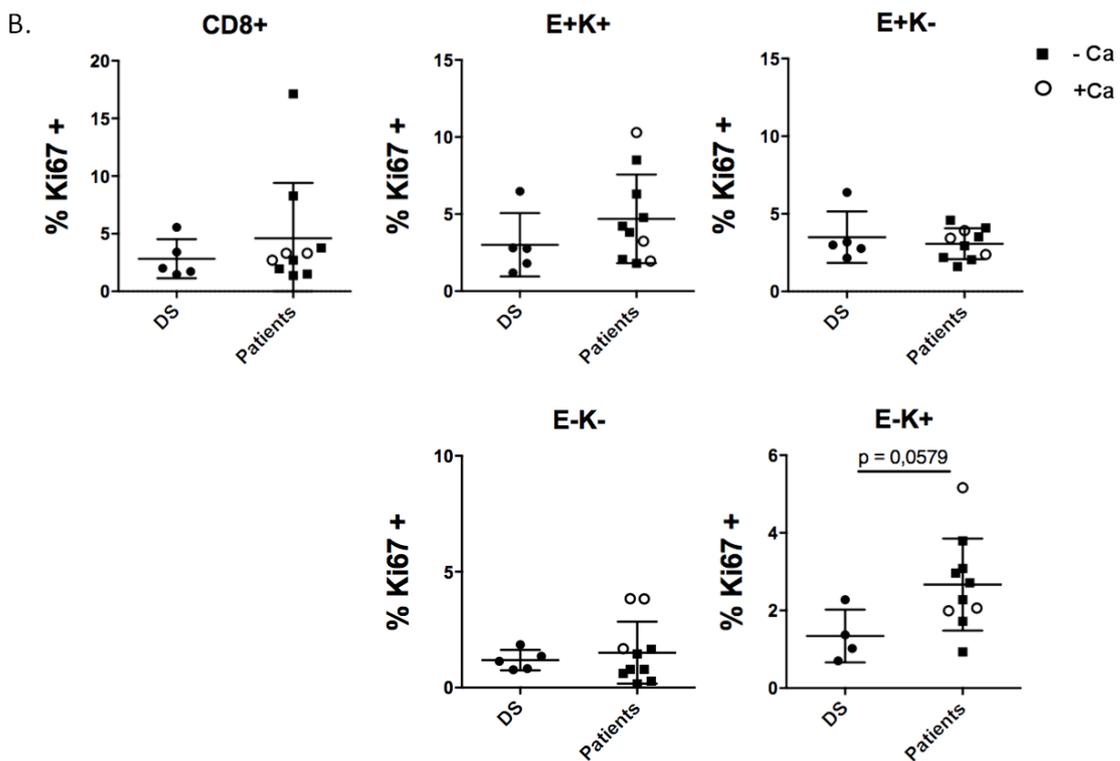
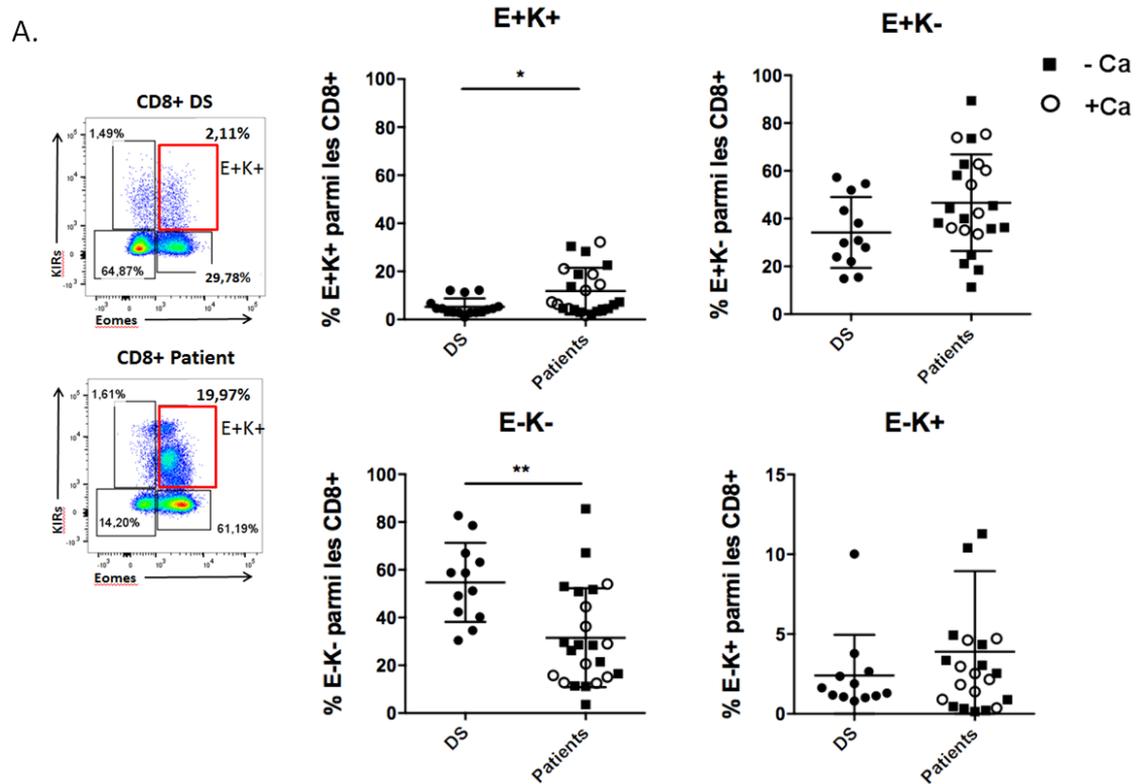


Figure 6 : Analyse de la fréquence et de la prolifération des LT CD8⁺ totaux, des cellules E⁺K⁺, E⁺K⁻, E⁻K⁺ et E⁻K⁻ par cytométrie en flux

A) A gauche, dot plots représentant l'expression des récepteurs KIRs (KIR2D, KIR3DL1/KIR3DL2 et NKG2A) en fonction du facteur de transcription Eomes, au sein des LT CD8⁺, chez un donneur sain et un patient représentatifs. A droite, fréquence des différents compartiments Eomes/KIRs au sein des LT CD8⁺ chez les donneurs sains (DS) (n=16) et les patients avec un cancer (+Ca) (n=9) et sans cancer (-Ca) (n=14).

B) Pourcentage de cellules exprimant Ki67 dans les LT CD8⁺ totaux et les différents compartiments (E⁺K⁺, E⁺K⁻, E⁻K⁺ et E⁻K⁻) chez les donneurs sains (DS) (n=5) et les patients +Ca (n=3) et -Ca (n=7). Le test bilatéral non paramétrique de Mann et Whitney en séries non appariées a été utilisé (moyenne ± écart-type). **p*<0,05, ***p*<0,01. Chaque point correspond à un patient.

1.3. Expression de PD-1 à la surface des compartiments cellulaires Eomes/KIRs

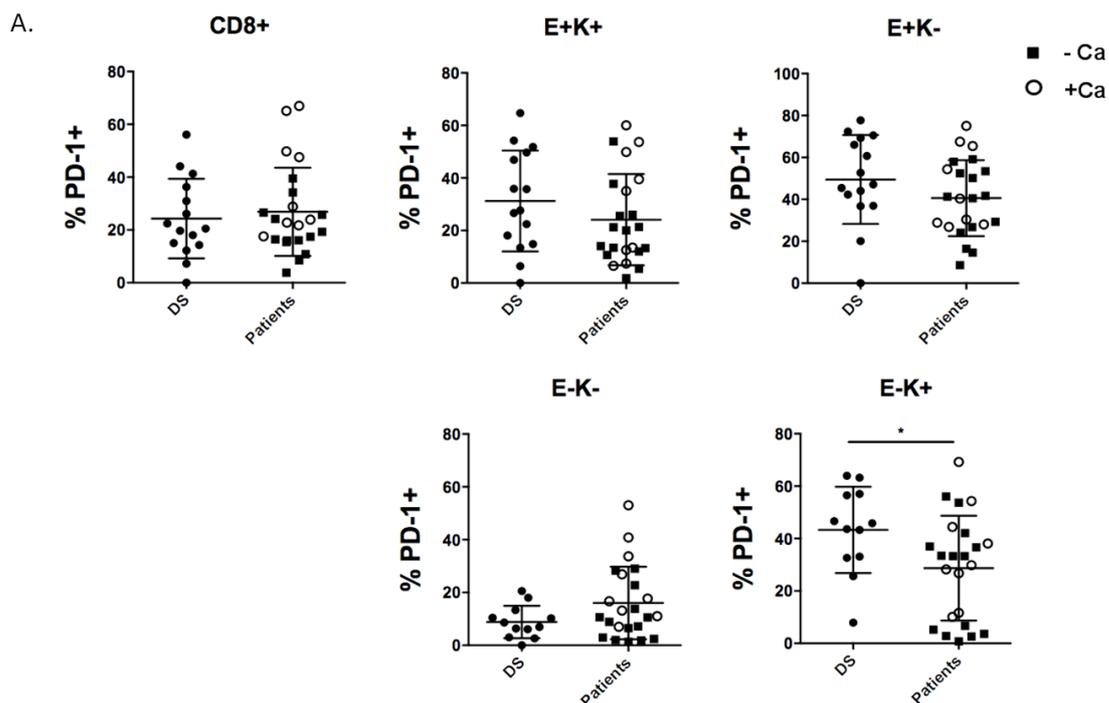
Pour déterminer si les cellules d'intérêt ont des caractéristiques de cellules en épuisement, celles-ci ont été marquées par un anticorps anti-PD-1 (PD-1 étant un marqueur connu pour être exprimé à la surface des cellules épuisées). Les résultats obtenus montrent une fréquence de cellules exprimant PD-1 quasi équivalente chez les patients et les donneurs sains pour toutes les populations cellulaires, excepté pour la population E⁻K⁺ pour laquelle on observe une diminution significative de la fréquence (%) de cellules exprimant PD-1 chez les patients (moyenne ± écart-type : 28,69 ± 20,02) par rapport aux donneurs sains (moyenne ± écart-type : 43,28 ± 16,47) (**Figure 7A**). Il est à noter que les cellules E⁻K⁺ sont celles pour lesquelles nous avons montré précédemment une augmentation significative de la prolifération par rapport aux donneurs sains. PD-1 est un marqueur tardif d'activation cellulaire rendant les cellules sensibles au ligand PD-L1 (l'interaction entre PD-1 et PD-L1 entraîne l'épuisement des cellules exprimant PD-1, empêchant ainsi un « emballement » du système immunitaire). Le compartiment cellulaire E⁻K⁺ se distingue donc chez les patients par une prolifération plus importante et un état d'activation nul ou plus précoce que chez les donneurs sains au vu de l'expression de PD-1.

De plus, on note que la fréquence (%) de cellules E⁻K⁻ exprimant PD-1 est plus élevée chez les patients ayant eu un cancer (+Ca) (moyenne ± écart-type : 24,45 ± 15,39) comparativement à ceux n'ayant jamais eu de cancer (-Ca) (moyenne ± écart-type : 10,59 ± 6,62, *p* < 0,05) et aux donneurs sains (moyenne ± écart-type : 8,86 ± 6,13, *p* < 0,01), ceci en accord avec les données de la littérature rapportant que PD-1 est surexprimé à la surface des lymphocytes T dans certains cancers solides (**Figure 7B**). Une tendance similaire s'observe pour les cellules E⁺K⁺ des patients, dont la fréquence d'expression est plus élevée chez les patients ayant eu un cancer (+Ca) (moyenne ± écart-type : 30,91 ± 21,23) que chez ceux n'en ayant jamais eu (-Ca) (moyenne ± écart-type : 20,46 ± 13,71). En revanche, les LT CD8 innés des donneurs sains expriment également PD-1 de manière plus élevée que les patients

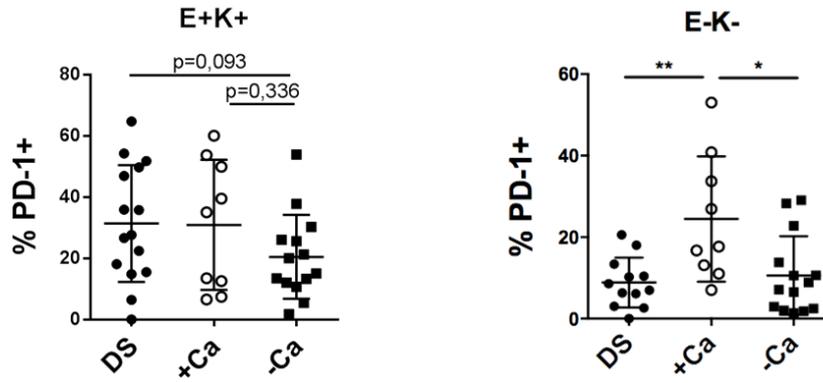
n'ayant jamais eu de cancer (moyenne \pm écart-type : $31,37 \pm 19,07$), la fréquence des cellules exprimant PD-1 étant comparable à celle des LT CD8 innés des patients ayant eu un cancer. Ce résultat montre l'existence d'une régulation négative de PD-1 chez les patients sans cancer plutôt qu'une augmentation de l'expression de PD-1 chez les patients ayant eu un cancer. Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle les LT CD8 innés joueraient un rôle dans l'immunité anti-cancéreuse.

1.4. Expression du marqueur précoce d'activation CD69 par les compartiments cellulaires Eomes/KIRs

L'expression de CD69 reflète l'état d'activation des cellules (CD69 étant un marqueur d'activation lymphocytaire précoce qui apparaît rapidement à la surface après stimulation cellulaire). Les LT CD8 innés ne sont pas plus activés chez les patients que chez les sujets sains au vu de la fréquence (%) similaire de cellules exprimant CD69. Il existe une augmentation de la fréquence de cellules exprimant CD69 au sein du compartiment E⁻K⁻ (moyenne \pm écart-type : $2,92 \pm 3,37$ chez les patients *versus* $1,02 \pm 1,11$ chez les donneurs sains, $p < 0,01$) (**Figure 7C**). Ainsi, ce compartiment E⁻K⁻ se distingue de nouveau, étant plus activé, comme il s'était avéré être diminué en fréquence (**Figure 6A**) chez les patients comparativement aux donneurs sains. Enfin, il n'apparaît pas de différence entre les patients ayant eu un cancer et les patients n'ayant jamais eu de cancer pour l'expression de CD69. La CsA semble donc favoriser l'activation des cellules E⁻K⁻, ceci indépendamment de l'existence ou non d'un cancer.



B.



C.

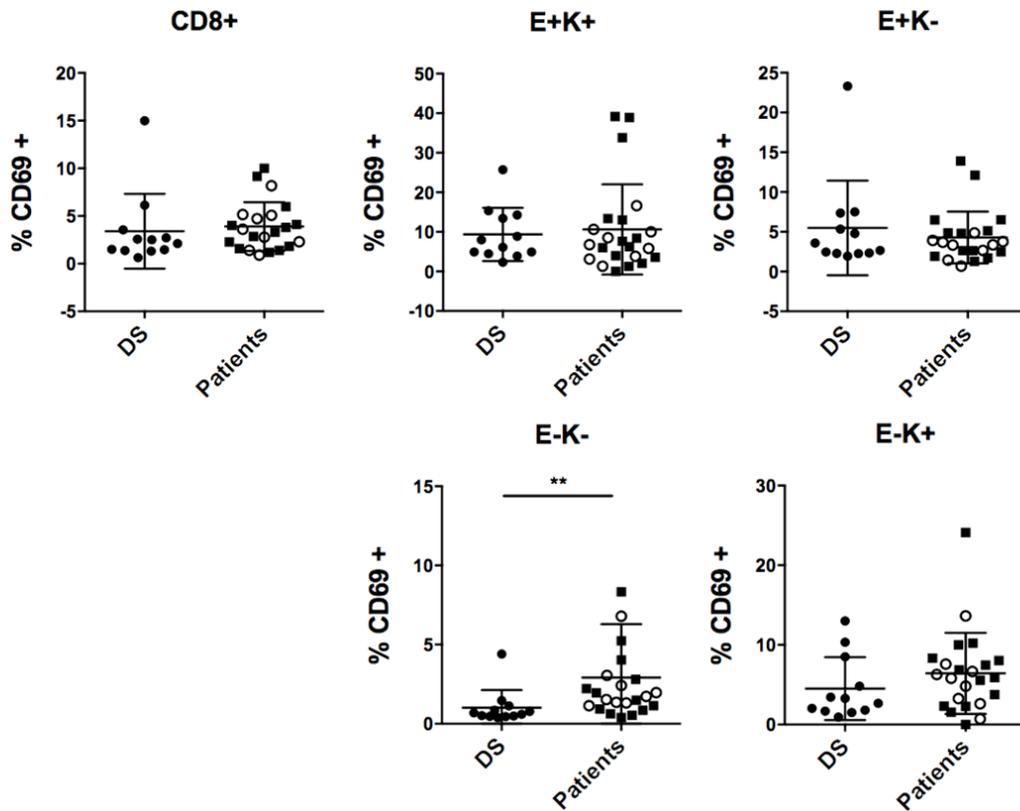


Figure 7 : Analyse de l'expression de PD-1 et de CD69 par les LT CD8⁺ et les différents compartiments cellulaires au sein des LT CD8⁺ par cytométrie en flux *ex vivo*.

A) Proportions de cellules exprimant PD-1, au sein des LT CD8⁺, des E⁺K⁺, E⁺K⁻, E⁻K⁺ et E⁻K⁻ chez les donneurs sains (DS) (n=15) et les patients avec un cancer (+Ca) (n=9) et sans cancer (-Ca) (n=11).

B) Fréquences de cellules exprimant PD-1 dans les E⁺K⁺ et dans les E⁻K⁻ entre les DS et les patients avec un cancer (+Ca) et sans cancer (-Ca).

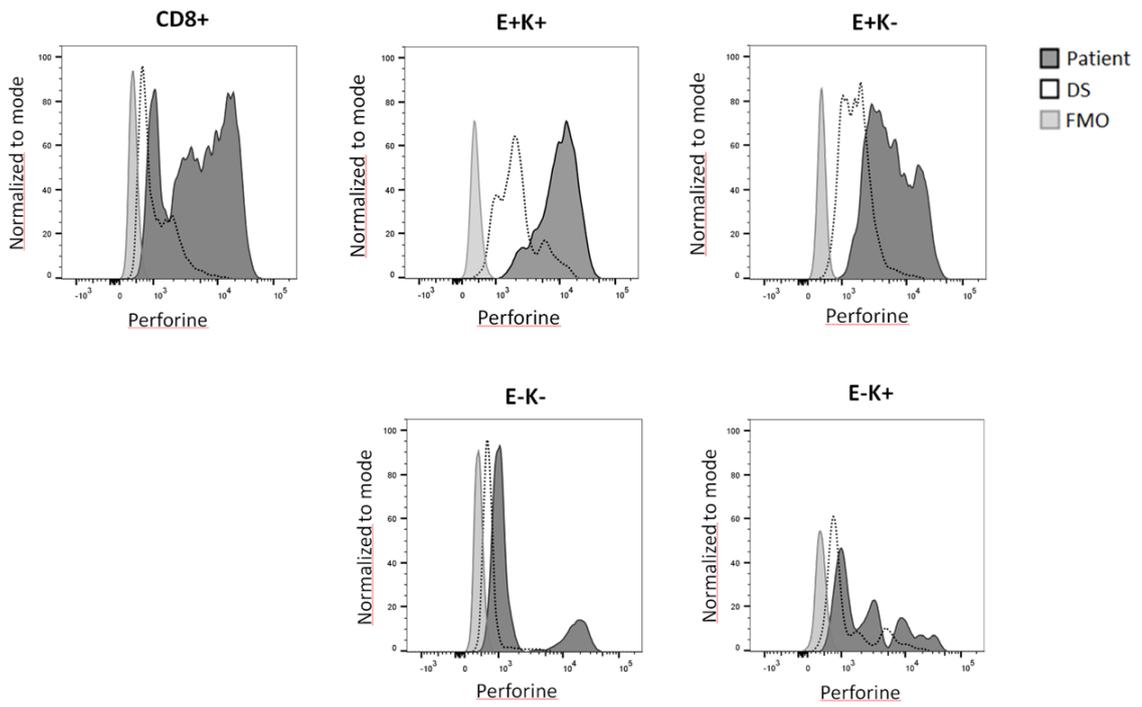
C) Fréquences de cellules exprimant CD69, au sein des LT CD8⁺ et des compartiments E⁺K⁺, E⁺K⁻, E⁻K⁺ et E⁻K⁻ chez les donneurs sains (DS) (n=12) et les patients avec un cancer (+Ca) (n=9) et sans cancer (-Ca) (n=14). Le test bilatéral non paramétrique de Mann et Whitney en séries non appariées a été utilisé (moyenne ± écart-type). **p*<0,05, ***p*<0,01. Chaque point correspond à un patient.

1.5. Expression de la perforine et de l'IFN- γ par les compartiments cellulaires Eomes/KIRs

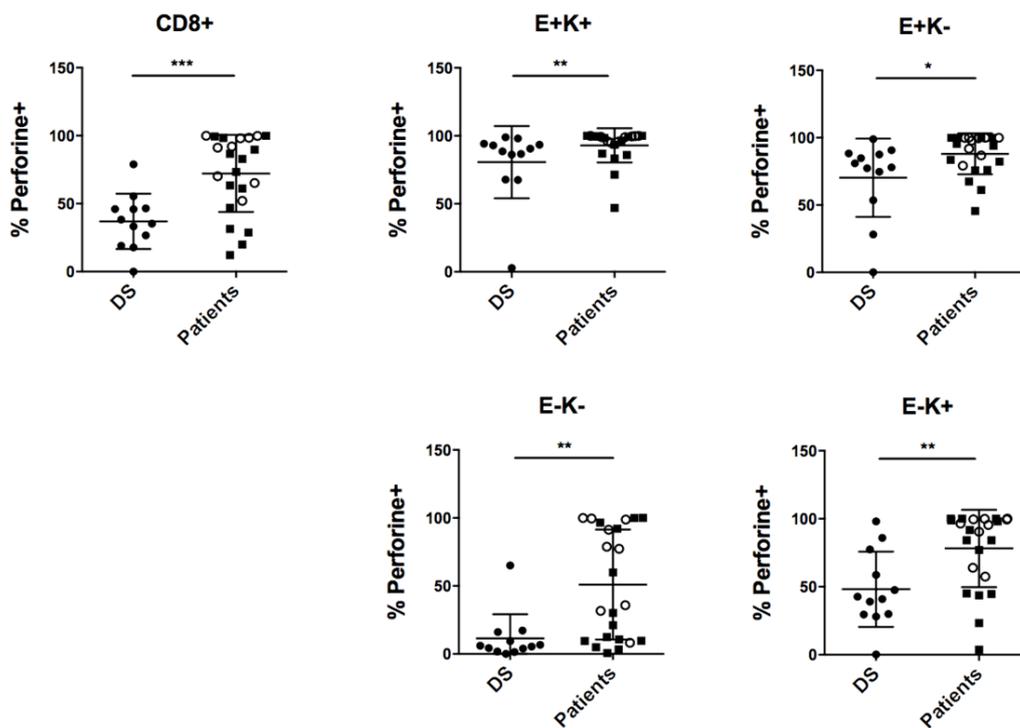
Le contenu cytotoxique des cellules a été évalué par l'expression intracytoplasmique de la perforine, protéine cytolytique libérée par les LT CD8 lors de l'exocytose des granules cytotoxiques au contact de la cellule cible. La perforine forme alors des pores à la surface de la cellule cible, provoquant la lyse de cette dernière. Comme illustré dans la **Figure 8B**, la fréquence des cellules exprimant la perforine est plus élevée à la fois dans les LT CD8⁺ totaux et dans toutes les sous-populations chez les patients comparativement aux donneurs sains. Les LT CD8 innés sont donc fonctionnels du point de vue du contenu intracellulaire en perforine. Comme attendu, le compartiment cellulaire E⁻K⁻, qui est présumé constituer le pool de LT CD8⁺ naïfs, contient peu de cellules exprimant la perforine chez les donneurs sains. Mais, de manière surprenante, une proportion significativement plus importante de cellules E⁻K⁻ exprime la perforine chez les patients. Parmi les patients, la fréquence élevée de cellules exprimant la perforine est retrouvée sans distinction du phénotype cancéreux (**Figure 8B**). Des résultats obtenus au laboratoire ont montré que les LT CD8 innés, à la différence de leur équivalent mémoire conventionnel, possèdent la caractéristique fonctionnelle de sécrétion rapide d'IFN- γ après exposition aux cytokines pro-inflammatoires de type inné IL-12 et IL-18 (Jacomet et al., 2015). Nous avons donc en premier lieu confirmé que les LT CD8 innés représentent la majorité des cellules productrices d'IFN- γ chez les donneurs sains et vérifié qu'il en est de même dans notre groupe de patients traité par la CsA (résultats non illustrés). Les résultats obtenus chez les patients traités par CsA ne montrent pas de différence significative de la fréquence de LT CD8 innés produisant de l'IFN- γ après stimulation par l'IL-12 et l'IL-18 (**Figure 8C**). Il en est de même pour les LT CD8⁺ totaux et les autres sous-compartiments cellulaires.

Les LT CD8 innés des patients sont donc fonctionnels, à l'image de ceux des donneurs sains pour la sécrétion d'IFN- γ , avec un plus fort contenu intracellulaire en perforine.

A.



B.



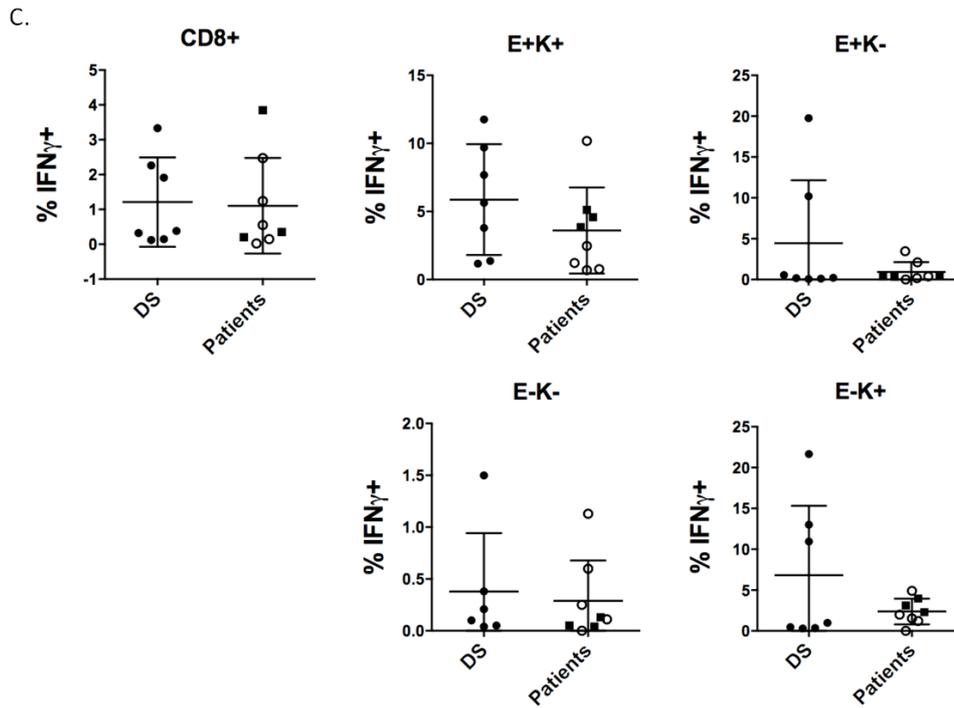


Figure 8 : Analyse de la fonctionnalité cellulaire par l'expression de la perforine et de l'IFN- γ dans les LT CD8⁺ totaux et les cellules E⁺K⁺, E⁺K⁻, E⁻K⁺ et E⁻K⁻ par cytométrie en flux *ex vivo*.

A) Histogrammes représentant l'expression de la perforine dans les LT CD8⁺, les E⁺K⁺, E⁺K⁻, E⁻K⁺ et E⁻K⁻ pour un patient et un DS représentatifs ainsi que le FMO (Fluorescence Minus One) pour la perforine qui correspond à un marquage des cellules sans anticorps anti-perforine.

B) Comparaison du pourcentage de cellules exprimant la perforine intracellulaire chez les donneur sains (DS) (n=12) et les patients avec un cancer (+Ca) (n=9) et sans cancer (-Ca) (n=14) au sein des LT CD8⁺, des E⁺K⁺, E⁺K⁻, E⁻K⁺ et E⁻K⁻.

C) Comparaison de la fréquence de cellules exprimant l'IFN- γ chez les donneurs sains (DS) (n=7) et les patients avec un cancer (+Ca) (n=5) et sans cancer (-Ca) (n=3) au sein des LT CD8⁺, des E⁺K⁺, E⁺K⁻, E⁻K⁺ et E⁻K⁻. Les CMN des DS et des patients ont été mises en culture pendant 48 heures en présence ou non d'IL-12 + IL-18. En l'absence de stimulation, la fréquence des cellules exprimant l'IFN- γ est inférieure à 0,1%. Seule la condition stimulée est illustrée.

Le test bilatéral non paramétrique de Mann et Whitney en séries non appariées a été utilisé (moyenne \pm écart-type). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Chaque point correspond à un patient.

1.6. Existence d'une corrélation inverse entre le nombre de lymphocytes T totaux et la fréquence de LT CD8 innés chez les patients

La CsA étant un traitement immunosuppresseur, elle est compatible avec une diminution du nombre de lymphocytes T totaux chez les patients. Nous nous sommes donc posé la question de savoir si un ou plusieurs sous-compartiments cellulaires étaient touchés en cas de baisse du compartiment T total. Nous avons ainsi trouvé qu'il existait une corrélation inverse proche de la significativité entre le nombre absolu de LT CD3⁺ calculé par microlitre de sang et la fréquence de LT CD8 innés, attestant une tendance des patients à posséder plus

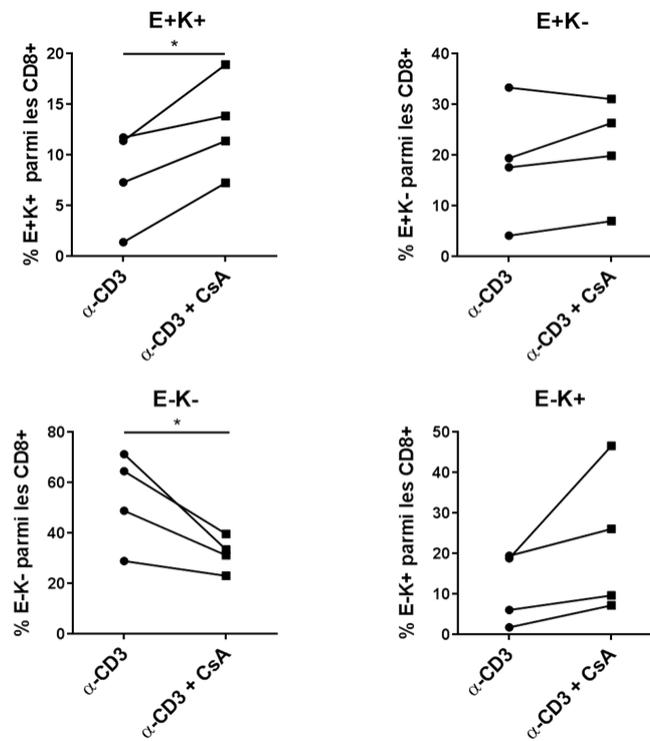


Figure 10: Etude des effets de la CsA sur la génération de LT CD8 innés *in vitro* (n=4)

Des LT CD8⁺ totaux ont été enrichis par tri positif CD8⁺ sur colonne magnétique à partir de CMN de donneurs sains et mis en culture pendant 7 jours à 37°C en présence d'IL-15 à la concentration de 20 ng/mL. La CsA a été ajoutée à la concentration de 100 ng/mL et de billes de co-stimulation anti-CD3/CD28 (ratio de une cellule pour une bille) dans les puits correspondant à la condition CsA. Analyse par cytométrie en flux. Le test non paramétrique de Wilcoxon en séries appariées a été utilisé. * $p < 0,05$. Chaque point correspond à une culture cellulaire.

2.2. Effets de la CsA sur les autres compartiments cellulaires Eomes/KIRs

En présence de CsA, la fréquence (%) des cellules E⁻K⁻ (moyenne \pm écart-type : 31,74% \pm 6,86) est significativement ($p < 0,05$) diminuée par rapport à la condition sans CsA (moyenne \pm écart-type : 53,31% \pm 18,84), comme ce qui avait été observé chez les patients par rapport aux donneurs sains dans notre analyse *ex vivo*. La CsA ne semble pas influencer le compartiment cellulaire E⁺K⁻ (moyenne \pm écart-type : 21,02 \pm 10,44 avec CsA *versus* 18,57 \pm 11,95 sans CsA), et la fréquence de cellules E⁻K⁺ n'est pas significativement augmentée en présence de CsA (22,33 \pm 18,18 avec CsA *versus* 11,47 \pm 8,95 sans CsA) (**Figure 10**).

Comme il a été observé chez les patients, l'augmentation du compartiment E⁺K⁺ se fait au détriment du compartiment E⁻K⁻, confirmant bien l'hypothèse d'une reprogrammation des cellules E⁻K⁻ en LT CD8 innés.

Ces expériences de culture cellulaire nous permettent de proposer que la CsA a un effet direct sur le compartiment cellulaire LT CD8⁺ qui aboutit à favoriser le maintien (auto-renouvellement) des LT CD8 innés et/ou leur différenciation à partir de cellules E⁻K⁻.

Discussion

Les observations faites chez les patients de la cohorte ELITE sous inhibiteurs de calcineurine sur l'augmentation des LT CD8 innés nous ont conduits à étudier les effets de la CsA sur cette population cellulaire.

Nous avons pu confirmer ces résultats préliminaires, en obtenant une fréquence de LT CD8 innés significativement plus élevée chez les patients analysés par rapport aux donneurs sains.

Les LT CD8 innés possèdent un contenu cytotoxique en perforine plus important, et sont capables de sécréter de l'IFN- γ de manière équivalente à celle des donneurs sains après une stimulation de type inné, ce qui montre que ces cellules sont bien fonctionnelles.

L'analyse des marqueurs d'activation (CD69) et d'épuisement (PD-1) n'a pas permis d'objectiver une différence entre les LT CD8 innés des patients et ceux des donneurs sains, et ils ne semblent pas proliférer plus au vu de l'analyse de l'expression de Ki67.

Ce résultat joint à l'analyse des autres compartiments cellulaires au sein des LT CD8⁺ totaux, montrant qu'en termes de fréquence, le compartiment cellulaire E⁻K⁻ était diminué chez les patients comparativement aux donneurs sains, à l'inverse de celui des LT CD8 innés, nous a amenés à émettre l'hypothèse d'une reprogrammation du compartiment E⁻K⁻ en cellules E⁺K⁺, alors que l'origine des LT CD8 innés n'avait pas été explorée jusqu'à présent.

Les cellules E⁻K⁻ correspondent à des LT CD8⁺ naïfs et il a été montré chez la souris que Eomes joue un rôle critique dans la différenciation des LT CD8⁺ mémoires, son expression augmentant avec l'acquisition du phénotype mémoire des cellules (Banerjee et al., 2010). Les cellules E⁻K⁻ auraient donc acquis l'expression d'Eomes, leur conférant un phénotype mémoire, et des récepteurs KIR/NKG2A leur donnant une caractéristique de cellules innées. En ce qui concerne l'activation des cellules, une augmentation de la fréquence de cellules exprimant CD69 a été observée au sein des cellules E⁻K⁻ chez les patients comparativement aux donneurs sains. Les cellules E⁻K⁻ sont donc diminuées en fréquence et suractivées chez les patients par rapport aux donneurs sains, ce qui est conciliable avec une différenciation de ces cellules en LT CD8 innés. Néanmoins, la définition des LT CD8⁺ naïfs par la non expression d'Eomes et des KIRs reste imprécise et mériterait l'utilisation de marqueurs supplémentaires pour définir ces cellules naïves, comme l'expression de CD45RA et de CCR7, marqueurs exprimés par les cellules naïves et dont l'expression est perdue par les cellules effectrices mémoires. Ces marqueurs sont également utiles à la définition du phénotype EMRA (CD45RA⁺ CCR7⁻), représentant la majorité des LT CD8 innés, et dont un rôle dans l'inflammation endothéliale a été montré sous l'effet de l'IL-15 chez les patients

transplantés rénaux (Tilly et al., 2017). Les auteurs de cette étude ont montré que l'IL-15 activait plusieurs voies de signalisation entraînant la prolifération des LT EMRA des patients et stimulait la respiration mitochondriale et la glycolyse de ces cellules, aboutissant à l'inflammation endothéliale *via* la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α . Ceci soulève la question d'un éventuel rôle pathogène des LT CD8 innés pour le greffon chez les patients transplantés rénaux *via* l'induction d'une inflammation endothéliale.

Ensuite, les résultats obtenus montrent que le compartiment cellulaire E $^{\text{K}^-}$ pourrait correspondre à un compartiment de transition au cours de la différenciation des LT CD8 $^+$ naïfs et les LT CD8 $^+$ innés. En effet, ce compartiment cellulaire n'est pas impacté en terme de fréquence au sein des LT CD8 $^+$ totaux, mais il prolifère davantage (augmentation significative de la fréquence de cellules E $^{\text{K}^-}$ exprimant Ki67) et exprime très peu PD-1 chez les patients par rapport aux donneurs sains. Les cellules E $^{\text{K}^-}$ ne sont pas plus activées chez les patients car il n'existe pas de différence d'expression de CD69 par rapport aux donneurs sains. L'absence d'augmentation d'expression de CD69 et la diminution d'expression de PD-1 montrent donc l'absence d'activation des cellules E $^{\text{K}^-}$.

Si l'on poursuit plus loin la réflexion autour de l'hypothèse selon laquelle les LT CD8 $^+$ naïfs se différencient en LT CD8 $^+$ innés, nous pouvons envisager que les cellules E $^{\text{K}^-}$ s'activent, se différencient d'abord en cellules E $^{\text{K}^+}$ qui prolifèrent et se différencient finalement en cellules E $^{\text{K}^+}$, aboutissant à une augmentation de la fréquence des cellules E $^{\text{K}^+}$ et une diminution de la fréquence des cellules E $^{\text{K}^-}$, sans que le compartiment cellulaire E $^{\text{K}^+}$ soit impacté.

Enfin, nous avons montré l'existence d'une tendance chez les patients à l'augmentation de la fréquence de LT CD8 innés en cas de diminution du nombre de LT CD8 $^+$ totaux, même si ce résultat nécessite d'analyser un effectif de patients plus important afin d'être confirmé. Or, il a été montré chez la souris que les lymphocytes T CD8 « virtuels mémoires » (correspondant aux LT CD8 innés humains) subissaient une prolifération homéostatique liée à la lymphopénie, en l'absence d'antigène spécifique (Haluszczak et al., 2009). Cette prolifération homéostatique pourrait s'appliquer aux patients immunosupprimés par la CsA, expliquant par là même l'augmentation de la fréquence des LT CD8 innés chez les patients par rapport aux donneurs sains. Une prolifération homéostatique signifierait un auto-renouvellement des cellules E $^{\text{K}^+}$, c'est-à-dire une prolifération des cellules au sein de ce compartiment.

L'augmentation de la fréquence des LT CD8 innés pourrait donc correspondre soit à un auto-renouvellement, soit à une différenciation à partir de précurseurs.

Nous avons pu mettre en évidence une diminution de la fréquence des cellules E $^{\text{K}^-}$ parallèlement à l'augmentation de la fréquence des cellules E $^{\text{K}^+}$, ainsi qu'une sur-activation et une augmentation du contenu cytotoxique de ces cellules, lesquelles sont bien conciliables

avec une différenciation des LT CD8 innés à partir de cellules E⁻K⁻. Cette hypothèse de travail est bien corroborée par nos résultats de culture cellulaire *in vitro* dans lesquelles la CsA entraînait une augmentation du compartiment lymphocytaire T CD8 inné au détriment du compartiment cellulaire E⁻K⁻. Cependant, les cellules E⁻K⁻ peuvent aussi se différencier en LT CD8 mémoires conventionnels (E⁺K⁻), ce qui signifie que la diminution de la fréquence des cellules E⁻K⁻ n'est pas obligatoirement due à leur différenciation en LT CD8 innés. Il est donc difficile à ce stade de faire la part des choses entre l'auto-renouvellement et la différenciation des LT CD8 innés.

Par ailleurs, il est connu que le nombre de LT CD8 mémoires conventionnels augmente avec l'âge chez l'Homme et la souris (probablement en lien avec une stimulation antigénique prolongée), et cette augmentation a également été montrée pour les LT CD8 VM chez la souris (Chiu et al., 2013). Nous pouvons donc supposer que les LT CD8 innés sont aussi impactés par l'âge chez l'Homme. L'une des limites de cette étude est la différence d'âge entre la cohorte de patients et les donneurs sains, l'âge moyen des patients étant plus élevé que celui des donneurs sains, pouvant être à l'origine d'un biais dans la différence de fréquence des LT CD8 innés entre les deux groupes.

Les résultats obtenus *in vitro* ont aussi montré qu'il était nécessaire de stimuler de manière optimale le TCR des LT CD8⁺ pour observer une augmentation de la fréquence des LT CD8 innés en présence de CsA. On peut donc supposer qu'il existe chez les patients des antigènes stimulant les LT CD8⁺, comme par exemple des antigènes allogéniques provenant du greffon.

La poursuite logique de ce travail consistera à évaluer la prolifération cellulaire, l'activation, l'épuisement et la fonctionnalité des cellules *in vitro*, à l'image de celle que nous avons réalisée *ex vivo* chez les patients, de façon à savoir si la CsA a le même effet quand elle agit directement sur les LT CD8⁺ *in vitro* que *in vivo* chez les patients où il peut exister des intermédiaires entre la CsA et les LT CD8⁺. Afin de répondre à la question du mécanisme d'action conduisant à une fréquence élevée de LT CD8 innés chez les patients, des cultures cellulaires *in vitro* peuvent être envisagées à partir de LT CD8 naïfs (pour tester l'hypothèse d'une reprogrammation des cellules E⁻K⁻ en cellules E⁺K⁺) et de LT CD8 innés (pour tester l'hypothèse de l'auto-renouvellement) qui seront triés électroniquement et cultivés en présence de CsA.

L'objectif secondaire de notre étude était de rechercher un lien entre les LT CD8 innés et l'apparition de cancer liée à l'immunosuppression en transplantation. Dans ce but, nous avons recherché une signature différentielle du compartiment LT CD8 inné entre les patients

avec et sans cancer, ceci en prenant en compte leur fréquence dans le sang périphérique et/ou leur expression des différents marqueurs étudiés.

Nous avons observé que la fréquence de LT CD8 naïfs exprimant PD-1 était significativement plus élevée chez les patients ayant eu un cancer que chez ceux n'en ayant pas eu et cette même tendance a été observée au sein des LT CD8 innés. L'expression de PD-1 reflète l'état d'épuisement ou d'activation tardif des LT car cette protéine membranaire exprimée à la surface des cellules après activation des LT se lie à ses ligands PD-L1 (exprimé constitutivement) et PD-L2 (exprimé par les CPA au cours de l'inflammation), réprimant l'activation des LT (ce mécanisme permet d'éviter les réactions d'auto-immunité par emballement du système immunitaire). De plus, il est connu que PD-1 est surexprimé à la surface des LT CD8⁺ en contact avec les tumeurs, ce qui induit un environnement favorable au développement des tumeurs puisque les LT CD8⁺ ne sont plus capables de jouer leur rôle cytotoxique (Chen and Mellman, 2017). Si nous mettons nos résultats en lien avec ce mécanisme d'échappement immunitaire, il n'est pas étonnant de voir une fréquence plus élevée de cellules exprimant PD-1 chez les patients avec un cancer. Cette observation nous donne un argument supplémentaire pour dire que les LT CD8 innés sont probablement impliqués dans l'immunité anti-cancéreuse. En effet, des résultats antérieurs du laboratoire ont montré que les LT CD8 innés étaient déficients en nombre et en fonction chez les patients atteints de LMC en phase chronique, et restaurés après traitement, et qu'ils étaient présents dans les ganglions drainant la tumeur dans le cancer du sein et dans la carcinose péritonéale et le liquide d'ascite dans le cancer de l'ovaire (Barbarin et al., 2017).

Nous n'avons pas observé de différence du pourcentage de LT CD8 innés périphériques entre les patients ayant eu un cancer et ceux n'en ayant jamais eu, donc la fréquence de LT CD8 innés ne semble pas être un élément discriminant concernant le phénotype cancéreux. Il serait intéressant de pouvoir étudier la présence de LT CD8 innés localement au sein des tumeurs cutanées des patients pour déterminer s'ils constituent ou non un élément de distinction entre les patients avec et sans cancer.

Conclusion

Les LT CD8 innés constituent une nouvelle population de LT CD8⁺ encore mal connue chez l'Homme. Nous avons montré au cours de cette étude que les LT CD8 innés étaient ciblés par un traitement immunosuppresseur, la CsA, chez les patients greffés rénaux. La fréquence des LT CD8 innés est en effet augmentée chez les patients sous CsA comparativement aux donneurs sains et *in vitro* en présence de CsA et sont fonctionnels.

Les résultats obtenus nous ont permis de formuler deux hypothèses concernant la génération des LT CD8 innés en présence de CsA : celle d'une reprogrammation des LT CD8⁺ naïfs (compartiment cellulaire E⁻K⁻), grâce à l'induction de l'expression d'Eomes et des récepteurs KIRs, et celle d'un auto-renouvellement des LT CD8 innés.

Les mécanismes aboutissant à la génération de LT CD8 innés en présence de CsA ne sont pas encore élucidés et nécessitent de poursuivre cette étude, en particulier pour confirmer notre hypothèse selon laquelle la CsA agit par un effet direct sur les LT CD8⁺ naïfs et/ou innés. Enfin, il ne semble pas exister de signature du phénotype cancéreux chez les LT CD8 innés.

Dans l'ensemble, cette étude a permis d'améliorer la connaissance des LT CD8 innés chez l'Homme, en particulier dans une nouvelle situation pathologique qui combine la greffe rénale et le cancer.

Bibliographie

- Banerjee, A., Gordon, S.M., Intlekofer, A.M., Paley, M.A., Mooney, E.C., Lindsten, T., Wherry, E.J., and Reiner, S.L. (2010). Cutting Edge: The Transcription Factor Eomesodermin Enables CD8⁺ T Cells To Compete for the Memory Cell Niche. *The Journal of Immunology* *185*, 4988–4992.
- Barbarin, A., Cayssials, E., Jacomet, F., Nunez, N.G., Basbous, S., Lefèvre, L., Abdallah, M., Piccirilli, N., Morin, B., Lavoue, V., et al. (2017). Phenotype of NK-Like CD8⁺ T Cells with Innate Features in Humans and Their Relevance in Cancer Diseases. *Front Immunol* *8*.
- Barbarino, J.M., Staats, C.E., Venkataramanan, R., Klein, T.E., and Altman, R.B. (2013). PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics* *23*, 563–585.
- Bennett, W.M., DeMattos, A., Meyer, M.M., Andoh, T., and Barry, J.M. (1996). Chronic cyclosporine nephropathy: The Achilles' heel of immunosuppressive therapy. *Kidney International* *50*, 1089–1100.
- Björkström, N.K., Béziat, V., Cichocki, F., Liu, L.L., Levine, J., Larsson, S., Koup, R.A., Anderson, S.K., Ljunggren, H.-G., and Malmberg, K.-J. (2012). CD8 T cells express randomly selected KIRs with distinct specificities compared with NK cells. *Blood* *120*, 3455–3465.
- Chen, D.S., and Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* *541*, 321–330.
- Chiu, B.-C., Martin, B.E., Stolberg, V.R., and Chensue, S.W. (2013). Cutting Edge: Central Memory CD8 T Cells in Aged Mice Are Virtual Memory Cells. *The Journal of Immunology* *191*, 5793–5796.
- Dantal, J., Hourmant, M., Cantarovich, D., Giral, M., Blancho, G., Dreno, B., and Souillou, J.-P. (1998). Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *The Lancet* *351*, 623–628.
- Djamali, A., Kaufman, D.B., Ellis, T.M., Zhong, W., Matas, A., and Samaniego, M. (2014). Diagnosis and Management of Antibody-Mediated Rejection: Current Status and Novel Approaches. *Am J Transplant* *14*, 255–271.
- Gorentla, B.K., and Zhong, X.-P. (2012). T cell Receptor Signal Transduction in T lymphocytes. *J Clin Cell Immunol* *2012*, 005.
- Haluszczak, C., Akue, A.D., Hamilton, S.E., Johnson, L.D.S., Pujanauski, L., Teodorovic, L., Jameson, S.C., and Kedl, R.M. (2009). The antigen-specific CD8⁺ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *J Exp Med* *206*, 435–448.
- Hu, J., Sahu, N., Walsh, E., and August, A. (2007). Memory phenotype CD8⁺ T-cells with innate function selectively develop in the absence of active Itk. *Eur J Immunol* *37*, 2892–2899.
- Jacomet, F., Cayssials, E., Basbous, S., Levescot, A., Piccirilli, N., Desmier, D., Robin, A., Barra, A., Giraud, C., Guilhot, F., et al. (2015). Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8⁺ KIR/NKG2A⁺ T cells in human adults and cord blood samples. *Eur. J. Immunol.* *45*, 1926–1933.
- Jacomet, F., Cayssials, E., Barbarin, A., Desmier, D., Basbous, S., Lefèvre, L., Levescot, A., Robin, A., Piccirilli, N., Giraud, C., et al. (2017). The Hypothesis of the Human iNKT/Innate CD8⁺ T-Cell Axis Applied to Cancer: Evidence for a Deficiency in Chronic Myeloid Leukemia. *Front Immunol* *7*.
- Kasiske, B.L., Snyder, J.J., Gilbertson, D.T., and Wang, C. (2004). Cancer after Kidney Transplantation in the United States. *American Journal of Transplantation* *4*, 905–913.

- Martinet, V., Tonon, S., Torres, D., Azouz, A., Nguyen, M., Kohler, A., Flamand, V., Mao, C.-A., Klein, W.H., Leo, O., et al. (2015). Type I interferons regulate eomesodermin expression and the development of unconventional memory CD8⁺ T cells. *Nat Commun* 6.
- Min, H.S., Lee, Y.J., Jeon, Y.K., Kim, E.J., Kang, B.H., Jung, K.C., Chang, C.-H., and Park, S.H. (2011). MHC Class II-Restricted Interaction between Thymocytes Plays an Essential Role in the Production of Innate CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology* 186, 5749–5757.
- Oniscu, G.C., Brown, H., and Forsythe, J.L.R. (2004). How great is the survival advantage of transplantation over dialysis in elderly patients? *Nephrol. Dial. Transplant.* 19, 945–951.
- Peters, D.H., Fitton, A., Plosker, G.L., and Faulds, D. (1993). Tacrolimus. A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drugs* 46, 746–794.
- Prince, A.L., Yin, C.C., Enos, M.E., Felices, M., and Berg, L.J. (2009). The Tec kinases Itk and Rlk regulate conventional versus innate T-cell development. *Immunological Reviews* 228, 115–131.
- Rossignol, A., Levescot, A., Jacomet, F., Robin, A., Basbous, S., Giraud, C., Roy, L., Guilhot, F., Turhan, A.G., Barra, A., et al. (2012). Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients. *European Journal of Immunology* 42, 1870–1875.
- Schüler, T., Hämmerling, G.J., and Arnold, B. (2004). Cutting Edge: IL-7-Dependent Homeostatic Proliferation of CD8⁺ T Cells in Neonatal Mice Allows the Generation of Long-Lived Natural Memory T Cells. *The Journal of Immunology* 172, 15–19.
- Sosinowski, T., White, J.T., Cross, E., Haluszczak, C., Marrack, P., Gapin, L., and Kedl, R.M. (2013). CD8 α ⁺ DC trans-presentation of IL-15 to naïve CD8⁺ T cells produces antigen inexperienced T cells in the periphery with memory phenotype and function. *J Immunol* 190, 1936–1947.
- Stepkowski, S.M. (2000). Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Rev Mol Med* 2, 1–23.
- Tilly, G., Doan-Ngoc, T.-M., Yap, M., Caristan, A., Jacquemont, L., Danger, R., Cadoux, M., Bruneau, S., Giral, M., Guerif, P., et al. (2017a). IL-15 Harnesses Pro-inflammatory Function of TEMRA CD8 in Kidney-Transplant Recipients. *Front. Immunol.* 8.
- Weinreich, M.A., Odumade, O.A., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2010). T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8⁺ T cells. *Nature Immunology* 11, 709–716.

ANNEXE

Patients :

Patient	Age	Sexe (M/F)	Cancer (oui/non)	Traitement	Temps depuis la transplantation (années)	Statut CMV
2	77	M	Oui	CsA	22	Positif
5	63	M	Non	CsA	26	Négatif
7	70	F	Non	CsA	22	Négatif
8	47	M	Non	CsA	20	Négatif
9	61	M	Non	Tacrolimus	20	Négatif
10	56	M	Non	CsA	13	Positif
13	64	F	Non	CsA	24	Négatif
14	80	M	Oui	CsA	22	Négatif
15	62	M	Non	CsA	28	Négatif
16	80	F	Non	CsA	14	Négatif
18	70	M	Oui	CsA	25	Négatif
19	64	F	Non	CsA	14	Négatif
20	65	M	Non	CsA	20	Positif
22	62	M	Non	CsA	16	Négatif
27	72	M	Oui	CsA	20	Positif
30	75	M	Oui	CsA	27	Positif
32	63	M	Oui	CsA	29	Négatif
33	78	M	Oui	CsA	29	Positif
35	59	M	Non	Tacrolimus	11	Négatif
36	49	M	Non	CsA	20	Négatif
41	85	F	Oui	CsA	26	Positif
47	61	F	Oui	CsA	15	Positif
49	68	F	Non	CsA	19	Négatif

Sex ratio (M/F) : 2,3

Age : moyenne \pm écart type : 66,6 \pm 9,7 ans
 médiane (étendue) : 64 ans (47-85)

Donneurs sains :

DS	Age	Sexe
1	57	M
2	54	M
3	51	M
4	67	M
5	26	M
6	30	M
7	22	F
8	22	M
9	53	M
10	37	F
11	26	F
12	40	M
13	58	M
14	27	F
15	57	M
16	51	F
17	58	M
18	23	F
19	51	M

Sex ratio : 2,2

Age : moyenne \pm écart type : 42,6 \pm 15,2 ans
médiane (étendue) : 51 ans (22-58)

Vu, le Président du jury,

Vu, le Directeur de thèse,

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom - Prénoms : LATEUR Clara

Titre de la thèse : Etude de la population lymphocytaire T CD8 innée chez l'Homme : l'hypothèse d'une reprogrammation sous l'effet d'un traitement immunosuppresseur

Résumé de la thèse :

Les lymphocytes T CD8 innés constituent une nouvelle population de lymphocytes T CD8 possédant à la fois des caractéristiques de lymphocytes innés (expression de marqueurs NK et réponse à une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires) et mémoires (expression du facteur de transcription Eomes) et qui sont documentés pour leur arsenal anti-tumoral. Ici, nous émettons l'hypothèse d'une reprogrammation des LT CD8 naïfs en LT CD8 innés par acquisition de l'expression d'Eomes, sous l'effet de la ciclosporine. Pour éprouver cette hypothèse, les LT CD8 innés de patients transplantés rénaux traités par ciclosporine ont été analysés (prolifération cellulaire, activation, épuisement et statut fonctionnel) et des cultures cellulaires de LT CD8 de donneurs sains ont été réalisées en présence de ciclosporine. Les résultats obtenus *ex vivo* confirment l'augmentation de la fréquence des LT CD8 innés en présence de ciclosporine chez les patients, parallèlement à une diminution des LT CD8 naïfs, et nous montrons que les LT CD8 innés sont fonctionnels en présence de ciclosporine. De manière remarquable, les résultats obtenus *in vitro* corroborent ceux obtenus *ex vivo*.

MOTS CLÉS

LT CD8 INNES, EOMES, TRANSPLANTATION, CICLOSPORINE

JURY

**PRÉSIDENT : Mme Muriel DUFLOS, Professeur de Chimie Organique
Faculté de Pharmacie de Nantes**

**DIRECTEUR : M. Jean-Marc GOMBERT, Professeur d'Immunologie
Faculté de Médecine de Poitiers**

**ASSESEURS : Mme Sylvie HERMOUET, Maître de Conférences en Hématologie
Faculté de Médecine de Nantes
Mme Florence JACOMET, Praticien Hospitalier en
Immunologie
CHU de Poitiers**

Adresse de l'auteur : 33 rue de la tranchée 86000 Poitiers