

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

Répertoire des Lymphocytes T et Biomarqueurs : Approches Statistiques

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale : CHIMIE-BIOLOGIE

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialités : Immunologie - Biostatistiques

présentée

et soutenue publiquement par

Patrick Miqueu

Le 18 décembre 2007, devant le jury ci-dessous :

Président Dominique Bertrand, directeur de recherche, Nantes

Rapporteurs Jean-Charles Guéry, directeur de recherche, Toulouse
Patrice Marche, directeur de recherche, Grenoble

Examinateurs Jean-Christophe Doré, chargé de recherche, Paris
Dominique Bertrand, directeur de recherche, Nantes

Directrices de thèse Sophie Brouard, chargée de recherche, Nantes
Véronique Sébille, maître de conférences, Nantes

Membre invité Marina Guillet, directeur exécutif diagnostic (TcLand), Nantes

Abréviations

ADNc	Acide DésoxyNucléotidique complémentaire
ACP	Analyse en Composantes Principales
ARN	Acide RiboNucléotidique
CD	Cluster of differentiation
CDR3 LD	Complementarity Determining Region 3 – Length Distribution Distribution des longueurs de CDR3
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	CytoMégaloVirus
D _{max}	Score D du test de Kolmogorov-Smirnov
Gd ^{+ve}	Gadolinium positif
GEN	GeneMapper
IL	InterLeukine
IMM	Immunoscope
IFN γ	Interferon γ
IQR	InterQuartile Range
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ITERT	Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation
K	Kurtosis
KS	Test de Kolmogorov-Smirnov
MAX	variable Maximal
MBP	Protéine Basique de la Myéline
MDS	MultiDimensional Scaling
MED	Longueur Médiane
MOD	Nombre de modes
MOY	Longueur Moyenne
Nb	Nombre de pics
NCT	Néphropathie Chronique du Transplant
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEAK	Nombre de pics
PEAK_MAJ	Nombre de pics majoritaires
PERTURB	Pourcentage de perturbation
PHRC	Programme hospitalier de recherche clinique
Ps	Pourcentage de similitude
QUANT_ABS	Quantité absolue
RT-PCR	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
S	Skewness
SEP	Sclérose En Plaques
SKEW	Skewness
STDEV	Ecart-type
TCR	T Cell Receptor

Figures

Figure 1 : Schéma du récepteur des lymphocytes T $\alpha\beta$	14
Figure 2 : Structure tridimensionnelle du complexe TCR-CMH-peptide	14
Figure 3 : Génération de la diversité du TCR.....	17
Figure 4 : Détails de l'approche Immunoscope.....	23
Figure 5 : Exemples de CDR3 LD.....	23
Figure 6 : Analyse hétéroduplex.....	25
Figure 7 : Description de la « construction » d'une représentation TcLandscape.....	27
Figure 8 : Les différentes étapes de traitement du signal.....	38
Figure 9 : Calcul du pourcentage de perturbation.....	42
Figure 10 : Distributions de référence.....	43
Figure 11 : Illustration du biais du pourcentage de perturbation.....	44
Figure 12 : Duplicat de la distribution de longueurs de CDR3.	45
Figure 13 : Synthèse des deux stratégies d'analyses des CDR3 LD.	46
Figure 14 : Distances entre 10 villes américaines	47
Figure 15 : MDS des distances entre 10 villes américaines.....	48
Figure 16 : Jeu de données pour la comparaison	49
Figure 17 : Pourcentages de perturbation.	50
Figure 18 : Matrice de distances de Minkowski	50
Figure 19 : Positionnement multidimensionnel.....	51
Figure 20 : Recherche du meilleur alignement.	53
Figure 21 : Boîte à moustache des pourcentages de similitude	55
Figure 22 : Médianes et écarts interquartile (IQR).....	56
Figure 23 : Suivi dans le temps au moyen des distances	57
Figure 24 : Stratégie d'analyse non supervisée des TcLandscapes.	60
Figure 48 : Exemple de critères de substitution.....	90
Figure 49 : Pyramide inversée de la qualification d'un biomarqueur.....	92
Figure 50 : Evolution au cours du temps du handicap.....	94
Figure 51 : Relation entre l'évolution du volume lésionnel et le score Gi	109

Figure 52 : Evolutions de l'activité immunologique et lésionnelle au cours du temps.....	110
Figure 53 : Voies directe (A) et indirecte (B) de présentation des alloantigènes.....	112
Figure 54 : Causes de dysfonction chronique du transplant.....	114
Figure 55 : Influence du traitement immunsupresseur sur le greffon et l'organisme.....	115
Figure 56 : Biomarqueurs / critères de substitution devenir à long-terme du greffon.	118

Sommaire

INTRODUCTION

1	LE REPERTOIRE DES LYMPHOCYTES T	13
1.1	LES LYMPHOCYTES T	13
1.2	LE TCR	13
1.3	LA DIVERSITE DES TCR	15
1.3.1	<i>Organisation des loci</i>	15
1.3.2	<i>Mécanismes de réarrangement et N diversité</i>	16
1.3.3	<i>Sélections positive et négative</i>	17
1.3.4	<i>Estimation et biais</i>	18
1.3.5	<i>Réaction croisée et complexité</i>	19
1.4	ETUDE DU REPERTOIRE T	20
1.4.1	<i>A la surface des cellules T</i>	21
1.4.2	<i>Au niveau des transcrits du TCR</i>	21
1.4.3	<i>Au niveau de l'ADN génomique</i>	25
1.4.4	<i>Optimisations</i>	26
1.4.5	<i>Le suivi d'un clone</i>	28
2	LES METHODES D'ANALYSE DES CDR3 LD	29
2.1	ANALYSE STATISTIQUE DES DISTRIBUTIONS DE LONGUEURS DE CDR3 POUR LA MISE EN EVIDENCE DES BIAIS DU REPERTOIRE DES CELLULES T ET B	29
2.2	RESUME ET DISCUSSION	38

APPROCHES STATISTIQUES

1	APPROCHE « COMPARAISON PAR PAIRES »	42
1.1	DESCRIPTION DE L'APPROCHE.....	42
1.1.1	<i>Le pourcentage de perturbation</i>	42
1.1.2	<i>Approche « comparaison par paires de CDR3 LD »</i>	45
1.1.3	<i>Distance mathématique</i>	46
1.1.4	<i>Positionnement multidimensionnel</i>	47
1.1.5	<i>Comparaison de l'approche « comparaison de distributions » avec le pourcentage de perturbation</i>	48

1.2	EXEMPLE D'APPLICATION : REPRODUCTIBILITE DE LA METHODE IMMUNOSCOPE	53
1.2.1	<i>Matériels et méthodes</i>	54
1.2.2	<i>Analyse statistique</i>	54
1.2.3	<i>Résultats et discussion</i>	55
1.3	MODELISATION D'UN SUIVI DANS LE TEMPS.....	57
1.4	APPLICATION AUX TCLANDSCAPES : ANALYSE NON SUPERVISEE.....	58
1.5	CONCLUSIONS.....	61
2	APPROCHE « FEATURES »	63

APPLICATIONS CLINIQUES

1	LES BIOMARQUEURS	90
2	ANALYSE LONGITUDINALE DE PATIENTS ATTEINTS DE SCLEROSE EN PLAQUES PAR TCLandscape	94
2.1	LA SCLEROSE EN PLAQUES	94
2.2	LES BIOMARQUEURS ET LA SCLEROSE EN PLAQUES.....	95
2.3	LES LYMPHOCYTES T ET LA SCLEROSE EN PLAQUES.....	96
2.4	ANALYSE LONGITUDINALE DE PATIENTS ATTEINTS DE SCLEROSE EN PLAQUES.....	97
2.5	RESUME ET DISCUSSION	108
3	ANALYSE DE PATIENTS TRANSPLANTÉS RENAUDS PAR TCLandscape	111
3.1	REJET D'ALLOGREFFE ET TOLERANCE	111
3.1.1	<i>L'allotransplantation</i>	111
3.1.2	<i>L'alloréconnaissance</i>	112
3.1.3	<i>Le rejet d'allogreffe</i>	113
3.1.4	<i>L'immunosuppression</i>	115
3.1.5	<i>La tolérance</i>	116
3.2	LES BIOMARQUEURS EN TRANSPLANTATION	118
3.2.1	<i>Prévenir le rejet</i>	119
3.2.2	<i>Identifier la tolérance</i>	120
3.3	PROTOCOLE D'ÉTUDE.....	121
3.4	DISCRIMINATION DE LA TOLERANCE OPÉRATIONNELLE ET DU REJET CHRONIQUE.....	124
3.5	RISQUE DE REJET CHEZ DES PATIENTS AYANT UNE FONCTION STABLE DU GREFFON	127
3.6	RESUME ET DISCUSSION	161

CONCLUSION

PERSPECTIVES

APPROCHES STATISTIQUES.....	167
AMELIORATIONS TECHNOLOGIQUES	168
TcLANDSCAPE ET SCLEROSE EN PLAQUES	168
TcLANDSCAPE ET TRANSPLANTATION RENALE.....	169

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

Avant-Propos

Dans le cadre des thématiques développées au sein de l’Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT), l’équipe dirigée par le Pr Jean-Paul Soulillou et le Dr Sophie Brouard étudie les mécanismes immunologiques responsables de la tolérance et du rejet en transplantation rénale, en étroite collaboration avec le service clinique de néphrologie de l’Hôpital de Nantes. Cette thématique de recherche repose sur l’identification de marqueurs biologiques pour la prévention du rejet chronique et pour la détection de la tolérance. Une recherche dans le domaine de la sclérose en plaques a été initiée, depuis quelques années, au sein de cette équipe. L’ITERT, depuis sa création, s’est illustrée dans le développement d’une médecine translationnelle où le patient est intégré au centre de l’étude (Mankoff *et al.*, 2005). La médecine translationnelle est en effet caractérisée par un transfert bidirectionnel de connaissance entre le travail scientifique fondamental et le patient (Horig et Pullman, 2004), dépassant le concept du « bench to bedside ».

Issue d’un essaimage de l’ITERT et fondée en octobre 2002, la société TcLand s'est initialement développée sur l'exploitation de la technologie TcLandscape, dédiée à l'analyse globale du répertoire des lymphocytes T. Aujourd’hui, TcLand s'oriente vers la recherche de biomarqueurs dans la greffe de rein et d'autres pathologies chroniques telle que la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn.

Dans le cadre de la recherche de biomarqueurs dans les domaines de la greffe de rein et de la sclérose en plaques, ce travail de thèse a consisté à proposer de nouvelles méthodes statistiques dédiées à l'exploitation des données TcLandscapes. Au carrefour de l'analyse de données, de l'immunologie et de la clinique, la réalisation de ce travail dans le cadre d'une thèse CIFRE illustre la pluridisciplinarité et la complémentarité des nouveaux groupes de recherche translationnelle, où les partenariats privé/académique/gouvernemental se développent; et mettant en évidence une complexité à la fois scientifique, financière, éthique, réglementaire, législative et pratique (Littman *et al.*, 2007).

Objectifs

Le travail de recherche en analyse de données, décrit dans ce manuscrit, a consisté à mettre au point des approches innovantes pour l'exploitation des données TcLandscapes. Du point de vue statistique et technologique, il s'agissait de traiter objectivement des données qualitatives (spectres d'électrophorèse) et de les combiner à des données quantitatives (PCR quantitative) composant le TcLandscape. Du point de vue méthodologique, différents cadre d'étude ont été rencontrés : mise en évidence de différences entre plusieurs groupes de TcLandscapes, suivis longitudinaux, caractérisation des données produites par la plateforme. Du point de vue clinique, l'objectif est de trouver des marqueurs biologiques permettant de diagnostiquer un état pathologique ou de prédire l'évolution d'une maladie.

La structuration de ce manuscrit respecte la chronologie de développement des approches statistiques : La méthode des « comparaisons de distributions » et l'approche des « features ». Principalement, ces méthodes cherchent à décrire le plus précisément et sans a priori les distributions de longueurs des boucles CDR3 du TCR. Leur description et un exemple d'application technologique compose la première partie de la thèse. Le concept de biomarqueur et les résultats cliniques dans la sclérose en plaques et la transplantation sont exposés dans la deuxième partie de ce manuscrit.

Introduction

1 Le répertoire des lymphocytes T

1.1 Les lymphocytes T

Les cellules T sont des cellules centrales du système immunitaire. Elles reconnaissent, par leur récepteur (T Cell Receptor, TCR), les antigènes, présentés sous la forme de peptides antigéniques par les cellules présentatrices de l'antigène via les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Les lymphocytes T se distinguent au niveau structurel et au niveau fonctionnel, mettant en évidence deux types de diversité (Nikolich-Zugich *et al.*, 2004). La diversité structurelle des lymphocytes T est portée principalement par leur TCR, et notamment au niveau de la structure primaire, secondaire, tertiaire et combinatoire du TCR. Quant à la diversité fonctionnelle, celle-ci est liée aux différences de maturation et à la pluralité des fonctions effectrices. Les mécanismes moléculaires, principalement liés à la formation d'un TCR à la surface des cellules, se produisent dans les premières étapes de la vie d'un lymphocyte. Les mécanismes cellulaires de sélection des lymphocytes T apparaissent dans un deuxième temps. Au final, ces mécanismes contribuent à la génération d'un répertoire diversifié de lymphocytes T. Il s'agit des cellules T présentes à un instant *t* dans l'organisme et permettant d'assurer le bon déroulement de la vie immunitaire. L'étude des lymphocytes est complexe et a nécessité le développement de diverses technologies.

1.2 Le TCR

Le TCR est un hétérodimère transmembranaire formé par l'association covalente de deux chaînes polypeptidiques α et β ou γ et δ (Davis et Bjorkman, 1988) (figure 1). Environ 90% des lymphocytes T expriment des récepteurs TCR $\alpha\beta$ et 10% expriment un TCR $\gamma\delta$ (ce type de TCR n'est pas traité dans ce manuscrit). Chaque chaîne qui compose le TCR est constituée d'un domaine variable (V) à l'extrémité N-terminale, d'un domaine dit "de diversité" (D) (seulement pour les chaînes β et δ), d'un domaine de jonction (J) et d'un domaine constant (C) à l'extrémité C-terminale. Ces domaines correspondent à des segments géniques initialement séparés sur l'ADN et réarrangés de façon aléatoire dans le thymus (cf partie Organisation des loci et Mécanismes de réarrangements et N diversité).

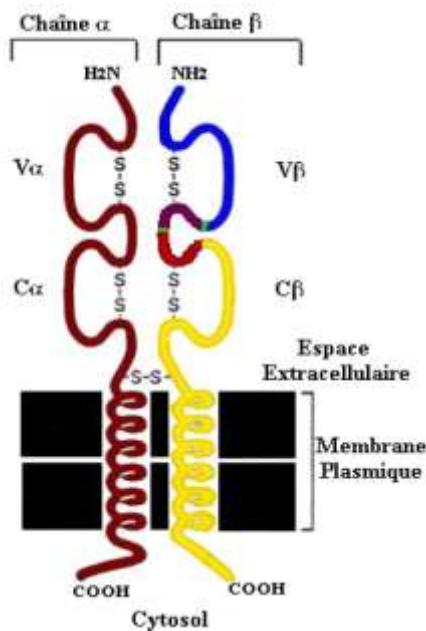


Figure 1 : Schéma du récepteur des lymphocytes T $\alpha\beta$.

Le segment dit variable de ces chaînes présente trois boucles hypervariables CDR1, CDR2 et CDR3 (CDR, Complementarity Determining Region) impliquées dans la reconnaissance spécifique du peptide antigénique (Chothia *et al.*, 1988). L'étude, par cristallographie, de la structure tertiaire du récepteur TCR $\alpha\beta$, en interaction avec la molécule de CMH portant le peptide antigénique, a permis de mettre en évidence le rôle des trois boucles CDR du TCR (Garcia *et al.*, 1996) (figure 2).

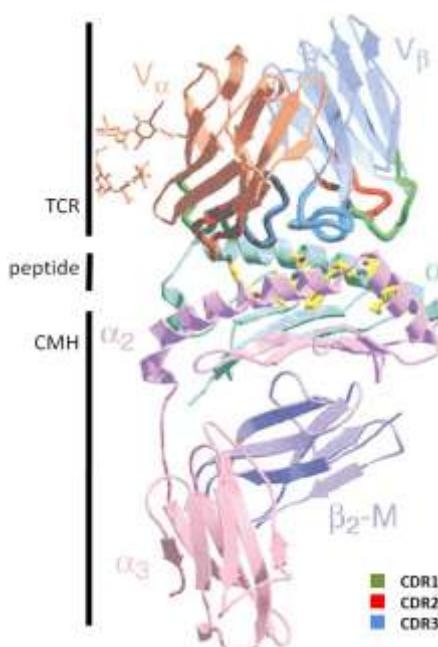


Figure 2 : Structure tridimensionnelle du complexe TCR-CMH-peptide (d'après Reiser *et al.*, 2002).

Les boucles CDR de chaque chaîne sont impliquées dans les contacts moléculaires avec le complexe CMH-peptide, et plus particulièrement les boucles CDR3 (Dietrich *et al.*, 2003). La flexibilité des boucles CDR3 β (Reiser *et al.*, 2002) et CDR3 α (Reiser *et al.*, 2003) permet des changements de conformation importants pour la reconnaissance spécifique du peptide antigénique et peut même s'adapter à différents résidus peptidiques, expliquant en partie le phénomène de réaction croisée (Reiser *et al.*, 2003) (figure 2).

1.3 La diversité des TCR

1.3.1 *Organisation des loci*

Au cours du développement thymique des cellules T, la diversité du répertoire des TCR est générée par des réarrangements somatiques des segments de gènes V, D et J pour les chaînes β et δ , V et J pour les chaînes α et γ . La construction du TCR $\alpha\beta$ est liée à l'organisation des gènes dans leur locus. La découverte des gènes du TCR a été réalisée par Hedrick et collaborateurs (Hedrick *et al.*, 1984). Il existe en effet deux loci, le locus TCR α/δ (Tonegawa, 1983) et le locus TCR β/γ (voir l'annexe 1 sur l'organisation des loci) (Chien *et al.*, 1984). En ce qui concerne la chaîne α , le locus TCR α/δ contient : 54 segments variables V α ; 61 segments de jonction J α , dont au moins 8 ne sont pas fonctionnels et enfin un segment de gène constant C α (Arden *et al.*, 1995). Suivant leur degré d'homologie (75%) (Toyonaga et Mak, 1987), les segments V α sont regroupés dans 41 familles. A quelques différences près, la structure du locus TCR β/γ est semblable à celle du locus TCR α/δ ; sa taille s'élève à 685 kb chez l'homme (Rowen *et al.*, 1996).

En ce qui concerne la chaîne β , les trois types de segments V β , J β et C β sont retrouvés, mais également des segments de diversité D β . Chez l'Homme, le locus contient 63 segments V β , 2 segments D β , 13 segments J β et 2 segments C β (Arden *et al.*, 1995). L'organisation de ce locus est moins linéaire en comparaison avec le locus TCR α , du fait de la présence de deux groupes 1D β -6J β -1C β en tandem.

La nomenclature de Arden (Arden *et al.*, 1995) a été utilisée dans l'ensemble de ce manuscrit afin d'éviter une confusion avec les articles déjà publiés par notre équipe. Le passage à la nomenclature internationale de l'IMGT est envisagé pour nos prochains articles (base de

données ImMunoGeneTics (Lefranc, 2003)) (voir l'annexe 2 sur les correspondances des 2 nomenclatures).

1.3.2 Mécanismes de réarrangement et N diversité

Un mécanisme original de réarrangement des gènes V(D)J conduit à une grande diversité de transcrits du TCR. Plus précisément, le processus de recombinaison V(D)J (les segments de diversité D n'interviennent que dans le cas de la chaîne β) consiste à concaténer un segment V, un segment D et un segment J sélectionnés au hasard parmi tous les segments disponibles (figure 3). Dans le cas des chaînes α du TCR, les segments de gènes V et J sont joints directement. La réaction de recombinaison est menée par un complexe enzymatique agissant sur des sites spécifiques, les séquences-signal de recombinaison, qui flanquent les segments V, D et J (Tonegawa, 1983). Ce processus combinatoire d'association aléatoire entre les segments de gène V, D et J constitue le premier degré de diversité du répertoire des cellules T (Davis et Bjorkman, 1988; Kurosawa et Tonegawa, 1982).

Toutefois, ce processus ne suffit pas à expliquer la diversité du répertoire observée dans les modèles animaux (Arstila *et al.*, 1999) ou chez l'homme (Arstila *et al.*, 2000). Le processus de recombinaison est lui-même générateur de diversité car les étapes de jonction $V\alpha-J\alpha$, $D\beta-J\beta$ et $V\beta-DJ\beta$ sont relativement lâches quant à la position exacte de la jonction de recombinaison, ce qui induit des glissements dans la séquence (Lieber *et al.*, 1988). De plus, la jonction entre les segments n'est pas forcément directe et la machinerie de recombinaison peut permettre l'ajout de nucléotides entre les segments de gènes. Il s'agit du mécanisme de N-addition, dont l'enzyme Terminal deoxynucleotide Transferase est responsable (figure 3) (Gilfillan *et al.*, 1993). La région CDR3, se situant au niveau des jonctions de segments des gènes V(D)J, est la région dont la diversité est la plus forte pour le TCR $\alpha\beta$ (Davis et Bjorkman, 1988). C'est elle qui est le plus impliquée dans la reconnaissance spécifique du peptide.

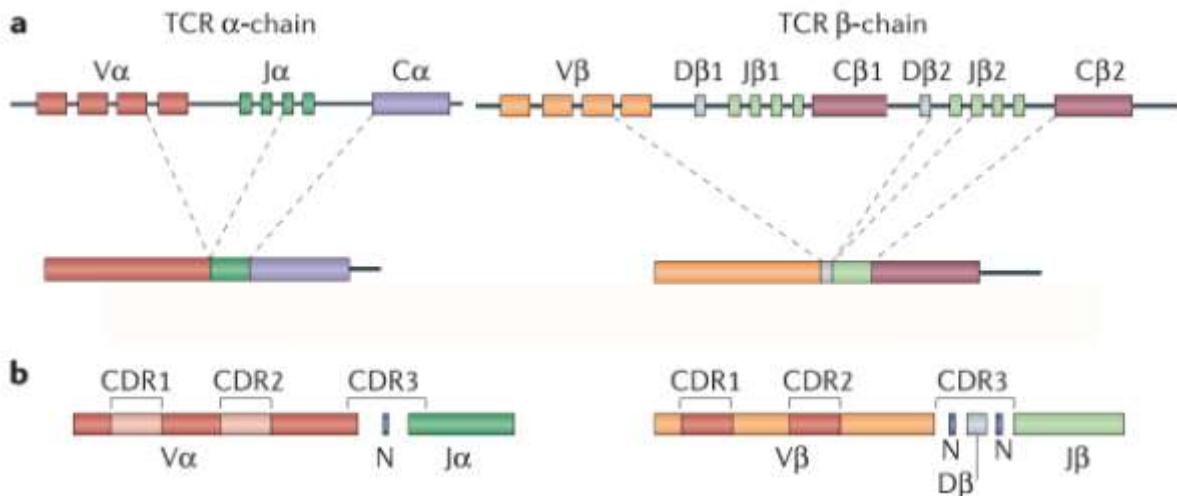


Figure 3 : Génération de la diversité du TCR par recombinaison somatique des segments de gènes. a) Organisation génique des loci α et β et exemple de combinaison génique. b) Régions d'hypervariabilité CDR et localisation de la N diversité indiquée par la lettre N (d'après (Turner *et al.*, 2006)).

Enfin, l'appariement entre une chaîne β et une chaîne α réarrangées pour former un TCR fonctionnel contribue également à augmenter la diversité du répertoire des lymphocytes T.

1.3.3 Sélections positive et négative

Le répertoire des lymphocytes T se constitue au niveau du thymus. Les thymocytes, précurseurs des lymphocytes T, réarrangent de manière séquentielle les gènes codant pour leur chaîne β , puis, en cas de réarrangement fonctionnel, les gènes codant pour leur chaîne α . Les cellules T portant un récepteur $\alpha\beta$ fonctionnel sont ensuite sélectionnées positivement, puis négativement dans le thymus (pour revue (Starr *et al.*, 2003)). La sélection positive permet de sélectionner les cellules T capables de reconnaître les molécules du CMH du soi. L'interaction faible, établie entre le TCR nouvellement réarrangé et la molécule du CMH du soi, génère des signaux de survie pour ces lymphocytes qui pourront poursuivre leur développement. La sélection négative conduit, en revanche, à l'élimination des cellules T exprimant un récepteur qui reconnaît avec une trop forte affinité les peptides du soi associés aux molécules du CMH du soi (Starr *et al.*, 2003). Cette dernière sélection est absolument indispensable pour éviter le développement de maladies auto-immunes.

1.3.4 Estimation et biais

L'évaluation de la diversité du répertoire T et de son utilisation est un enjeu thérapeutique majeur. Une diversité réduite est associée à une immunodéficience (Goldrath et Bevan, 1999). Un biais de diversité lié à la sélection de lymphocytes T peut être la manifestation d'une réponse spécifique à l'encontre d'un pathogène ou d'une maladie auto-immune (Turner *et al.*, 2006). Le répertoire est, par essence, une entité en constante évolution. L'évaluation de la diversité du répertoire TCR $\alpha\beta$, et plus particulièrement de la chaîne β du TCR, a permis d'obtenir des estimations du nombre de TCR différents présents dans l'organisme. La mesure directe de la diversité est quasiment impossible aujourd'hui. Il s'agit donc d'inférer sur le nombre de TCR disponibles. Différentes estimations théoriques ont été menées.

La première estimation de la diversité a été proposée pour le répertoire T $\alpha\beta$ par l'équipe de Davis chez la souris (Davis et Bjorkman, 1988). Il s'agit d'une estimation théorique basée sur l'ensemble des combinaisons géniques possibles entre les gènes V(D)J, la prise en compte des insertions de nucléotides et la combinaison aléatoire des chaînes α et β . Avant les sélections thymiques, le répertoire T $\alpha\beta$, s'élèverait ainsi à 10^{15} TCR différents (Davis et Bjorkman, 1988). Cette diversité maximale est néanmoins incompatible avec le nombre de cellules T présentes chez une souris, impliquant que ce chiffre soit surestimé. En conclusion, la machinerie de recombinaisons ne génère pas toutes les séquences de façon équiprobable. D'autres estimations basées sur des données expérimentales obtenues par l'analyse des séquences des transcrits codant pour les régions CDR3 ont donc été effectuées. Les travaux de Arstilla *et al.* chez l'homme et de Casrouge *et al.* et de Cabaniols *et al.* chez la souris, ont permis d'évaluer le nombre de TCR $\alpha\beta$ à $1.85 \cdot 10^6$ chez la souris (Casrouge *et al.*, 2000) (Cabaniols *et al.*, 2001), et à un nombre entre 10^7 et 10^8 chez l'homme (Arstila *et al.*, 1999). Dans ces analyses, il faut noter qu'un biais dû au séquençage direct peut apparaître du fait qu'une petite fraction seulement du répertoire est réellement analysée ; surestimant peut-être encore la diversité du répertoire. Il apparaît par ailleurs que les segments V et J ne sont pas utilisés avec la même fréquence. Certains réarrangements sont favorisés du fait d'homologie de séquences (Gerstein et Lieber, 1993) ou de proximité sur le chromosome tel qu'il a été montré pour la chaîne α du TCR (Pasqual *et al.*, 2002) (Fuschiotti *et al.*, 2007).

Ainsi, la combinaison V-J α ne serait pas entièrement aléatoire mais dépendrait des positions respectives des gènes V α et J α au niveau du locus. Globalement selon Fuschiotti *et al.*, 44-56% des possibilités combinatoires sont réellement exploitées par le système immunitaire (Fuschiotti *et al.*, 2007). Cette taille restreinte du répertoire α disponible par rapport à la taille du répertoire théorique serait plutôt due à une limitation au niveau combinatoire plutôt qu'aux sélections post-thymiques.

Un biais peut être défini comme une déviance par rapport à la situation physiologique ou par rapport à un répertoire naïf (c'est-à-dire n'ayant pas rencontré l'antigène). La réponse à un antigène induit la sélection puis l'expansion de cellules T provoquant ainsi un biais dans le répertoire (Turner *et al.*, 2006). Les concepts de répertoire « privé » ou « public », en référence aux réponses « privées » ou « publiques », ont été introduits pour différencier les phénomènes spécifiques à l'individu par rapport à ceux partagés par l'ensemble d'une population (Cibotti *et al.*, 1994). Le terme de répertoire « privé » est employé lorsque les TCR sélectionnés contre un même antigène, par des individus partageant le même système CMH, sont différents d'un individu à l'autre. En revanche, un répertoire public correspond à l'ensemble des clones communs mobilisés par tous les individus en réponse à un antigène donné. Ce concept, difficile à démontrer chez l'homme, a été largement observé dans les modèles animaux.

1.3.5 Réaction croisée et complexité

Le concept de stéréospécificité, faisant référence au modèle déterministe « clé-serrure », permet de résoudre le problème de la reconnaissance antigénique (Kupiec et Sonigo, 2000). Cependant, les notions de réaction croisée (Mason, 1998) et de complexité du répertoire (Naumov *et al.*, 2006) nuancent la notion de spécificité entre le TCR et le complexe CMH-peptide.

La réaction croisée est définie par la possibilité pour un lymphocyte T de reconnaître différents peptides accrochés au complexe du CMH du soi. Pour Mason *et al.*, la haute spécificité du lymphocyte T vis-à-vis de l'antigène est une caractéristique reconnue pour l'activation de la cellule T (Mason, 1998). Cependant, une réponse efficace aux antigènes implique que les cellules T soient largement « crossréactives » par réaction, compte tenue de l'infinie variété des antigènes. Une réaction croisée est donc tolérée du moment que les

cellules ne reconnaissent pas le « soi » et ne mènent pas à l’auto-immunité. Reiser *et al.* soutiennent cette hypothèse en raison du phénomène de dégénérescence observé à partir d’expériences de la fixation de la région CDR3 de la chaîne α du TCR (Reiser *et al.*, 2003). En effet, la même région CDR3 α peut s’adapter structurellement à différents résidus peptidiques ; la flexibilité de la boucle CDR3 permet donc d’expliquer structurellement le phénomène de réaction croisée (Reiser *et al.*, 2003).

La complexité des répertoires, telle que définie par Naumov *et al.*, est une composante capitale de la défense contre les pathogènes (Naumov *et al.*, 2006). Il s’agit de l’existence de différents clones T, dirigés contre le même épitope, mais avec une affinité différente. Cette dégénérescence implique qu’en fonction de la charge du pathogène, certaines lignées s’activent plutôt que d’autres. La robustesse de la mémoire T est ainsi corrélée à la structure polyclonale des répertoires.

La complexité associée au phénomène de réaction croisée, fournirait la meilleure manière de se défendre ; une stratégie qui supplanterait la génération d’un maximum de diversité.

1.4 Etude du répertoire T

Pour décrire le répertoire des lymphocytes T, différentes technologies ont été développées : depuis l’exploration des TCR à la surface des cellules, jusqu’à celle de l’ADN génomique réarrangé dans le noyau, en passant par l’étude des transcrits codant pour le TCR. Compte tenu du fait que la séquence de chaque TCR est unique, il est nécessaire de partitionner le répertoire pour pouvoir le décrire. Sur la base de critères liés à la composition génique du TCR, le répertoire est donc scindé en groupes de TCR, en fonction du gène V ou des combinaisons de gènes V-J qui le composent. Ces groupes de TCR peuvent être décrits quantitativement et/ou qualitativement. La description quantitative donne une information sur la proportion relative d’un groupe de TCR par rapport à un autre. La description qualitative est basée sur l’étude de la « clonalité ». Pour définir la « clonalité », il faut rappeler la notion de clone : un clone est une population de cellules T identiques, issues de la sélection d’une cellule T, du fait de sa forte affinité pour un antigène (sélection), puis de son expansion clonale (multiplication cellulaire).

La « clonalité » est donc liée à la présence de clones au sein d'un groupe de TCR (définis structurellement). Trois niveaux de clonalité sont définis :

- la « polyclonalité » est illustrée par un grand nombre de lymphocytes avec des TCR différents et par l'absence de clones majoritaires ;
- la « monoclonalité » est liée à la sélection d'un seul clone présent de manière majoritaire ;
- l'« oligoclonalité » est un terme employé lors de la présence conjointe de plusieurs expansions clonales au sein du groupe de TCR.

Les différentes technologies cherchent à être exhaustives, c'est-à-dire à ne pas ignorer une catégorie de TCR, et à avoir une sensibilité toujours accrue afin de détecter des populations cellulaires peu représentées.

1.4.1 A la surface des cellules T

La caractérisation des TCR à la surface des lymphocytes T, a été initiée par le biais du développement des anticorps monoclonaux (McHeyzer-Williams et Davis, 1995). Dirigés contre la chaîne V β du TCR, ils permettent de quantifier et d'isoler les lymphocytes T en fonction du gène V β qui les composent. Aujourd'hui, 70% des différentes familles V β constituant le répertoire humain peuvent être identifiées grâce à une analyse par cytométrie de flux (MacIsaac *et al.*, 2003). La possibilité de trier et d'isoler ces cellules en fonction du gène V β composant leur TCR est très intéressante pour des explorations ultérieures. En revanche, cette technique est uniquement quantitative et ne permet pas de déterminer la nature de la sous-population étudiée. En effet, il n'est pas possible de savoir si les cellules triées sont des lymphocytes portant tous un TCR différent ou s'il s'agit d'un clone.

1.4.2 Au niveau des transcrits du TCR

1.4.2.1 La séquence de la région CDR3

La caractérisation des transcrits de TCR exprimés par les lymphocytes T est un moyen détourné d'étudier la diversité des TCR présents à la surface des lymphocytes. Cette approche sous-entend que le transcriptome est l'image fidèle du protéome. Pour une famille V β donnée, la relation entre l'expression des transcrits et la quantité de TCR à la surface a

montré une corrélation satisfaisante entre le protéome et le transcriptome du TCR (Robbins *et al.*, 2004). Différentes technologies ont donc été développées au niveau de l'analyse du transcriptome. La plus exhaustive consiste à séquencer l'ensemble des transcrits codant pour le TCR. Cette approche nécessite trois étapes : amplification, clonage et enfin séquençage. Deux stratégies différentes peuvent être utilisées pour l'étape d'amplification : une stratégie classique avec l'utilisation d'amorces spécifiques de chaque gène V β (Arstila *et al.*, 1999) ; une stratégie « non biaisée » basée sur des méthodes d'amplification non spécifique (méthodes de transcription inverse ancrée « anchored RT-PCR » - comme pour la chaîne δ (Loh *et al.*, 1989), la chaîne β (Six, 1991) et la chaîne α (Marche *et al.*, 1993) - ou par une adaptation de la méthode 5' RACE (Robbins *et al.*, 2004)). Dans la mesure où le séquençage systématique est assez lourd et coûteux, d'autres stratégies permettant d'accéder à la séquence des TCR ont été récemment développées.

Ainsi, pour approcher au plus près la séquence de la région CDR3 des transcrits du TCR, la méthode « T arrays » de Bonarius *et al.* (Bonarius *et al.*, 2006) utilise des puces universelles à oligonucléotides aléatoires, contenant les 4096 séquences pouvant être générées à partir de 6 nucléotides (hexamères). À la suite d'une amplification V-J spécifique, les transcrits sont déposés sur la puce. En fonction de la séquence de la zone de diversité N-D-N de la région CDR3, les transcrits vont s'hybrider aux hexamères complémentaires sur la puce et être révélés par une sonde fluorescente J β . Les dépôts fortement réactifs permettent d'identifier les clones surreprésentés et de séquence partiellement connue. En multipliant ce procédé pour toutes les combinaisons V-J, un balayage exhaustif du répertoire est alors possible (Bonarius *et al.*, 2006).

1.4.2.2 La longueur de la région CDR3

Si la séquence de chaque TCR est l'information ultime, la longueur de la boucle CDR3, en fonction des gènes qui constituent le TCR, est aussi très importante (McHeyzer-Williams et Davis, 1995). Les technologies Immunoscope (Cochet *et al.*, 1992) et Spectratyping (Gorski *et al.*, 1994) révèlent la distribution des longueurs de la boucle CDR3 (CDR3 Length Distribution, CDR3 LD) en fonction des gènes V-J qui la composent. La technologie Immunoscope permet de révéler la diversité du répertoire ou de détecter d'éventuelles expansions clonales. Les résultats bruts issus de cette technologie sont des spectres d'électrophorèse représentant, pour un groupe de transcrits donné, les différentes longueurs de la boucle CDR3 (figure 4).

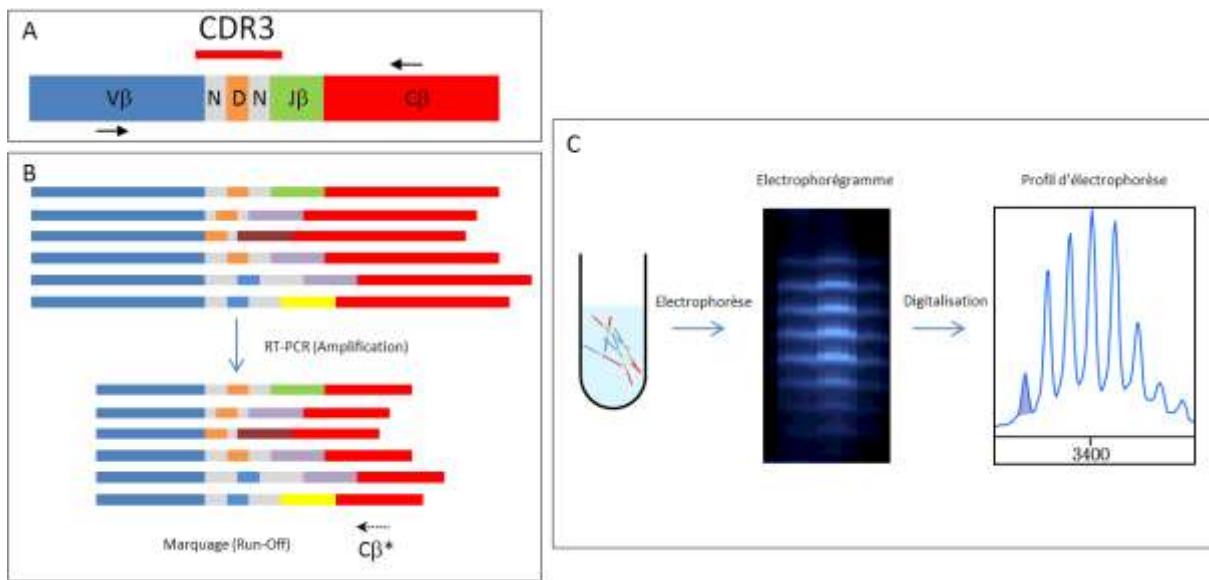


Figure 4 : Détails de l'approche Immunoscope. A : Représentation d'un transcript de TCR issu d'un gène V β particulier et positionnement des amores utilisées pour l'amplification (flèches). B : Amplification d'un groupe de transcrits issus du même V β et ayant des zones CDR3 de composition génique (N, D et J) et de longueurs différentes. C : Détail de la procédure pour obtenir la CDR3 LD à partir des fragments marqués en B (adapté de Miqueu *et al.* (Miqueu *et al.*, 2007)).

D'après la figure 4, à partir d'un groupe de transcrits issus du même gène V β et ayant des zones CDR3 de composition génique (N, D et J) et de longueur différentes, une amplification puis un marquage des produits de PCR sont réalisés. Chargés sur un gel d'électrophorèse, les fragments migrent en fonction de leur longueur, pour former un « spectratype » (une succession de bandes espacées de trois nucléotides), qui, une fois digitalisé se présentera sous la forme d'un spectre d'électrophorèse.

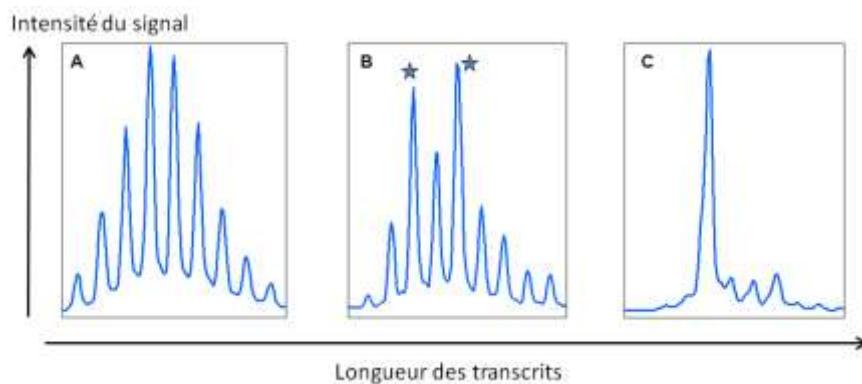


Figure 5 : Exemples de CDR3 LD (à partir de Miqueu *et al.* (Miqueu *et al.*, 2007)).

Comme le montre la figure 5, il existe différents types de profils. Le profil A est un profil avec une distribution gaussienne des longueurs de CDR3 qui caractérise typiquement les individus sains (Gorski *et al.*, 1994; Pannetier *et al.*, 1993), les rats naïfs (Douillard *et al.*, 1998) et les souris naïves (Cochet *et al.*, 1992) ou encore les cellules stimulées par un super antigène (Musette *et al.*, 1996). Ce type de profil témoigne de la présence d'une population polyclonale. Les profils B et C sont plus « perturbés » et révèlent la présence d'expansions clonales. Le profil B est associé à une population oligoclonaire avec la présence de deux expansions (identifiées par des étoiles, figure 5B) qui perturbent la distribution gaussienne des longueurs de CDR3. Le profil C témoigne de la sélection majoritaire de cellules caractérisées par des TCR présentant une même longueur de CDR3. Toutefois, ces cellules n'ont pas nécessairement la même séquence de CDR3. Seul le séquençage des transcrits, représentés par ce pic, permet de valider le caractère oligoclonal (séquences différentes) ou monoclonal du pic (séquence identique).

Cette technologie a été utilisée dans différents modèles animaux (par exemple chez les rongeurs (Cochet *et al.*, 1992; Douillard *et al.*, 1998) et le porc (Baron *et al.*, 2001)) ainsi que chez l'Homme (Gorski *et al.*, 1994) (Pannetier *et al.*, 1993), dans différentes pathologies (sclérose en plaques (Laplaud *et al.*, 2004; Muraro *et al.*, 2005), leucémie (Arons *et al.*, 2005), Graft Versus Host Disease (Tsutsumi *et al.*, 2004), HIV (Gorochov *et al.*, 1998), tuberculose (Tully *et al.*, 2005) ou cancer (Coulie *et al.*, 2001)) et pour différents récepteurs antigéniques autres que le TCR $\alpha\beta$ (Ig (Baranzini *et al.*, 1999) et TCR $\gamma\delta$ (Dechanet *et al.*, 1999; Hviid *et al.*, 2000)).

1.4.2.3 La diversité des transcrits

L'analyse par hétéroduplex (Giachino *et al.*, 1994) (Wack *et al.*, 1998) permet aussi d'approcher la « clonalité » d'un sous groupe de transcrits. La méthode est basée sur la formation de duplex précédemment développée et utilisée pour les études de polymorphisme génétique (Delwart *et al.*). Elle ne permet pas d'accéder à la taille de la région CDR3 et ne donne qu'une information sur l'homogénéité/hétérogénéité des transcrits. Dans la figure 6 issue de l'article de van Dongen *et al.* (Consortium BIOMED-2), trois types d'échantillons sont testés ; illustrant pour chacun, un type de populations de lymphocytes T : monoclonale, oligoclonaire ou polyclonale (van Dongen *et al.*, 2003). En

fonction du type de populations, des bandes précises se forment (homoduplex) ou des « paquets diffus » (hétéroduplex).

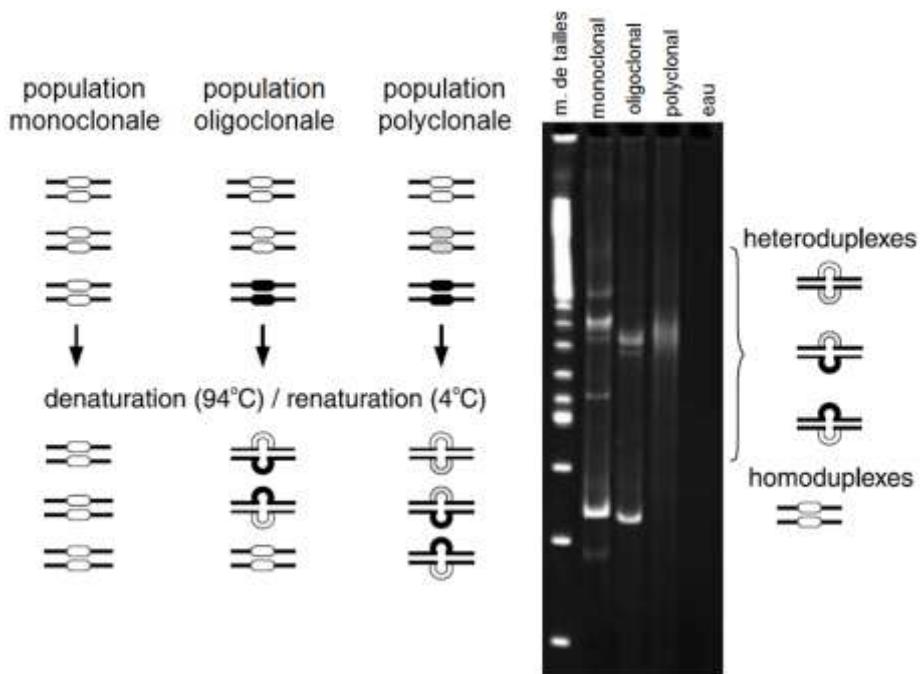


Figure 6 : Analyse hétéroduplex (d'après van Dongen *et al.* (van Dongen *et al.*, 2003)).

La méthode AmpliCot est basée sur l'étude des cinétiques d'hybridation de l'ADN, grâce à l'utilisation des duplex (Baum et McCune, 2006). Dans cette technologie, la diversité des séquences d'un échantillon est proportionnelle au temps requis pour l'hybridation de fragments d'ADN. En utilisant conjointement des amorces de gènes V et de gènes J, il est possible par la formation des homoduplex, d'évaluer la pureté des transcrits ayant une combinaison génique V-J particulière (Arstila, 2006; Baum et McCune, 2006).

1.4.3 Au niveau de l'ADN génomique

Pour l'étude des réarrangements au niveau de l'ADN génomique, la méthode de Southern blot a servi de référence pour l'étude du répertoire combinatoire au début des années 1990 (Breit *et al.*, 1991). Cette approche permet effectivement une représentation directe des réarrangements et l'élimination des biais dus à la régulation de la transcription. La combinaison d'enzymes de restriction et de sondes au niveau des segments J et pour tous types de récepteurs incluant les chaînes TCR α et TCR δ a aussi été majeure (Gallagher *et al.*, 2001).

1.4.4 Optimisations

1.4.4.1 Le multiplexage

L'optimisation de la méthode Immunoscope et des analyses par hétéroduplex a été récemment apportée par le consortium BIOMED-2 (van Dongen *et al.*, 2003). Dans le contexte d'étude des maladies lymphoprolifératives, des amorces permettant d'étudier les répertoires TCR β , γ et δ ainsi qu'une partie de celui des immunoglobulines ont été validées. Compte tenu du grand nombre de gènes à tester, le multiplexage des PCR a été utilisé par le consortium, cette méthode permettant de limiter significativement le nombre d'expériences ainsi que l'ont montré Akatsuka *et al.* (Akatsuka *et al.*, 1999). Le multiplexage a aussi été adapté pour la détection simultanée des multiples gènes V et J à partir d'ADN génomique (Mancini *et al.*, 2001).

1.4.4.2 Méthodes quantitatives

A côté de ces méthodes « qualitatives » d'analyse du répertoire des cellules T, des méthodes quantitatives sur le transcriptome ont été développées. Lang *et al.* (Lang *et al.*, 1997) ont utilisé une approche semi-quantitative permettant de quantifier, par PCR, les transcrits V β . Avec le souci d'une quantification rapide sans étape de PCR, Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2007) ont mis au point une puce à oligonucléotides dédiée à la chaîne β du TCR pour étudier les lymphocytes T mobilisés lors de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques. Cette puce contenant 27 sondes spécifiques pour les gènes V β et 13 sondes spécifiques pour les gènes J β , a aussi permis une comparaison avec des résultats de cytométrie de flux. Une approche similaire a été développée par Gra *et al.* lors de la mise au point d'une puce dédiée au TCR γ (Gra *et al.*, 2007).

1.4.4.3 Combinaison d'approches

L'alliance des technologies permettant une vue à la fois qualitative et quantitative du répertoire des lymphocytes T représente un progrès majeur. Afin de quantifier les résultats obtenus par Southern blot, la PCR quantitative des réarrangements V-J (Fuschiotti *et al.*, 2007; Pasqual *et al.*, 2002) a été entreprise. Pilch *et al.* (Pilch *et al.*, 2002) ont aussi combiné la méthode de Spectratyping à un panel d'anticorps dirigés contre 21 TCR V β . Au niveau du transcriptome, les équipes de Pannetier (Lim *et al.*, 2002) et de Soulillou (Sebille *et al.*, 2001) ont permis d'apporter une dimension quantitative à l'étude de la clonalité obtenue par la

méthode Immunoscope. Dans ce dernier exemple, l'analyse quantitative consiste à mesurer, pour chaque famille $V\beta$, la quantité de transcrits ; celle-ci est représentée par un histogramme bleu à la droite de chaque distribution de longueurs de CDR3 dans la figure 7. Les quantités des familles $V\beta$ sont normalisées par la quantité d'un gène de ménage, l'HPRT (histogramme mauve dans la figure 7). De plus, pour chaque famille $V\beta$, les différences locales existant entre le profil étudié (profil rouge dans le médaillon de la figure 7) et un profil de référence (profil vert dans le médaillon de la figure 7) sont déterminés d'après la méthode développée par Gorochov *et al.* (Gorochov *et al.*, 1998).

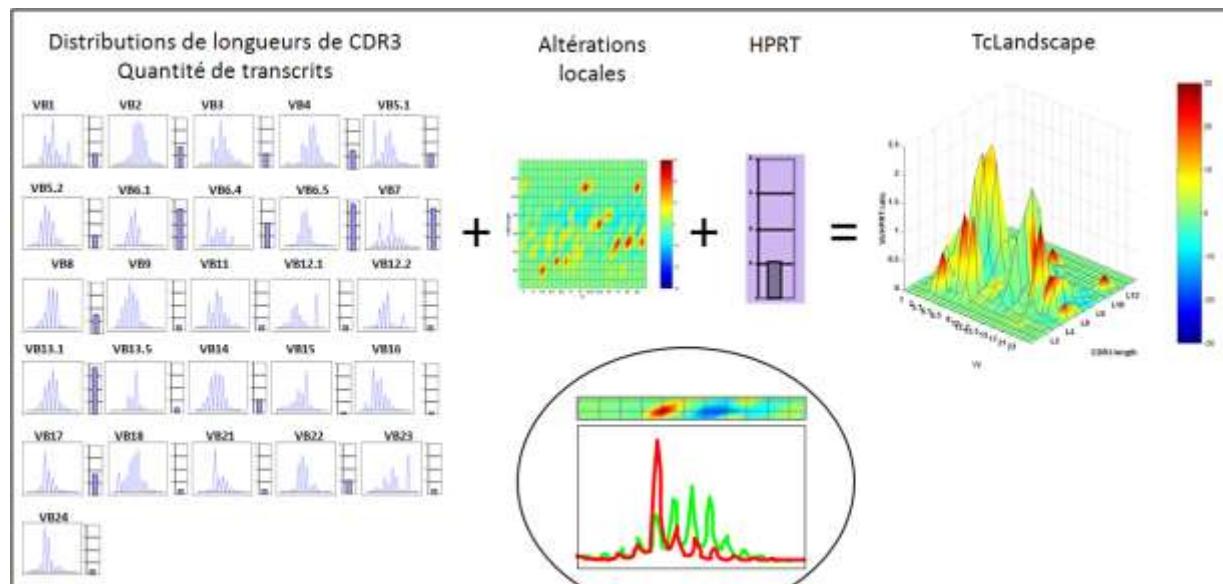


Figure 7 : Description de la « construction » d'une représentation TcLandscape.

Afin d'appréhender d'un seul « coup d'œil » l'ensemble des données issues de l'analyse qualitative et quantitative, une représentation en quatre dimensions (espace à trois dimensions et code couleur) a été développée. Cette représentation, nommée TcLandscape, révèle l'ensemble du répertoire des lymphocytes T d'un individu, à un temps donné. Elle permet aussi de repérer facilement les modifications du répertoire par rapport à un profil de référence et d'analyser précisément quelles familles $V\beta$ sont impliquées dans la réponse immunitaire et de quelle manière (figure 7). La représentation graphique des données est composée de 26 distributions de 13 longueurs de CDR3, de 26 quantités de transcrits pour les gènes $V\beta$ et d'une valeur de l'HPRT permettant de normaliser la valeur des quantités de transcrits. Chaque CDR3 LD, constituée de 13 valeurs, est liée à une quantité de transcrits. Le code couleur utilisé dans la représentation graphique, est issu de la comparaison des

distributions à une distribution moyenne pseudo-gaussienne (Gorochov *et al.*, 1998) (voir l'annexe 3 sur les gènes V β , nommés selon Arden, et analysés par le TcLandscape).

1.4.5 Le suivi d'un clone

Les approches globales permettent une vision étendue de l'ensemble du répertoire à un temps donné. Cependant, le suivi d'un clone précis peut aussi être particulièrement important. Gallard *et al.* ont mis au point une méthode, basée sur la PCR quantitative, permettant de quantifier la fréquence d'un clone donné au sein d'une population de lymphocytes T (quantification d'une réponse publique précise) (Gallard *et al.*, 2002). Cette méthode peut être appliquée à tous les systèmes où le clone d'intérêt peut se retrouver en trop faible quantité pour être détecté par cytométrie de flux ou par les tetramères (Altman *et al.*, 1996). En combinant le tri par cytométrie de flux et le Spectratyping, Spieser et al. ont permis de découvrir, à partir d'un répertoire humain, un clone T spécifique d'un antigène de tumeur (mélanome) ouvrant ainsi la possibilité d'une immunothérapie dirigée (Speiser *et al.*, 2006).

2 Les méthodes d'analyse des CDR3 LD

2.1 Analyse statistique des distributions de longueurs de CDR3 pour la mise en évidence des biais du répertoire des cellules T et B

Statistical analysis of CDR3 length distributions for the assessment of T and B cell repertoire biases

Patrick Miqueu, Marina Guillet, Nicolas Degauque, Jean-Christophe Doré, Jean-Paul Soulillou, Sophie Brouard.

Publié dans Molecular Immunology (2007) 44 : 1057-1064

Une étude bibliographique des différentes méthodes statistiques développées pour l'analyse des CDR3 LD a été réalisée et a fait l'objet d'une revue publiée en janvier 2007.



Review

Statistical analysis of CDR3 length distributions for the assessment of T and B cell repertoire biases

Patrick Miqueu ^{a,b}, Marina Guillet ^b, Nicolas Degauque ^a, Jean-Christophe Doré ^c,
Jean-Paul Soulillou ^a, Sophie Brouard ^{a,*}

^a Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.), Unité 643, “Immunointervention dans les Allo et Xénotransplantations” and Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T.), CHU Hôtel-Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France

^b TcLand S.A., CHU Hôtel-Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France

^c Muséum National d’Histoire Naturelle, UMR 5154 CNRS/MNHN – USM 0502 MNHN, 63 rue de Buffon, 75005 Paris, France

Received 24 May 2006; accepted 15 June 2006

Available online 22 August 2006

Abstract

Complementarity-determining region 3 (CDR3) length distribution analysis explores the diversity of the T cell receptor (TCR) and immunoglobulin (Ig) repertoire at the transcriptome level. Studies of the CDR3, the most hypervariable part of these molecules, have been frequently used to identify recruitment of T and B cell clones involved in immunological responses. CDR3 length distribution analysis gives a clear perception of repertoire variations between individuals and over time. However, the complexity of CDR3 length distribution patterns and the high number of possible repertoire alterations per individual called for the development of robust data analysis methods. The goal of these methods is to identify, quantify and statistically assess differences between repertoires so as to offer a better diagnostic or predictive tool for pathologies involving the immune system. In this review we will explain the benefit of analyzing CDR3 length distribution for the study of immune cell diversity. We will start by describing this technology and its associated data processing, and will subsequently focus on the statistical methods used to compare CDR3 length distribution patterns. Finally, we will address the various methods for assessing CDR3 length distribution gene signatures in pathological states.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Spectratyping; Immunoscope; Immunoglobulin; T cell receptor; CDR3; Statistical analysis

1. Studying diversity

T and B cells are central players of adaptive immunity which is defined by its exquisite specificity for distinct molecules and its ability to remember and respond more vigorously to repeated exposures to the same molecules. To ensure an efficient protection of the organism and to distinguish among different, even closely related, pathogenic agents, a huge number of different T and B cell clones are generated (Arstila et al., 1999). This defense mechanism is based on the recruitment, selection and expansion of specific T and B cell clones, dedicated to the destruction of pathogenic agents. The specificity of antigen recognition is

ensured by the T cell receptor (TCR) present at the surface of T cells (Tonegawa, 1983) and immunoglobulins (Ig) produced by B cells (Kurosawa and Tonegawa, 1982). Each T cell clone is characterized by its own TCR and each B cell clone by its own Ig. T and B cell diversity is thus dependent on the TCR and Ig. The study of these molecules allows for the identification of biases in the repertoire usage and clones mobilized during immunological responses.

The complementarity-determining region 3 (CDR3) is the most polymorphic region of both the TCR and Ig and interacts with antigen in a specific manner. T and B cell diversity thus correlates with CDR3 variability. Several mechanisms have been described to generate the broad diversity of CDR3. Considering the TCR $\alpha\beta$, which is made up of an α chain and a β chain, the CDR3 is composed of sequences encoded by V and J gene segments in the α chain and sequences encoded by V, D and J gene segments in the β chain. Random selection and

Abbreviations: CDR3, complementarity-determining region 3; TCR, T cell receptor; Ig, immunoglobulin; PCR, polymerase chain reaction

* Corresponding author. Tel.: +33 2 40 08 74 17; fax: +33 2 40 08 74 11.

E-mail address: Sophie.Brouard@univ-nantes.fr (S. Brouard).

association of respectively the V–J and V–D–J segments during somatic gene rearrangements create a combinatorial diversity (Davis and Bjorkman, 1988; Tonegawa, 1983). This mechanism is complemented by a junction diversity created by nucleotide deletions/insertions at the V–J junctions for both chains and D–J junction for the β chain. This complex rearrangement mechanism should in theory allow for around 10^6 different CDR3 sequences for the V β chain of the TCR in human blood (Arstila et al., 1999). Sequencing of all mRNA encoding the CDR3 can be performed to assess this variability. This is an exhaustive and precise method, albeit expensive and time-consuming and thus rendering it difficult to apply in the context of immune monitoring. This approach can be used to identify the statistically more frequent CDR3 sequences in the transcriptome. The high frequency of a specific CDR3 sequence illustrates the expansion of its corresponding cell clone. The alternative method of CDR3 length distribution analysis (Cochet et al., 1992; Gorski et al., 1994) is an easier approach to characterize the presence of clonal expansions. CDR3 length distribution analysis has been performed in rodents (Cochet et al., 1992; Douillard et al., 1998), swine (Baron et al., 2001) and humans (Gorski et al., 1994) to assess mobilization of Ig (Baranzini et al., 1999), TCR $\gamma\delta$ (Dechanet et al., 1999; Hviid et al., 2000) and TCR $\alpha\beta$ (Cochet et al., 1992) repertoires under physiologic conditions as well as in various pathological situations. For example, various approaches to CDR3 length distribution analysis have been employed successfully in numerous studies including in multiple sclerosis (Laplaud et al., 2004; Muraro et al., 2005), hairy cell leukemia (Arons et al., 2005) and graft-versus-host disease following allogeneic stem cell transplantation (Tsutsumi et al., 2004). A highly focused immune repertoire has been shown to be associated with successful containment of HIV (Gorochov et al., 1998), *Mycobacterium tuberculosis* infection (Tully et al., 2005) and clinically effective T cell responses in patients with cancer (Coulie et al., 2001). Finally, precise assessment of T cell repertoire diversity is a powerful tool to identify antigen specific T cells, and gives new

insight into how a focused lymphocyte population can govern the immune status.

The CDR3 length distribution analysis method subdivides the CDR3-coding mRNA populations into groups, based on V or V–J gene composition and transcript length. This method analyses the effect of the junction diversity for each V or V–J gene composition tested. The CDR3 length distribution, obtained for each V or V–J gene combination, can identify clonal alterations and expansions. Indeed, following the presentation of a foreign antigen or altered self-antigen by self-major histocompatibility complex molecules, T cell clones are specifically selected and expanded. These selections and expansions lead to modification of the presumed Gaussian-like CDR3 length distribution encountered in physiological conditions (Pannetier et al., 1995). Due to the large number of different V and J genes that could potentially constitute the TCR or Ig, the number of CDR3 length distributions for an individual is substantial, as confirmed by the ImMunoGeneTics database (Lefranc, 2003), a reference resource for studies of Ig and TCR.

2. Technology and data processing

The CDR3 length distribution analysis method is a molecular biology tool based on the analysis of V or V–J gene composition and transcript lengths. Following reverse-transcription into cDNA, CDR3-encoding mRNA is amplified by PCR using specific V and C primers. PCR products are then labeled with a fluorescent C or J primer or radiographic isotope. Finally, amplified fragments are separated by electrophoresis, and visualized by fluorescent sequencing or autoradiography equipment (Fig. 1A). A band intensity pattern is thus obtained. This set of bands represents the total population of mRNA sharing the same V gene or V–J gene combination but varying in length. Bands are usually separated by a space corresponding to a transcript length of three nucleotides; suggesting that the population is composed of in-frame transcripts of different length (Pannetier et al., 1995). Signal processing programs (Liu et al., 1995; Pannetier

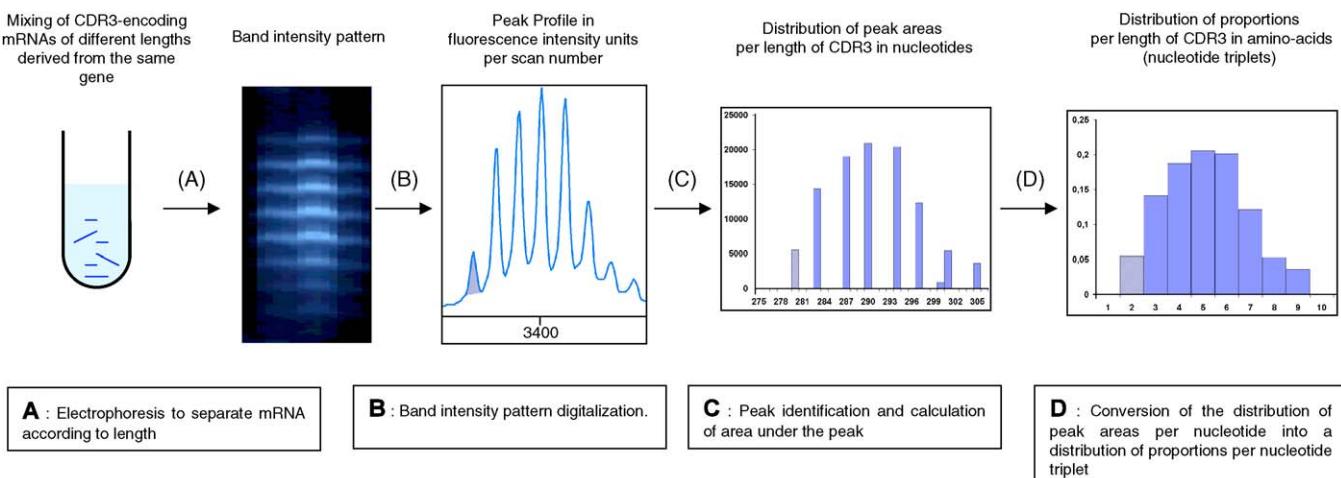


Fig. 1. Signal processing of CDR3 length distribution. The four different steps necessary to turn the electrophoresis signal into quantitative data are outlined. There are three different ways of representing a CDR3 length distribution: as a band intensity pattern, a peak profile or a histogram. Colored in gray, the peak in the profile correspond to the length class in the histogram.

et al., 1995) can be used to digitize the gel image (Fig. 1B) thus enabling quantification of the relative amount of fluorescence/radioactivity in each band. A frequency distribution of the CDR3 lengths (expressed in fluorescence/radioactivity units) is then obtained (Fig. 1C). Once the relative proportions of each length class of mRNA are calculated, the CDR3 length distribution can be displayed as a probability distribution (Fig. 1D). In humans, the TCR β chain has been described as having 65 V β genes grouped into 30 families on the basis of the sequence similarity (Folch and Lefranc, 2000). Designing specific labeling primers for each TCR V β chain gene, or for a whole V β chain family, therefore remains problematic. Among these different V β genes families, 26 have been shown to lead to the expression of a functional TCR. This observation tallies with the fact that, in the majority of studies, around 25 (Pannetier et al., 1995) or 26 (Gorski et al., 1994) V β genes/family of genes are tested. Nevertheless, the heterogeneity of primers used between studies, together with ambiguity over the V β gene names arising from the coexistence of several gene nomenclatures (Arden et al., 1995; Rowen et al., 1996; Wei et al., 1994; Wilson et al., 1988), do not facilitate comparisons between published results.

3. Statistical analysis of CDR3 length distribution

While the method used to calculate CDR3 length distribution is now a validated procedure, the assessment of statistically relevant differences between repertoires of individuals has remained elusive. The challenges encountered when analyzing CDR3 data are two-fold: (1) extraction of information from each CDR3 length distribution and (2) integration of information derived from every CDR3 length distributions. A key observation has been made since the initial publications in this field: recurrent Gaussian-like distribution patterns, usually composed of 8–10 different CDR3 length classes (Pannetier et al., 1993) are observed in healthy individuals (Gorski et al., 1994), as well as naive rats (Douillard et al., 1998), swine (Baron et al., 2001) and

mice (Cochet et al., 1992), but also in superantigen-stimulated cells (Musette et al., 1996). In nature and in many biological situations, Gaussian distributions occur when a large number of small effects act additively and independently. Such Gaussian CDR3 length distribution is assumed to be the result of the random mechanism involved in the junction diversity of the TCR. The length of the CDR3 loop greatly influences its shape and ability to fold both on itself and in the company of others loops such as the CDR1 and CDR2 (Davis et al., 1998; Wu et al., 2002). In regard to all these observations, appropriate rearrangements of V(D)J segments resulting in medium-size CDR3 are more likely to occur than rearrangements resulting in short or long CDR3. The recurrence of the Gaussian-like distribution, in healthy or resting situations, inspires numerous statistical methods. From the most trivial to the most sophisticated, these methods have been developed to assign distributions as Gaussian or not. The length of the CDR3 expressed in amino acids can be considered as a discrete random variable. Because a Gaussian CDR3 length distribution is usually composed of 8–10 length classes, counting the number of length classes present in CDR3 length distributions has been proposed as an initial method to evaluate how close a particular CDR3 length distribution is to a Gaussian distribution (Wu et al., 2000). However, despite being easy to implement, the latter method does not take the shape of the distributions into account.

To take this information into consideration, more formal descriptive parameters defining the Gaussian-like distribution can be used. Kurtosis (Fig. 2A), that corresponds to the degree of peakness in a distribution, and skewness (Fig. 2B), which measures the asymmetry of the distribution (Peggs et al., 2003), give a good indication of the shape of a distribution. However, when the distribution is multimodal, i.e. with more than one major length class, skewness and kurtosis are limited indicators.

The use of statistical methods based on regression analysis or Goodness-of-Fit tests enable the rational assessment of whether a CDR3 length distribution is normally distributed or

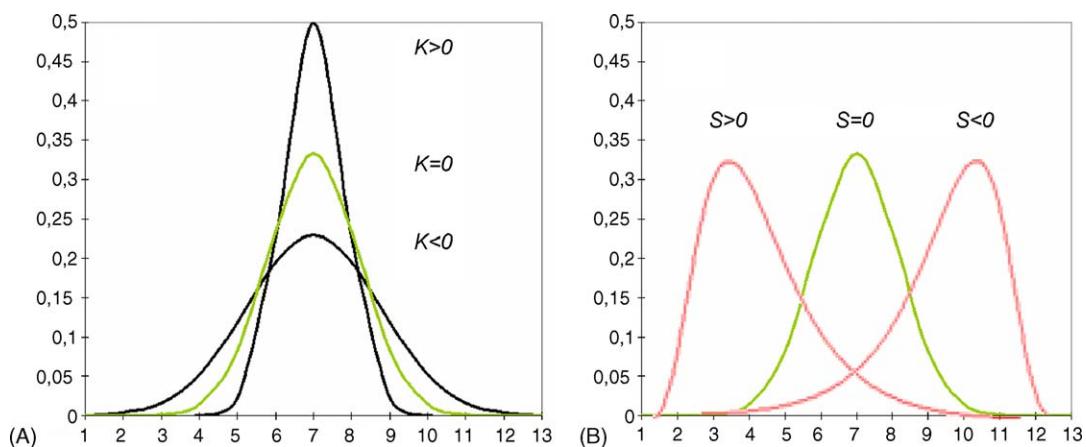


Fig. 2. Skewness and kurtosis are two typical parameters to describe a Gaussian-like distribution. Kurtosis (K), as described in (A), is a measure of the peakness of a distribution. When $K < 0$, the distribution is “flatter” than the theoretical Gaussian distribution, colored in green and which $K = 0$. Skewness (S) is an index of the distribution asymmetry. As shown in (B), the skewness of a theoretical Gaussian distribution is equal to 0, while skewness of a left skewed distribution is positive and skewness of a right skewed distribution is negative. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

not. Regression analysis is a statistical method that chooses a curve that best fits given data points. The performance of the curve fitting is related to the value of the coefficient of determination, R^2 . The coefficient value varies from 0 to 1 according to the correlation between the CDR3 length distribution and a statistical model. Linear regression, used to compare two CDR3 length distributions (Naumov et al., 1996), or Quadratic regression (Karadimitris et al., 2000), used to deter-

mine whether the log of the intensities of the CDR3 length distribution fits a parabola, have also been tested on CDR3 data (Fig. 3, I). Regression methods have the advantage of giving a score of curve fitting. In comparison, statistical tests can be used to decide whether a proposition is true or not, with a certain level of confidence. With CDR3 length distribution data, Goodness-of-Fit tests make it possible to reject, with a controlled risk, the hypothesis that a CDR3 length distribution fits a spe-

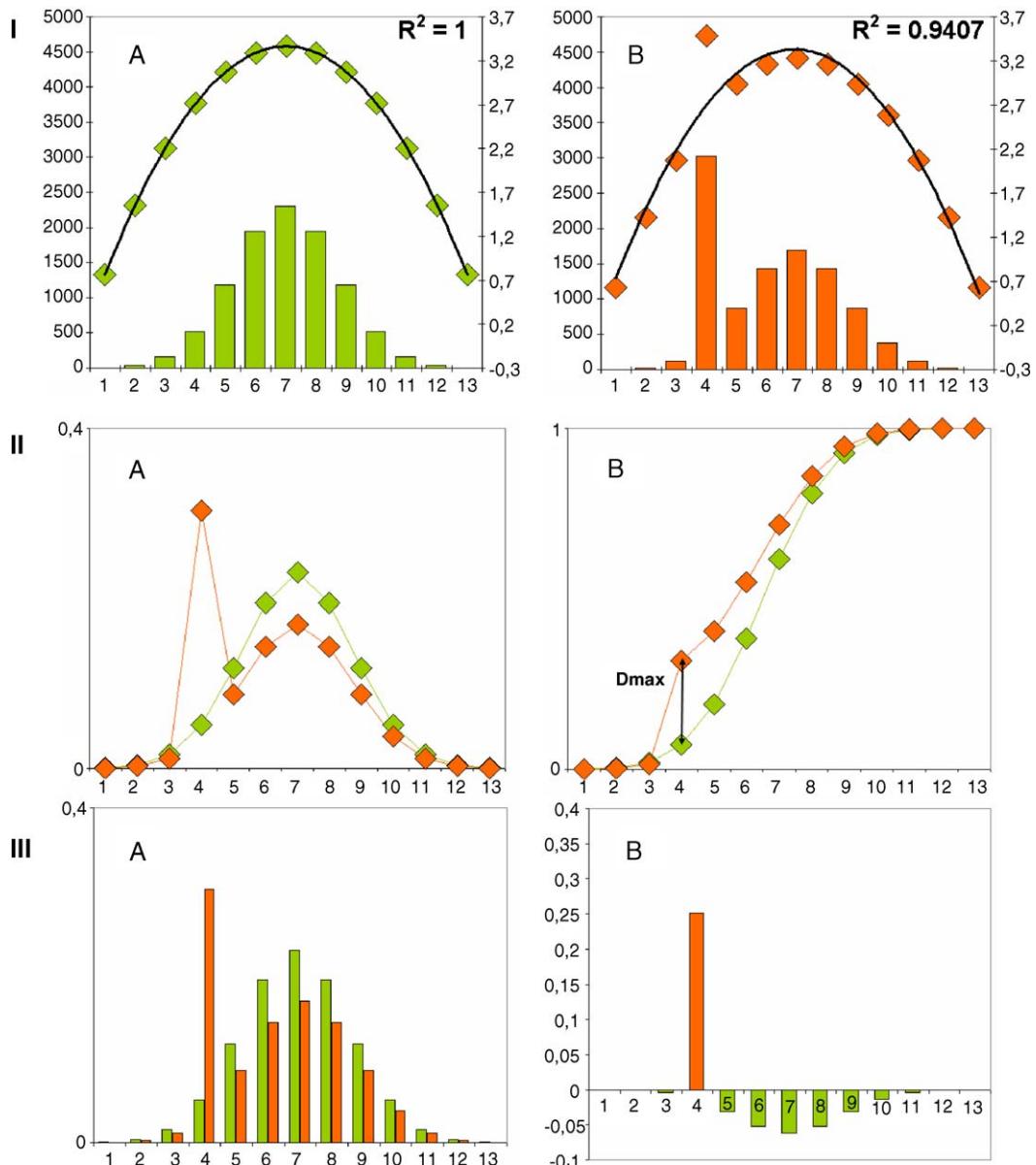


Fig. 3. Three different types of statistical methods to compare a perturbed and a Gaussian CDR3 length distribution. A theoretical Gaussian distribution, colored in green, is compared to a perturbed distribution colored in orange. (I) *Quadratic Regression* is a process by which the equation of a parabola of “best fit” is found for a set of data. When the regression equation truly represents the data set, the coefficient of determination, R^2 , equals 1. I(A) For a Gaussian distribution, as depicted by the histogram of fluorescence intensities, the logarithm of these intensities (rhombus) are perfectly described by a parabola ($R^2 = 1$). I(B) For a perturbed distribution, quadratic regression does not provide a perfect fit and R^2 is below 1. (II) Statistical tests such as the *Kolmogorov-Smirnov Goodness-of-Fit test* can demonstrate that two distributions are identical. II(A) To compute this test, the discrete distributions, as depicted by the histograms in I(A) and I(B), are transformed into continuous data. II(B) Once the cumulative density functions of the continuous distributions have been calculated, a D-statistics is computed. The value of the D-statistics enables rejection of the null hypothesis of no difference between the distributions. III(A) The Gaussian and perturbed distributions can be depicted as histograms and presented on the same graph. III(B) By calculating the differences in proportions of each length class, it is possible to identify where the clonal expansions occur. The sum of the absolute local differences is the order 1 *Minkowski distance*. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

cific distribution such as a Gaussian distribution. For example, Kolmogorov–Smirnov tests were firstly used to show that the CDR3 length distribution of reference samples has a very Gaussian distribution (Gorochov et al., 1998) (Fig. 3, II). Briefly, this test computes a D-statistics (Goodness-of-Fit statistics) between the cumulative density functions of the CDR3 length distribution analyzed and the Gaussian model, and allows for rejection of the null hypothesis of no difference between the distributions. This test has also been successfully used to compare the CDR3 length distribution of healthy individuals (King et al., 2001). Because the Kolmogorov–Smirnov test is restricted to continuous distributions, while CDR3 length distributions are discrete distributions, it could be replaced by the χ^2 Goodness-of-Fit test that has the advantage of using frequencies (Mosley et al., 1998).

The regression and Goodness-of-Fit tests can be used to decide whether or not the distribution is Gaussian, which is very convenient. However, identifying precisely which length classes differ from one distribution to another is essential. Gorochov et al. (1998) proposed to “subtract” an average Gaussian CDR3 length distribution from each CDR3 length distribution obtained from studied samples. The average Gaussian CDR3 length distribution is composed of Gaussian-like CDR3 length distributions of individuals from a reference group of healthy individuals. At a precise length class, a positive difference means that CDR3 transcripts are over-represented in the studied sample CDR3 length distribution in comparison with the average Gaussian CDR3 length distribution (Fig. 3, III). These differences and the distribution shapes can also be represented as a landscape, encompassing all V β genes for an individual (Gorochov et al., 1998; Sebille et al., 2001). By adding together all the absolute differences, a percentage of perturbation can be calculated for each gene. This score indicates the number of differences between the tested CDR3 length distribution and a computed reference distribution (Gorochov et al., 1998; Benveniste et al., 2001) or a Gaussian theoretical one (Han et al., 1999). This method is widely used because it pinpoints the length classes that differ from a Gaussian distribution.

Different categories of typical distribution shapes can be defined by a visual analysis of CDR3 length distribution. This method consists in categorizing each CDR3 length distribution according to its shape. Various kinds of categorizations have been used in the literature, from the more basic kind that classifies which is or is not a Gaussian-like distribution (Risitano et al., 2002), to the more sophisticated kind (Demoulin et al., 2003; Guilherme et al., 2000; Sarzotti et al., 2003; Yawalkar et al., 2003). Gaussian-like patterns characterize “*polyclonal*” responses (Pannetier et al., 1995). These patterns illustrate that a large number of clones derived from the random rearrangement process are available (Fig. 4A). Repertoire complexity, depicted by a large number of different-sized PCR products, afford immunological advantages as it has been shown regarding the avoidance of opportunistic infections (Friedman et al., 2001). The term “*oligoclonal*” is used to characterize CDR3 length distribution with a few major CDR3 length classes (Fig. 4B and C). There are two possible interpretations for these skewed patterns: they could either result from oligoclonal expansions over a polyclonal background (Cibotti et al., 1994; Even et al., 1995; Laouini et al., 2000; Pannetier et al., 1995), or, when arising following severe T cell depletion, they could be an indication of a lack of complexity (Gorski et al., 1994; Friedman et al., 2001). In addition, it is important to note that a CDR3 length distribution with a major length (Fig. 4C) does not necessarily result from a monoclonal expansion. Each peak, corresponding to a given CDR3 length, usually contains multiple distinct sequences. The development of a cloning-sequencing approach, coupled with the CDR3 length distribution analysis method, can provide information on the number of distinct types of sequence included in a CDR3 length class (Arstila et al., 1999; Casrouge et al., 2000; Gapin et al., 1998; Hsieh et al., 2004).

As suggested above, the differences that exist between two CDR3 length distributions are due to the existence of clonal expansions. Various methods attempt to explain these differences by identifying where the clonal expansions are located in a skewed CDR3 length distribution. For example, an “expansion” can be statistically pinpointed by a length class proportion

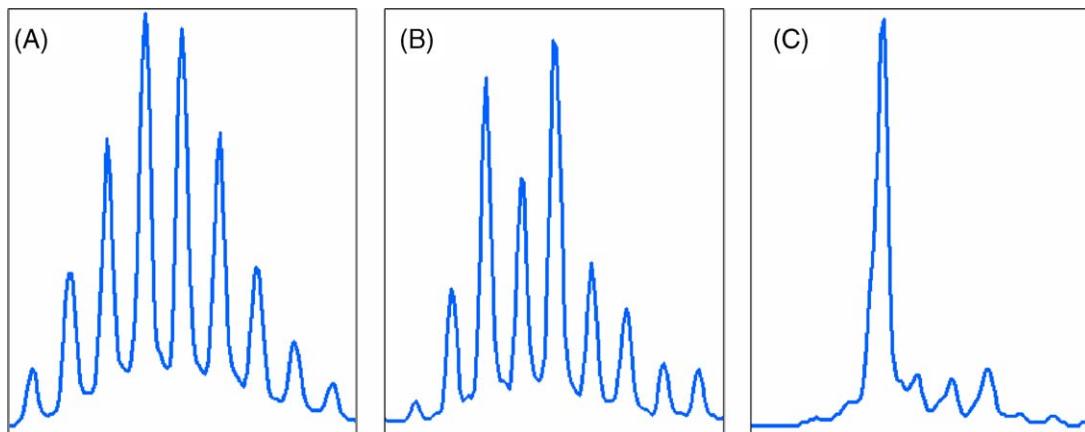


Fig. 4. Examples of CDR3 length distribution patterns (peak profile representation). The (A) profile is a typical Gaussian-like profile which characterizes healthy volunteers or superantigen-stimulated cells. It is often classified as belonging to the so-called “*polyclonal*” category. The (B) and (C) profile, which are “perturbed” or “skewed” compared to a Gaussian distribution, reveal the appearance of potential clonal expansions. This kind of pattern is referred to as “*oligoclonal*”. The C profile could reveal a “*monoclonal*” pattern with one predominant CDR3 length class.

value that exceeds the value of the length class proportion of the reference CDR3 length distribution by at least 3 (Killian et al., 2002) or 2.5 (Manfras et al., 2004) standard deviations. To identify recurrent expanded CDR3 length classes, a scoring system that assigns a score value to each CDR3 length class of each CDR3 length distribution identifies the same expansions in a group of patients (Collette and Six, 2002).

To conclude, several methods have been developed to assess differences between CDR3 length distributions. Many take into account the underlying pseudo-normality of CDR3 length distribution. Although a visual analysis is easier for biologists, a negative aspect of this method can arise depending on the relative expertise and consistency from day to day of the scientist responsible for analyzing the data. Visually identifying differences in CDR3 length distribution is difficult and can introduce subjective variation and numerous biases. Methods based on quantitative data, using computers, are better at extracting information from images than human observers (Glasbey et al., 1998). These methods quantify and/or statistically assess differences between CDR3 length distributions, or identify clonal expansions.

4. Global analysis

Once information has been extracted from each CDR3 length distribution, understanding the degree of repertoire bias necessitates integration of the particularities of all CDR3 length distributions at the individual and group level. Different methods have been developed to document changes that could occur in a whole repertoire at different time points (King et al., 2001; Hirokawa et al., 2000) and to assess differences between groups (Gorochov et al., 1998). These methods consist in computing one single score value reflecting the overall complexity or clonality of an individual. A comparison of individuals can then be based on differences in this score value. These scores may be derived from the percentage of polyclonal (Talvensaari et al., 2002) or monoclonal CDR3 length distribution (Orsini et al., 2000), the number of the total length classes present in all the CDR3 length distributions (Soiffer et al., 2002; Wu et al., 2000) or the mean percentages of perturbation (Gorochov et al., 1998). Specific statistics (Kepler et al., 2005) are also good indices of the overall complexity of the repertoire. Certain methods combine different overall scores into a complex formula to take into account the advantages of each score (Peggs et al., 2003; Lu et al., 2004). However, one single score cannot summarize all the information contained in 26 CDR3 length distributions, for a single TCR V β chain.

To tackle this problem, data reduction methods such as principal component analysis have been proposed (Collette et al., 2003, 2004; Collette and Six, 2002). This mathematical procedure consists in reducing the number of variables, in this case the number of genes, into a smaller number of uncorrelated variables. Once the “dimensionality” of the dataset has been reduced, each individual is characterized by a small number of variables; and statistical tests can be performed more easily. Correspondence factor analysis can also be used for discrimination purposes, as was used to discriminate the TCR V β repertoire of

rats with allo- or xeno-transplantation and to identify the TCR V β genes associated (Guillet et al., 2004). Correspondence factor analysis is an exploratory technique that can be used to locate the variables and the individuals on a correspondence map. However, correspondence factor analysis cannot statistically assess the involvement of a particular gene in a signature in a rigorous manner. Statistical methods such as multiple analysis of variance have been successfully used on perturbation percentages of TCR V β genes in order to find the specific genes possibly associated with a state of tolerance (Brouard et al., 2005). This statistical procedure enables multiple dependent variables (genes) to be analyzed simultaneously.

Challenges still remain in determining the correct analytical method to use for CDR3 length distribution. However, in many cases, the CDR3 length distribution analysis has proven to be a predictive method (Ria et al., 2001) on its own or coupled with other kind of data. Indeed, successful efforts have been made to combine quantitative (Bour et al., 1999; Drescher et al., 2000; Even et al., 1995; Gagne et al., 2000; Lang et al., 1997; Lim et al., 2002) or statistical (Hori et al., 2002) techniques to CDR3 length distribution analysis. The purpose is to give relevance of a CDR3 length distribution pattern by correlating it with the quantitative usage of the corresponding gene. In general, initiatives consisting in combining heterogeneous data types with CDR3 length distribution analyses (qualitative transcriptome analyses), such as cell surface protein quantification by flow cytometry (quantitative proteome analysis) (Cossarizza et al., 2004; Dechanet et al., 1999; Pilch et al., 2002; Yawalkar et al., 2003), functional data (cytokines, mixed lymphocyte reaction), clinical data (Schito et al., 2001) or gene expression profiling are promising to better describe T and B repertoires. Development of statistical tools to analyze various types of data mixed together, will make it possible in the near future to model various immunological situations and to extend CDR3 length distribution analysis to the development of prognostic tests.

Acknowledgements

The authors are grateful to Joanna Ashton-Chess who helped in editing the manuscript and to Prof. El Mostafa Qannari and Catherine Ruiz for their helpful remarks concerning this review.

References

- Arden, B., Clark, S.P., Kabelitz, D., Mak, T.W., 1995. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42, 455–500.
- Arons, E., Sorbara, L., Raffeld, M., Stetler-Stevenson, M., Steinberg, S.M., Liewehr, D.J., Pastan, I., Kreitman, R.J., 2005. Characterization of T-cell repertoire in hairy cell leukemia patients before and after recombinant immunotoxin BL22 therapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1–11.
- Arstila, T.P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J., Kourilsky, P., 1999. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 286, 958–961.
- Baranzini, S.E., Jeong, M.C., Butunoi, C., Murray, R.S., Bernard, C.C., Oksenberg, J.R., 1999. B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *J. Immunol.* 163, 5133–5144.
- Baron, C., McMorrow, I., Sachs, D.H., LeGuern, C., 2001. Persistence of dominant T cell clones in accepted solid organ transplants. *J. Immunol.* 167, 4154–4160.

- Benveniste, O., Cherin, P., Maisonobe, T., Merat, R., Chosidow, O., Mouthon, L., Guillemin, L., Flahault, A., Burland, M.C., Klatzmann, D., Herson, S., Boyer, O., 2001. Severe perturbations of the blood T cell repertoire in polymyositis, but not dermatomyositis patients. *J. Immunol.* 167, 3521–3529.
- Bour, H., Puisieux, I., Even, J., Kourilsky, P., Favrot, M., Musette, P., Nicolas, J.F., 1999. T-cell repertoire analysis in chronic plaque psoriasis suggests an antigen-specific immune response. *Hum. Immunol.* 60, 665–676.
- Brouard, S., Dupont, A., Giral, M., Louis, S., Lair, D., Braudeau, C., Degauque, N., Moizant, F., Pallier, A., Ruiz, C., Guillet, M., Laplaud, D., Soulillou, J.P., 2005. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am. J. Transplant.* 5, 330–340.
- Casrouge, A., Beaudoin, E., Dalle, S., Pannetier, C., Kanellopoulos, J., Kourilsky, P., 2000. Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J. Immunol.* 164, 5782–5787.
- Cibotti, R., Cabaniols, J.P., Pannetier, C., Delarbre, C., Vergnon, I., Kanellopoulos, J.M., Kourilsky, P., 1994. Public and private V beta T cell receptor repertoires against hen egg white lysozyme (HEL) in non-transgenic versus HEL transgenic mice. *J. Exp. Med.* 180, 861–872.
- Cochet, M., Pannetier, C., Regnault, A., Darche, S., Leclerc, C., Kourilsky, P., 1992. Molecular detection and in vivo analysis of the specific T cell response to a protein antigen. *Eur. J. Immunol.* 22, 2639–2647.
- Collette, A., Bagot, S., Ferrandiz, M.E., Cazenave, P.A., Six, A., Pied, S., 2004. A profound alteration of blood TCRB repertoire allows prediction of cerebral malaria. *J. Immunol.* 173, 4568–4575.
- Collette, A., Cazenave, P.A., Pied, S., Six, A., 2003. New methods and software tools for high throughput CDR3 spectratyping. Application to T lymphocyte repertoire modifications during experimental malaria. *J. Immunol. Methods* 278, 105–116.
- Collette, A., Six, A., 2002. ISEAparks: an Excel platform for GeneScan and Immunoscope data retrieval, management and analysis. *Bioinformatics* 18, 329–330.
- Cossarizza, A., Poccia, F., Agrati, C., D'Offizi, G., Bugarini, R., Pinti, M., Borghi, V., Mussini, C., Esposito, R., Ippolito, G., Narciso, P., 2004. Highly active antiretroviral therapy restores CD4+ Vbeta T-cell repertoire in patients with primary acute HIV infection but not in treatment-naive HIV+ patients with severe chronic infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 35, 213–222.
- Coulie, P.G., Karanikas, V., Colau, D., Lurquin, C., Landry, C., Marchand, M., Dorval, T., Brichard, V., Boon, T., 2001. A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10290–10295.
- Davis, M.M., Bjorkman, P.J., 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395–402.
- Davis, M.M., Boniface, J.J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., Chien, Y., 1998. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 523–544.
- Dechanet, J., Merville, P., Lim, A., Retiere, C., Pitard, V., Lafarge, X., Michelson, S., Meric, C., Hallet, M.M., Kourilsky, P., Potaux, L., Bonneville, M., Moreau, J.F., 1999. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J. Clin. Invest.* 103, 1437–1449.
- Demoulin, T., Mouthon, F., Clayette, P., Bequet, D., Gachelin, G., Dormont, D., 2003. The same TCR (N)Dbeta(N)Jbeta junctional region is associated with several different vbeta13 subtypes in a multiple sclerosis patient at the onset of the disease. *Neurobiol. Dis.* 14, 470–482.
- Douillard, P., Josien, R., Pannetier, C., Bonneville, M., Soulillou, J.P., Cuturi, M.C., 1998. Selection of T cell clones with restricted TCR-CDR3 lengths during in vitro and in vivo alloresponses. *Int. Immunol.* 10, 71–83.
- Drescher, K.M., Johnston, S.L., Hogancamp, W., Nabozny, G.H., David, C.S., Rimm, I.J., Wettstein, P.J., Rodriguez, M., 2000. V(beta)8(+) T cells protect from demyelinating disease in a viral model of multiple sclerosis. *Int. Immunol.* 12, 271–280.
- Even, J., Lim, A., Puisieux, L., Ferrandini, L., Dietrich, P.Y., Toubert, A., Hercend, T., Triebel, F., Pannetier, C., Kourilsky, P., 1995. T-cell repertoires in healthy and diseased human tissues analysed by T-cell receptor beta-chain CDR3 size determination: evidence for oligoclonal expansions in tumours and inflammatory diseases. *Res. Immunol.* 146, 65–80.
- Folch, G., Lefranc, M.P., 2000. The human T cell receptor beta variable (TRBV) genes. *Exp. Clin. Immunogenet.* 17, 42–54.
- Friedman, T.M., Varadi, G., Hopely, D.D., Filicko, J., Wagner, J., Ferber, A., Martinez, J., Brunner, J., Gross, D., McGuire, L., Kornblum, R., Flomenberg, N., 2001. Non-myeloablative conditioning allows for more rapid T-cell repertoire reconstitution following allogeneic matched unrelated bone marrow transplantation compared to myeloablative approaches. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 7, 656–664.
- Gagne, K., Brouard, S., Giral, M., Sebille, F., Moreau, A., Guillet, M., Bignon, J.D., Imbert, B.M., Cuturi, M.C., Soulillou, J.P., 2000. Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J. Immunol.* 164, 1553–1563.
- Gapin, L., Fukui, Y., Kanellopoulos, J., Sano, T., Casrouge, A., Malier, V., Beaudoin, E., Gautheret, D., Claverie, J.M., Sasazuki, T., Kourilsky, P., 1998. Quantitative analysis of the T cell repertoire selected by a single peptide-major histocompatibility complex. *J. Exp. Med.* 187, 1871–1883.
- Glasbey, C.A., Berman, M., Hudson, H.M., 1998. Image analysis and tomography. In: Armitage, P., Colton, T. (Eds.), *Encyclopaedia of Biostatistics*. Wiley, Chichester, pp. 1980–1998.
- Gorochov, G., Neumann, A.U., Kerever, A., Parizot, C., Li, T., Katlama, C., Karmochkine, M., Raguin, G., Autran, B., Debre, P., 1998. Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nat. Med.* 4, 215–221.
- Gorski, L., Yassai, M., Zhu, X., Kissela, B., Kissella, B., Keever, C., Flomenberg, N., 1994. Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status. *J. Immunol.* 152, 5109–5119.
- Guilherme, L., Dulphy, N., Douay, C., Coelho, V., Cunha-Neto, E., Oshiro, S.E., Assis, R.V., Tanaka, A.C., Pomerantz, P.M., Charron, D., Toubert, A., Kalil, J., 2000. Molecular evidence for antigen-driven immune responses in cardiac lesions of rheumatic heart disease patients. *Int. Immunol.* 12, 1063–1074.
- Guillet, M., Gagne, K., Lair, D., Heslan, J.M., Dore, J.C., Soulillou, J.P., Brouard, S., 2004. Different patterns of TCR beta chain regulation following allo- and xeno-transplantation. *Xenotransplantation* 11, 315–322.
- Han, M., Harrison, L., Kehn, P., Stevenson, K., Currier, J., Robinson, M.A., 1999. Invariant or highly conserved TCR alpha are expressed on double-negative (CD3+CD4–CD8–) and CD8+ T cells. *J. Immunol.* 163, 301–311.
- Hirokawa, M., Horuchi, T., Kitabayashi, A., Kawabata, Y., Matsutani, T., Suzuki, R., Chihara, J., Miura, A.B., 2000. Delayed recovery of CDR3 complexity of the T-cell receptor-beta chain in recipients of allogeneic bone marrow transplants who had virus-associated interstitial pneumonia: monitor of T-cell function by CDR3 spectratyping. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, S32–S39.
- Hori, S., Collette, A., Demengeot, J., Stewart, J., 2002. A new statistical method for quantitative analyses: application to the precise quantification of T cell receptor repertoires. *J. Immunol. Methods* 268, 159–170.
- Hsieh, C.S., Liang, Y., Tyznik, A.J., Self, S.G., Liggitt, D., Rudensky, A.Y., 2004. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 21, 267–277.
- Hviid, L., Akanmori, B.D., Loizon, S., Kurtzhals, J.A., Ricke, C.H., Lim, A., Koram, K.A., Nkrumah, F.K., Mercereau-Puijalon, O., Behr, C., 2000. High frequency of circulating gamma delta T cells with dominance of the V(delta)1 subset in a healthy population. *Int. Immunol.* 12, 797–805.
- Karadimitris, A., Manavalan, J.S., Thaler, H.T., Notaro, R., Araten, D.J., Nafa, K., Roberts, I.A., Weksler, M.E., Luzzatto, L., 2000. Abnormal T-cell repertoire is consistent with immune process underlying the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 96, 2613–2620.
- Kepler, T.B., He, M., Tomfohr, J.K., Devlin, B.H., Sarzotti, M., Markert, M.L., 2005. Statistical analysis of antigen receptor spectratype data. *Bioinformatics* 21, 3394–3400.
- Killian, M.S., Matud, J., Detels, R., Giorgi, J.V., Jamieson, B.D., 2002. MaGiK method of T-cell receptor repertoire analysis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 858–863.
- King, D.J., Gotch, F.M., Larsson-Sciard, E.L., 2001. T-cell re-population in HIV-infected children on highly active anti-retroviral therapy (HAART). *Clin. Exp. Immunol.* 125, 447–454.

- Kurosawa, Y., Tonegawa, S., 1982. Organization, structure, and assembly of immunoglobulin heavy chain diversity DNA segments. *J. Exp. Med.* 155, 201–218.
- Lang, R., Pfeffer, K., Wagner, H., Heeg, K., 1997. A rapid method for semi-quantitative analysis of the human V beta-repertoire using TaqManR PCR. *J. Immunol. Methods* 203, 181–192.
- Laouini, D., Casrouge, A., Dalle, S., Lemonnier, F., Kourilsky, P., Kanellopoulos, J., 2000. V beta T cell repertoire of CD8+ splenocytes selected on non-polymorphic MHC class I molecules. *J. Immunol.* 165, 6381–6386.
- Laplaud, D.A., Ruiz, C., Wiertlewski, S., Brouard, S., Berthelot, L., Guillet, M., Melchior, B., Degauque, N., Edan, G., Brachet, P., Damier, P., Soulillou, J.P., 2004. Blood T-cell receptor beta chain transcriptome in multiple sclerosis. Characterization of the T cells with altered CDR3 length distribution. *Brain* 127, 981–995.
- Lefranc, M.P., 2003. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* 31, 307–310.
- Lim, A., Baron, V., Ferradini, L., Bonneville, M., Kourilsky, P., Pannetier, C., 2002. Combination of MHC-peptide multimer-based T cell sorting with the immunoscope permits sensitive ex vivo quantitation and follow-up of human CD8+ T cell immune responses. *J. Immunol. Methods* 261, 177–194.
- Liu, D., Callahan, J.P., Dau, P.C., 1995. Intrafamily fragment analysis of the T cell receptor beta chain CDR3 region. *J. Immunol. Methods* 187, 139–150.
- Lu, J., Basu, A., Melenhorst, J.J., Young, N.S., Brown, K.E., 2004. Analysis of T-cell repertoire in hepatitis-associated aplastic anemia. *Blood* 103, 4588–4593.
- Manfras, B.J., Weidenbach, H., Beckh, K.H., Kern, P., Moller, P., Adler, G., Mertens, T., Boehm, B.O., 2004. Oligoclonal CD8+ T-cell expansion in patients with chronic hepatitis C is associated with liver pathology and poor response to interferon-alpha therapy. *J. Clin. Immunol.* 24, 258–271.
- Mosley, R.L., Koker, M.M., Miller, R.A., 1998. Idiosyncratic alterations of TCR size distributions affecting both CD4 and CD8 T cell subsets in aging mice. *Cell. Immunol.* 189, 10–18.
- Muraro, P.A., Douek, D.C., Packer, A., Chung, K., Guenaga, F.J., Cassiani-Ingoni, R., Campbell, C., Memon, S., Nagle, J.W., Hakim, F.T., Gress, R.E., McFarland, H.F., Burt, R.K., Martin, R., 2005. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J. Exp. Med.* 201, 805–816.
- Musette, P., Galelli, A., Truffa-Bachi, P., Peumans, W., Kourilsky, P., Gachelin, G., 1996. The J beta segment of the T cell receptor contributes to the V beta-specific T cell expansion caused by staphylococcal enterotoxin B and *Urtica dioica* superantigens. *Eur. J. Immunol.* 26, 618–622.
- Naumov, Y.N., Naumova, E.N., Gorski, J., 1996. CD4+ and CD8+ circulating alpha/beta T-cell repertoires are equally complex and are characterized by different levels of steady-state TCR expression. *Hum. Immunol.* 48, 52–62.
- Orsini, E., Alyea, E.P., Schlossman, R., Canning, C., Soiffer, R.J., Chillemi, A., Neuberg, D., Anderson, K.C., Ritz, J., 2000. Changes in T cell receptor repertoire associated with graft-versus-tumor effect and graft-versus-host disease in patients with relapsed multiple myeloma after donor lymphocyte infusion. *Bone Marrow Transplant.* 25, 623–632.
- Pannetier, C., Cochet, M., Darche, S., Casrouge, A., Zoller, M., Kourilsky, P., 1993. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 4319–4323.
- Pannetier, C., Even, J., Kourilsky, P., 1995. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol. Today* 16, 176–181.
- Peggs, K.S., Verfuerth, S., D'Sa, S., Yong, K., Mackinnon, S., 2003. Assessing diversity: immune reconstitution and T-cell receptor BV spectratype analysis following stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 120, 154–165.
- Pilch, H., Hohn, H., Freitag, K., Neukirch, C., Necker, A., Haddad, P., Tanner, B., Knapstein, P.G., Maeurer, M.J., 2002. Improved assessment of T-cell receptor (TCR) VB repertoire in clinical specimens: combination of TCR-CDR3 spectratyping with flow cytometry-based TCR VB frequency analysis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 257–266.
- Ria, F., van den Elzen, P., Madakamutil, L.T., Miller, J.E., Maverakis, E., Sercarz, E.E., 2001. Molecular characterization of the T cell repertoire using immunoscope analysis and its possible implementation in clinical practice. *Curr. Mol. Med.* 1, 297–304.
- Risitano, A.M., Kook, H., Zeng, W., Chen, G., Young, N.S., Maciejewski, J.P., 2002. Oligoclonal and polyclonal CD4 and CD8 lymphocytes in aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria measured by V beta CDR3 spectratyping and flow cytometry. *Blood* 100, 178–183.
- Rowen, L., Koop, B.F., Hood, L., 1996. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 272, 1755–1762.
- Sarzotti, M., Patel, D.D., Li, X., Ozaki, D.A., Cao, S., Langdon, S., Parrott, R.E., Coyne, K., Buckley, R.H., 2003. T cell repertoire development in humans with SCID after non-ablative allogeneic marrow transplantation. *J. Immunol.* 170, 2711–2718.
- Schito, A.M., Vittinghoff, E., Hecht, F.M., Elkins, M.K., Kahn, J.O., Levy, J.A., Oksenberg, J.R., 2001. Longitudinal analysis of T-cell receptor gene use by CD8(+) T cells in early human immunodeficiency virus infection in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Blood* 97, 214–220.
- Sebille, F., Gagne, K., Guillet, M., Degauque, N., Pallier, A., Brouard, S., Vanhove, B., Delsuc, M.A., Soulillou, J.P., 2001. Direct recognition of foreign MHC determinants by naive T cells mobilizes specific Vbeta families without skewing of the complementarity-determining region 3 length distribution. *J. Immunol.* 167, 3082–3088.
- Soiffer, R.J., Alyea, E.P., Hochberg, E., Wu, C., Canning, C., Parikh, B., Zahrieh, D., Webb, I., Antin, J., Ritz, J., 2002. Randomized trial of CD8+ T-cell depletion in the prevention of graft-versus-host disease associated with donor lymphocyte infusion. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 8, 625–632.
- Talvensaari, K., Clave, E., Douay, C., Rabian, C., Garderet, L., Busson, M., Gamier, F., Douek, D., Gluckman, E., Charron, D., Toubert, A., 2002. A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood* 99, 1458–1464.
- Tonegawa, S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575–581.
- Tsutsumi, Y., Tanaka, J., Miura, Y., Toubai, T., Kato, N., Fujisaw, F., Toyoshima, N., Ota, S., Mori, A., Yonezumi, M., Chiba, K., Kondo, T., Hasino, S., Kobayashi, R., Masauji, N., Kasai, M., Asaka, M., Imamura, M., 2004. Molecular analysis of T-cell repertoire in patients with graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia Lymphoma* 45, 481–488.
- Tully, G., Kortsik, C., Hohn, H., Zehbe, I., Hitzler, W.E., Neukirch, C., Freitag, K., Kayser, K., Maeurer, M.J., 2005. Highly focused T cell responses in latent human pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 174, 2174–2184.
- Wei, S., Charmley, P., Robinson, M.A., Concannon, P., 1994. The extent of the human germline T-cell receptor V beta gene segment repertoire. *Immunogenetics* 40, 27–36.
- Wilson, R.K., Lai, E., Concannon, P., Barth, R.K., Hood, L.E., 1988. Structure, organization and polymorphism of murine and human T-cell receptor alpha and beta chain gene families. *Immunol. Rev.* 101, 149–172.
- Wu, C.J., Chillemi, A., Alyea, E.P., Orsini, E., Neuberg, D., Soiffer, R.J., Ritz, J., 2000. Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. *Blood* 95, 352–359.
- Wu, L.C., Tuot, D.S., Lyons, D.S., Garcia, K.C., Davis, M.M., 2002. Two-step binding mechanism for T-cell receptor recognition of peptide MHC. *Nature* 418, 552–556.
- Yawalkar, N., Ferenczi, K., Jones, D.A., Yamanaka, K., Suh, K.Y., Sadat, S., Kupper, T.S., 2003. Profound loss of T-cell receptor repertoire complexity in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 102, 4059–4066.

2.2 Résumé et discussion

Cette revue se décompose en quatre parties :

- l'étude de la diversité des répertoires (déjà décrite dans les chapitres précédents)
- la technologie Immunoscope et le traitement des données
- l'analyse statistique d'une CDR3 LD
- l'analyse globale des données

Pour l'analyse des CDR3 LD, l'acquisition et le traitement du signal sont des étapes très importantes (Collette et Six, 2002; Liu *et al.*, 1995; Pannetier *et al.*, 1995). En effet, elles sont nécessaires pour exploiter et convertir les spectres d'électrophorèse en données exploitables, présentées sous forme de distribution de longueurs en acides aminés (figure 8).

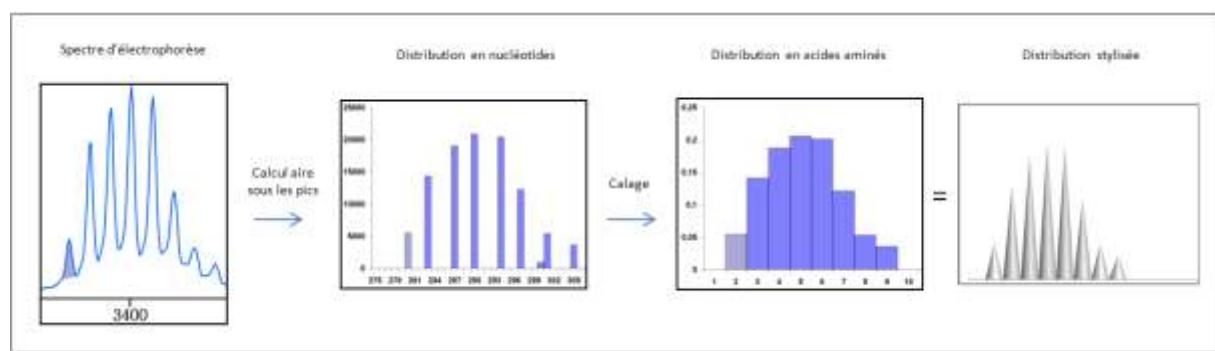


Figure 8 : Les différentes étapes de traitement du signal depuis le spectre d'électrophorèse à la CDR3 LD (en acide aminé) (adapté de Miqueu *et al.* (Miqueu *et al.*, 2007)).

La première étape consiste à identifier les pics au niveau du spectre d'électrophorèse, par la recherche de maxima locaux, puis à calculer l'aire sous la courbe de chaque pic. Le programme Immunoscope (Pannetier *et al.*, 1995) utilise la transformée de Fourier, qui traduit le signal analogique en signal discontinu. Une fois que chaque pic est identifié, c'est-à-dire qu'une longueur « en nucléotide » est associée à une mesure d'aire sous la courbe (en unité de fluorescence), une étape de « Calage » est entreprise. Il s'agit de transformer cette distribution de longueurs en « nucléotide » en distribution de longueurs en « acide aminé ». En effet, les pics sont espacés dans la majorité des cas de trois nucléotides, illustrant le cadre de lecture des transcrits du TCR. Cependant, des biais dans le processus de migration ou lors

de l'identification informatique des pics (souvent dus à la présence d'épaulements) impliquent des décalages locaux par rapport aux longueurs de transcrits théoriquement attendues. Des procédures semi-automatiques ont été mises en œuvre pour « corriger » la position des pics et permettre aisément la transformation des distributions de longueurs en « nucléotides » vers celles en « acides aminés » (Collette *et al.*, 2003; Collette et Six, 2002; Long *et al.*, 2006). Ces décalages locaux ne sont pas toujours artéfactuels, ils peuvent aussi illustrer la présence de fragments hors phase de lecture (La Gruta *et al.*, 2000). Bien que semi-automatisées, ces étapes de traitement restent laborieuses. Quelques logiciels comme le logiciel REPERTOIRE™ (Long *et al.*, 2006), le logiciel ISEAppeaks (Collette *et al.*, 2003; Collette et Six, 2002) et l'outil web SpA (He *et al.*, 2005) apportent des solutions pour le traitement et la gestion des données.

Remarque : Dans le cadre de la société TcLand et en amont du travail d'analyse et d'exploration présenté dans cette thèse, le développement d'un outil pour le management et l'analyse des données avait été réalisé. Pour les besoins de la plateforme de production il a consisté à automatiser l'acquisition des données brutes et leur traitement. Un logiciel, nommé TcLandBar, permet de produire les feuilles de routes pour les appareils ainsi que d'extraire les informations des fichiers produits par les séquenceurs et les appareils de PCR quantitative en temps réel. Le traitement des spectres d'électrophorèse a été automatisé et l'ensemble des traitements produits sur les données est sauvegardé pour pouvoir revenir aux données brutes à partir de n'importe quel TcLandscape. Inscrit dans une démarche d'Assurance Qualité, le processus de production du TcLandscape comporte la réalisation, en dupliques, des spectres d'électrophorèse et, en triplicat, des analyses par PCR quantitative en temps réel. Les validations de conformité des données, ainsi que la détection de données aberrantes, sont autant de contrôles internes, développés dans la TcLandBar, et permettent d'avoir confiance dans les données exploitées dans cette thèse.

Différents indicateurs ont été développés pour pouvoir utiliser l'information issue des CDR3 LD. Une grande partie de ces indices se base sur l'observation du caractère gaussien des distributions. Des indices mathématiques comme l'asymétrie (skewness) ou la kurtosis (aspect pointu) d'une distribution ont ainsi été testés (Peggs *et al.*, 2003) pour évaluer les différences qui existent entre cette distribution et une distribution gaussienne théorique. En

effet, les expansions ou les délétions clonales de cellules T entraînent une modification de la distribution gaussienne initiale. L'utilisation de tests statistiques d'ajustement à la gaussienne a aussi permis de mettre statistiquement en évidence les différences entre la distribution étudiée et une courbe gaussienne (Naumov *et al.*, 1996) (Karadimitris *et al.*, 2000) (King *et al.*, 2001; Mosley *et al.*, 1998). Le calcul d'un pourcentage de perturbation équivalant à la somme des différences locales entre la distribution étudiée et une distribution moyenne d'individus sains a été proposé et est largement utilisé (Benveniste *et al.*, 2001; Gorochov *et al.*, 1998; Han *et al.*, 1999). Un autre type de caractérisation des CDR3 LD a aussi été développé. Il est basé sur la catégorisation des formes de CDR3 LD telle que présentée dans la figure 5 (Demoulin *et al.*, 2003; Guilherme *et al.*, 2000; Risitano *et al.*, 2002; Sarzotti *et al.*, 2003; Yawalkar *et al.*, 2003). Des formes types sont en effet souvent rencontrées dans les analyses Immunoscope. Leur interprétation immunologique, et plus particulièrement des profils oligoclonaux, est souvent associée à la présence d'expansions clonales (Cibotti *et al.*, 1994; Laouini *et al.*, 2000). Le développement de scores pour identifier spécifiquement la présence d'expansions clonales dans les CDR3 LD a aussi été mené (Collette et Six, 2002; Killian *et al.*, 2002; Kuo *et al.*, 2007; Manfras *et al.*, 2004). Une expansion clonale étant définie comme la proportion anormale d'une longueur de CDR3 par rapport à la proportion de cette même longueur dans une distribution gaussienne.

Des stratégies d'analyse globale, c'est-à-dire permettant d'analyser de manière intégrée l'ensemble des CDR3 LD de tous les individus d'une étude, ont aussi été développées. Il s'agit, par exemple, du score global reflétant le répertoire d'un individu, i.e. résumant les formes de l'ensemble des CDR3 LD caractérisant un individu (Hirokawa *et al.*, 2000), ou témoignant de la complexité globale (Kepler *et al.*, 2005) ou de la clonalité d'un répertoire (Orsini *et al.*, 2000). Ils sont basés sur différentes analyses (pourcentage de CDR3 LD d'allures gaussiennes (Talvensaari *et al.*, 2002), nombre total de pics (Soiffer *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2000)...). Malheureusement, un seul score ne peut correctement résumer toute l'information contenue dans les CDR3 LD représentant le répertoire des cellules T. Afin de réduire le nombre de variables, des méthodes factorielles ont été utilisées avec succès (Collette *et al.*, 2004; Collette *et al.*, 2003; Guillet *et al.*, 2004).

Approches Statistiques

1 Approche « comparaison par paires »

1.1 Description de l'approche

Suite à la revue des différentes méthodes d'analyse des CDR3 LD existantes, la méthode de « comparaison par paires » de CDR3 LD a été développée. Elle se base sur une analyse précise de la forme des CDR3 LD avec comme objectif l'évaluation des ressemblances/différences entre des individus.

1.1.1 Le pourcentage de perturbation

1.1.1.1 Définition

Présenté dans la revue (Miqueu *et al.*, 2007), le calcul du pourcentage de perturbation pour chaque CDR3 LD a été une avancée majeure dans l'exploitation des spectres (Gorochov *et al.*, 1998). Plus précisément, le calcul du pourcentage de perturbation est une méthode quantitative consistant à comparer pic à pic la CDR3 LD d'un individu avec une distribution moyenne de longueurs de CDR3 issue d'un groupe de référence.

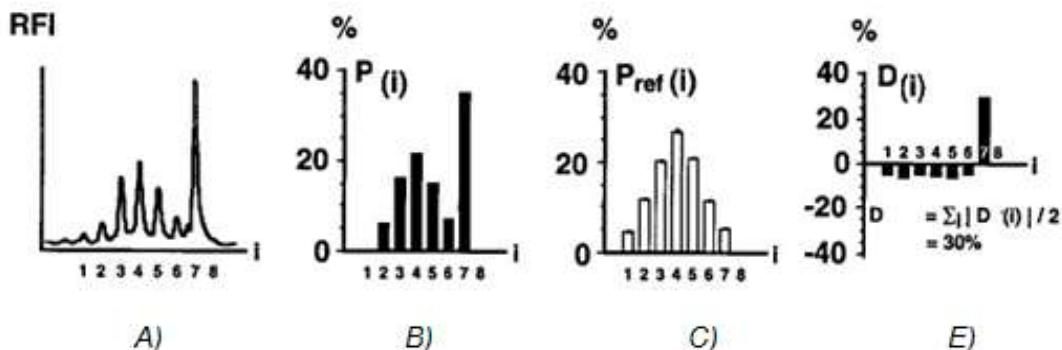


Figure 9 : Calcul du pourcentage de perturbation D (d'après (Gorochov *et al.*, 1998)). RFI : Fluorescence Brute (Raw Fluorescence) pour le pic i ; $P_{(i)}$: pourcentage du pic i ; $P_{ref(i)}$: pourcentage du pic i pour la distribution moyenne de référence. $D_{(i)} = P_{(i)} - P_{ref(i)}$. D : le pourcentage de perturbation.

D'après la figure 9, le pourcentage de perturbation D (E) est égal à la somme des différences locales entre un spectre d'électrophorèse (A) - converti en distribution de probabilités (B) - et la distribution moyenne (C) issue du groupe de référence.

Il existe trois limites majeures au pourcentage de perturbation : 1) l'utilisation d'une distribution moyenne de référence 2) l'incapacité de renseigner sur la forme « réelle » de la distribution étudiée 3) l'impact de décalages artéfactuels.

1.1.1.2 Le groupe de référence

Le groupe de référence, tel que défini par Gorochov *et al.* (Gorochov *et al.*, 1998), est un groupe d'individus sains dont les CDR3 LD ont des allures gaussiennes, pour la majorité des gènes V β . Un test de Kolmogorov-Smirnov est employé pour tester la différence par rapport à une distribution gaussienne théorique. Dans le cadre des analyses réalisées au laboratoire, 14 individus sains ont été recrutés pour former un groupe de référence. A partir des CDR3 LD de ces individus, les distributions moyennes pour chacune des 26 familles de gènes V β ont été calculées (figure 10A).

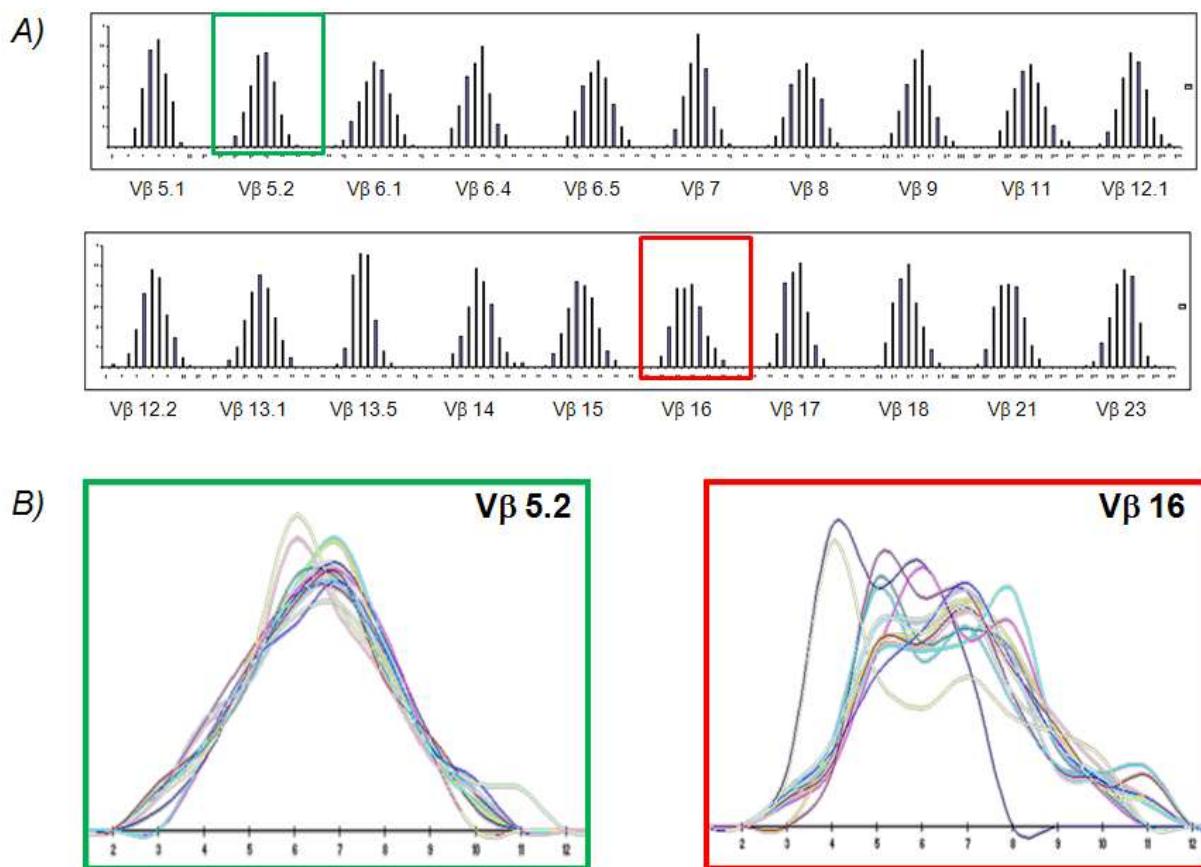


Figure 10 : Distributions de référence des longueurs de CDR3 pour 20 familles de gènes V β (depuis V β 5.1 au V β 23). (A) Distributions moyennes des individus de référence pour 20 familles de gènes V β . (B) Détail des distributions des 14 individus de référence ayant permis de calculer les distributions moyennes pour les familles de gènes V β 5.2 et V β 16.

Le détail des 14 distributions constituant les distributions moyennes des gènes V β 5.2 et V β 16, pris comme exemple, illustre la première limite. En effet, elle réside dans le calcul d'une distribution moyenne, qui « gomme » les différences entre les individus du groupe de référence. La moyenne devient un indicateur biaisé lorsque la population des distributions du groupe de référence, pour un gène donné, n'est pas homogène (par exemple le V β 16 figure 10B).

1.1.1.3 « Des formes différentes, une valeur identique »

La deuxième limite réside dans l'incapacité du pourcentage de perturbation à « décrire » la CDR3 LD. En effet, il est difficile d'associer à une valeur du pourcentage de perturbation une forme de CDR3 LD. Comme l'illustre la figure 11, les pourcentages de perturbation de deux CDR3 LD, représentant respectivement une distribution perturbée par la présence d'expansions clonales avec des CDR3 courtes (**SHORT**) et une avec des CDR3 longues (**LONG**), ont été calculés par rapport à une référence gaussienne (**GAUSS**). A cause du mode de calcul, les pourcentages de perturbation des deux distributions sont identiques, illustrant l'incapacité de ce score à dissocier ces deux types très distincts de CDR3 LD.

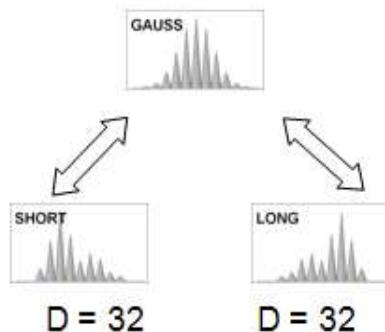


Figure 11 : Illustration du biais du pourcentage de perturbation « des formes différentes, un pourcentage de perturbation identique ». D : pourcentage de perturbation.

1.1.1.4 L'impact des décalages artéfactuels

La troisième limite à l'utilisation du pourcentage de perturbation est due à un artéfact technique, repéré suite à une étude de reproductibilité des formes de CDR3 LD. Il a été remarqué que les CDR3 LD issues du même échantillon (réplicat) peuvent être décalées de un à deux (rare) acides aminés. Ce décalage peut être dû à un artéfact de migration des fragments amplifiés sur le gel de séquence. Ce problème est surtout rencontré chez les longs fragments comme ceux issus des gènes V β 6.1 ou V β 6.5. La figure 12 illustre cet artéfact

technique sur la distribution de longueur de CDR3 du gène V β 6.5 pour l'échantillon TOL1 réalisé en duplicit. Dans cet exemple, les deux profils obtenus en duplicit, TOL1_6.5 et TOL1B_6.5, ont des formes similaires ; cependant, leurs pourcentages de perturbation sont très différents, respectivement 60% et 25% (décalage du pic majoritaire respectivement en longueur 3 puis 5).

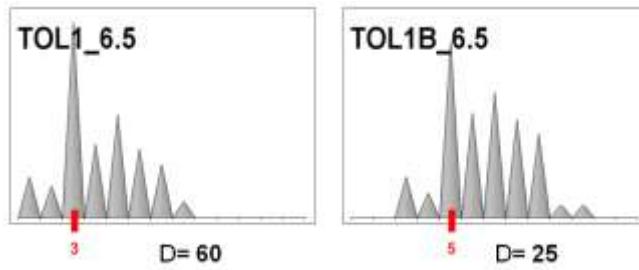


Figure 12 : Duplicit de la distribution de longueurs de CDR3 du gène V β 6.5 pour l'échantillon TOL1 avec leur pourcentage de perturbation respectif (D).

Le décalage peut aussi être dû à des problèmes d'assignation de pics lors de la transformation des distributions de longueurs en « nucléotides » en distributions en « acides aminés » (voir paragraphe 2.2 Résumé et Discussion).

1.1.2 Approche « comparaison par paires de CDR3 LD »

L'alternative « comparaison par paires de CDR3 LD » consiste à comparer toutes les CDR3 LD d'une étude entre elles sans faire intervenir les CDR3 LD moyennes issues d'un groupe de référence. Il s'agit d'une comparaison systématique « par paires » de toutes les distributions. La figure 13 illustre la différence entre cette approche et le pourcentage de perturbation.

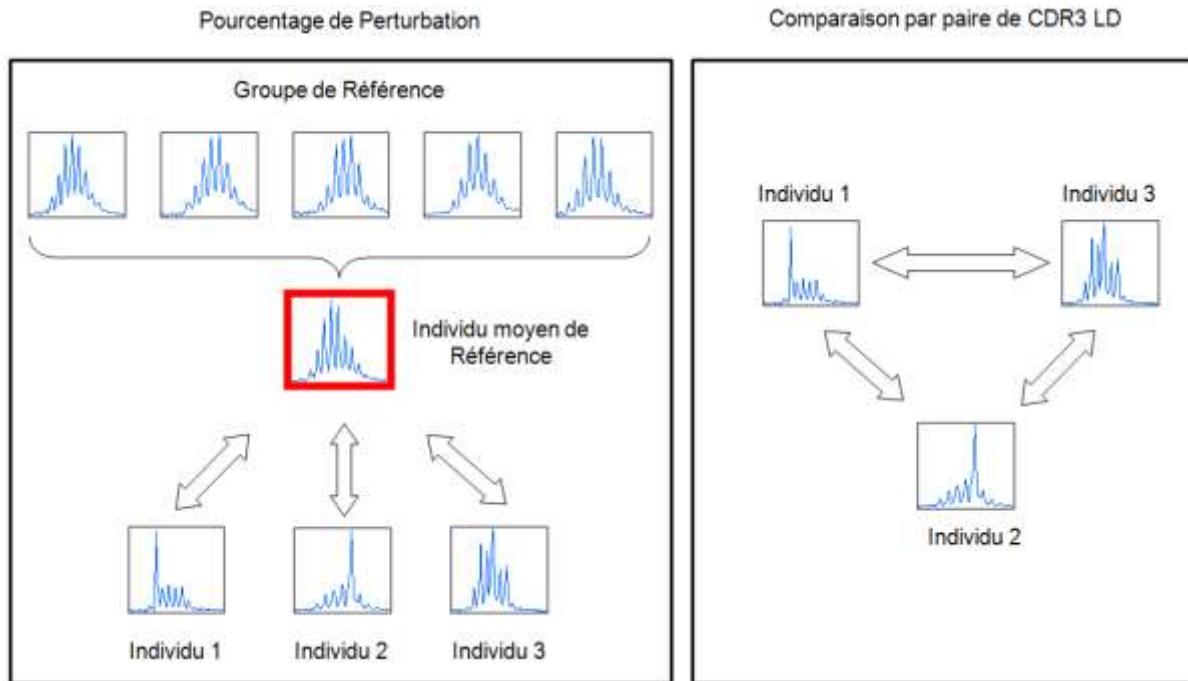


Figure 13 : Synthèse des deux stratégies d'analyses des CDR3 LD : pourcentage de perturbation et comparaison par paires de CDR3 LD.

1.1.3 Distance mathématique

L'approche « comparaison par paires de distributions » implique le calcul de distances entre toutes les distributions de l'étude. Dans le langage courant, la **distance** entre deux points est mesurée par la longueur du segment qui les relie. En mathématiques, une distance sur un ensemble E dans \mathbb{R}^+ est une application d telle que, quels que soit trois objets x , y et z appartenant à E :

- $d(x,y) = d(y,x)$ (propriété de symétrie),
- $d(x,y)=0$ si et seulement si $x=y$ (propriété de séparation) et,
- $d(x,z)\leq d(x,y) + d(y,z)$ (inégalité triangulaire).

Dans les espaces euclidiens \mathbb{R}^n à n dimensions, les distances de Minkowski entre deux objets x et y , définis par leur coordonnées $(x_1, x_2 \dots x_n)$ et $(y_1, y_2 \dots y_n)$, permettent de définir de manière générale une distance entre deux objets :

$$D_p = \left(\sum_{i=1}^n |x_i - y_i|^p \right)^{1/p}$$

n est le nombre de dimensions, p équivaut à la dimension de la distance.

Dans un espace à deux dimensions, on utilise la distance euclidienne où $p=2$. Il existe d'autres types de distances qui ne possèdent pas toutes les propriétés de symétrie par exemple la distance du chi2, distance entropique...

1.1.4 Positionnement multidimensionnel

Les méthodes de positionnement multidimensionnel (multidimensional scaling, MDS, en anglais) sont des procédures qui permettent d'analyser des données multivariées (Young et Householder, 1938). Basées sur l'analyse des distances entre objets, elles aboutissent à une représentation graphique d'un ensemble de similitudes ou de dissimilarités. Les méthodes de positionnement multidimensionnel représentent chaque objet dans un espace euclidien bi- ou tridimensionnel de telle sorte que deux objets semblables soient représentés par deux points proches l'un de l'autre, et un couple dissemblable par des points éloignés. La notion de similitude ou de dissimilitude est liée au concept de distance. Lorsque n objets ($X_1..X_n$), ayant chacun y caractéristiques sont comparés, $n*(n-1)/2$ distances de Minkowski sont calculées, correspondant aux distances entre chacun des objets pris deux à 2. Ces distances sont représentées dans une matrice carrée symétrique à n lignes et n colonnes avec une diagonale de 0.

La topographie des villes américaines est un exemple permettant d'illustrer la puissance des algorithmes de positionnement multidimensionnel (Young, 1985).

Atlanta	Chicago	Denver	Houston	Los Angeles	Miami	New York	San Francisco	Seattle	Washington, DC	
0	587	1212	701	1936	604	748	2139	2182	543	Atlanta
587	0	920	940	1745	1188	713	1858	1737	597	Chicago
1212	920	0	879	831	1726	1631	949	1021	1494	Denver
701	940	879	0	1374	968	1420	1645	1891	1220	Houston
1936	1745	831	1374	0	2339	2451	347	959	2300	Los Angeles
604	1188	1726	968	2339	0	1092	2594	2734	923	Miami
748	713	1631	1420	2451	1092	0	2571	2408	205	New York
2139	1858	949	1645	347	2594	2571	0	678	2442	San Francisco
2182	1737	1021	1891	959	2734	2408	678	0	2329	Seattle
543	597	1494	1220	2300	923	205	2442	2329	0	Washington, DC

Figure 14 : Distances en miles « à vol d'oiseau » entre 10 villes américaines (d'après (Young, 1985)).

A partir du tableau de distances ci-dessus (figure 14), le programme ALSCAL (SPSS 12.0) (Young, 1985) représente dans une carte bidimensionnelle les positions relatives des villes entre elles (figure 15).

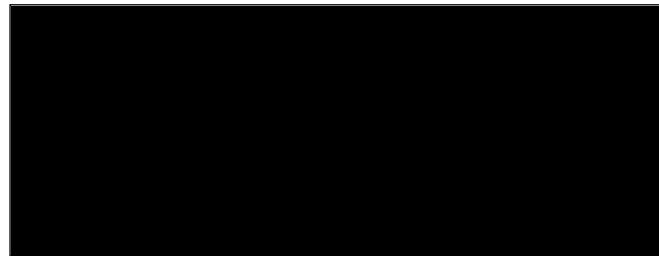


Figure 15 : Carte issue de l'analyse par MDS des distances (en miles) entre 10 villes américaines (d'après (Young, 1985)).

Le modèle classique du positionnement multidimensionnel a été amélioré en 1952 par Torgerson (Torgerson, 1952) pour permettre de déterminer des coordonnées sur une carte à partir des dissimilarités.

1.1.5 Comparaison de l'approche « comparaison de distributions » avec le pourcentage de perturbation

Comme pour l'exemple de la cartographie des villes américaines, l'objectif est d'établir une topologie des typologies de formes de CDR3 LD. Il s'agit d'étendre le concept de distance aux CDR3 LD. En effet, une faible distance entre deux distributions doit indiquer une morphologie similaire entre les deux distributions. Au niveau mathématique, une CDR3 LD doit être considérée comme un vecteur de 13 valeurs (13 longueurs possible de CDR3). La similitude entre deux CDR3 LD va correspondre à la valeur de la distance de Minkowski d'ordre 2 calculée entre les deux objets « CDR3 LD » à 13 dimensions. Dans la formule présentée précédemment on considère n=13 et p=2.

1.1.5.1 Exemple

Afin de mettre en évidence l'apport de l'approche « comparaison par paires » par rapport au pourcentage de perturbation, un jeu de CDR3 LD a été généré informatiquement (figure 16).

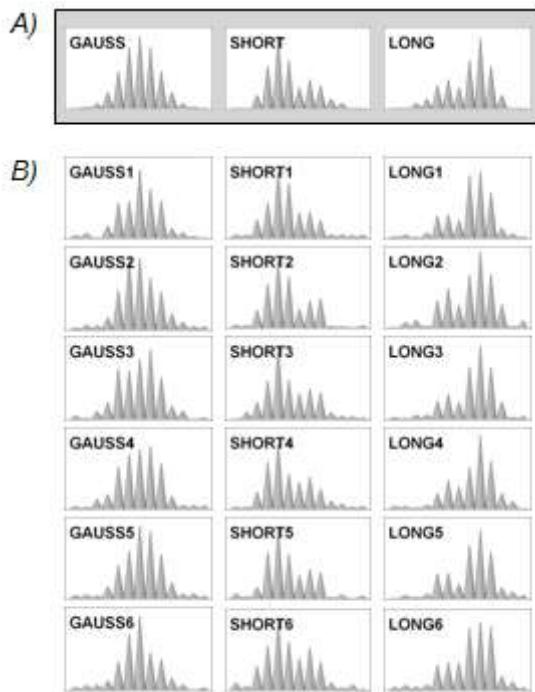


Figure 16 : Jeu de données pour la comparaison du pourcentage de perturbation avec l'approche de comparaison par paires.

Trois distributions « modèles » ont été imaginées (A). Le modèle classique de CDR3 LD, caractérisant un répertoire diversifié (Gorski *et al.*, 1994; Pannetier *et al.*, 1995), est représenté par une distribution gaussienne théorique désignée par l'abrégué GAUSS. Une distribution gaussienne perturbée par la présence d'expansions clonales avec de courtes tailles de CDR3 a été simulée (SHORT) ainsi que son opposée (LONG), représentée par une distribution gaussienne perturbée par la présence d'expansions clonales avec de longues tailles de CDR3. A partir de ces trois modèles, une population de 18 distributions artificielles (B) dérivées des trois modèles présentés en (A) a été générée : GAUSS (6), SHORT(6) et LONG(6). Ces 18 profils diffèrent des distributions modèles grâce à l'application d'effets aléatoires (figure 16). Afin de calculer les pourcentages de perturbation pour les 6 distributions SHORT et les 6 distributions LONG, une distribution moyenne a été calculée à partir des 6 distributions du groupe GAUSS. Cette distribution moyenne correspond à la distribution moyenne calculée à partir du groupe de référence utilisé pour le calcul du pourcentage de perturbation (Gorochov *et al.*, 1998).

SHORT		LONG	
SHORT1	32,0%	LONG1	33,2%
SHORT2	32,7%	LONG2	31,9%
SHORT3	30,6%	LONG3	34,6%
SHORT4	31,2%	LONG4	35,4%
SHORT5	31,0%	LONG5	32,6%
SHORT6	27,7%	LONG6	30,6%
M = 30,9%		M = 33,1%	
s = 1,7%		s = 1,7%	

Figure 17 : Pourcentages de perturbation calculés pour les 12 distributions des groupes LONG et SHORT. Les pourcentages de perturbation moyens (M) et écart-types (s) de chacun des deux groupes ont aussi été calculés.

L'équivalence des valeurs des pourcentages de perturbation des distributions SHORT et LONG (figure 17) ne permet pas de différencier les distributions de ces deux groupes (test de Kruskal Wallis).

Afin de comparer les deux approches, les 18 distributions issues des modèles GAUSS, LONG et SHORT ont également comparées deux à deux et $18*(18-1)/2$ distances de Minkowski ont été calculées et organisées dans une matrice.

	GAUSS1	GAUSS2	GAUSS3	GAUSS4	GAUSS5	GAUSS6	LONG1	LONG2	LONG3	LONG4	LONG5	LONG6	SHORT1	SHORT2	SHORT3	SHORT4	SHORT5	SHORT6
GAUSS1	0	24	21	19	18	24	67	86	73	71	67	63	73	74	63	64	69	59
GAUSS2	24	0	28	22	20	14	72	85	75	72	70	66	80	85	83	85	85	58
GAUSS3	21	28	0	13	19	35	63	65	69	73	65	63	82	82	62	55	55	49
GAUSS4	19	22	13	0	17	31	64	52	67	71	62	59	80	82	57	59	68	51
GAUSS5	18	20	18	17	0	28	57	63	67	68	58	55	74	76	67	70	71	60
GAUSS6	24	14	35	31	26	0	80	71	83	79	79	74	83	86	86	88	87	81
LONG1	67	72	63	64	57	80	0	24	18	23	10	17	104	100	94	95	100	80
LONG2	88	85	85	82	83	71	24	0	20	23	22	25	95	92	86	88	90	84
LONG3	73	76	69	67	83	18	20	0	16	15	17	106	102	96	96	101	95	
LONG4	71	72	73	71	68	79	23	23	16	0	19	21	102	102	93	93	97	88
LONG5	87	70	65	62	58	79	10	22	15	19	0	15	102	99	93	93	98	89
LONG6	63	66	63	59	55	74	17	25	17	21	16	0	99	98	88	90	94	85
SHORT1	73	60	62	80	74	83	104	95	106	102	102	99	0	15	18	20	20	21
SHORT2	74	65	62	62	78	86	100	92	102	102	89	98	16	0	20	22	13	26
SHORT3	63	63	55	57	87	95	94	85	98	93	93	89	19	20	0	15	17	16
SHORT4	84	65	65	59	70	68	95	86	96	93	93	90	20	22	15	0	17	18
SHORT5	89	65	57	58	71	87	100	90	101	97	98	94	20	13	17	17	0	23
SHORT6	59	58	49	51	60	61	90	84	95	88	89	85	21	26	18	19	23	0

Figure 18 : Matrice de distances de Minkowski calculées à partir des 18 distributions SHORT, LONG et GAUSS.

Les trois sous-matrices colorées en gris clair contiennent les distances des individus au sein de leur groupe d'appartenance. La première diagonale, colorée en gris foncé, correspond à

la distance d'une distribution à elle-même (distance nulle). La matrice carrée symétrique (figure 18) contenant les distances entre les profils a été soumise à la méthode MDS : programme ALSCAL, SPSS 12.0 (Young, 1985). Le positionnement multidimensionnel fournit un plan dans lequel les CDR3 LD sont positionnées en fonction des distances (dissimilitudes) calculées entre elles.

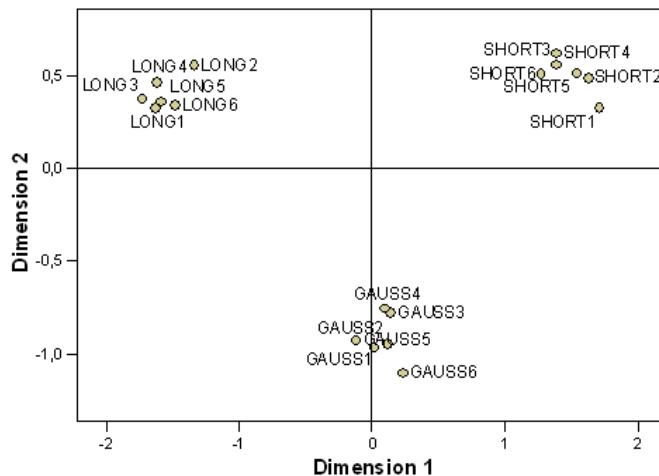


Figure 19 : Positionnement multidimensionnel des 18 distributions « SHORT », « LONG » et « GAUSS » (ALSCAL, SPSS 12.0).

Le positionnement sur la carte des distributions issues des trois groupes illustre la capacité de la méthode à disposer les distributions en fonction de leur morphologie. En effet, les faibles distances, calculées entre les distributions provenant du même « modèle » (cases colorées en gris clair dans la figure 18), s'opposent aux fortes distances calculées entre des distributions issues de « modèles » différents (cases blanches dans la figure 18) et induisent le regroupement des distributions « SHORT », « LONG » et « GAUSS » en fonction de leur groupe d'appartenance (figure 19).

La discrimination entre les deux groupes « SHORT » et « LONG » est possible en utilisant l'approche de comparaison par paires alors qu'elle est donc impossible en utilisant la méthode du pourcentage de perturbation. En conclusion, l'approche « comparaison par paires de distributions » est une méthode qui rassemble, sans a priori, les CDR3 LD qui se ressemblent.

1.1.5.2 Alignement des distributions

L'exemple présenté ci-dessus, illustre comment la méthode des « comparaisons par paires de distributions » face aux deux premières limites du pourcentage de perturbation : le groupe de référence et le fait d'obtenir, dans certains cas, un score identique pour des formes différentes. En revanche, l'artefact illustré à la figure 12 perturbe toujours la caractérisation des formes de distributions. En effet, un décalage entre deux profils identiques conduit à une distance importante.

Afin de résoudre ce problème, un développement spécifique, inspiré du domaine bioinformatique, a été implémenté. En effet, l'approche des « comparaisons par paire de distributions » peut être associée aux problématiques d'alignement global de séquences résolues en partie par Needleman et Wunsch dans les années 70 (Needleman et Wunsch, 1970). Il est possible de transposer la problématique des similitudes de séquences à celles des formes de distributions. L'algorithme de Needleman et de Wunsch porte sur la recherche du meilleur alignement entre deux séquences ainsi que sur la production d'un score caractérisant le meilleur alignement. Dans le cadre des CDR3 LD, la recherche du meilleur « alignement » entre deux distributions a aussi été développée.

Pour quantifier la ressemblance entre deux distributions, indépendamment de leur position dans l'intervalle, il est nécessaire de faire glisser les distributions l'une par rapport à l'autre et de calculer la distance entre les distributions pour chaque alignement. La figure 20 illustre cette technique pour deux couples de distributions. Les distributions DLR8_9 et DLS8_9 (figure 20A) sont de forme équivalente et sont positionnées au même endroit dans l'intervalle. La plus petite distance de Minkowski ($y=25$) est celle correspondant à la situation où le décalage est nul ($x=0$). Les distributions FSL8_19 et FLR8_19 (figure 20B) ont aussi une forme proche, mais elles sont décalées d'un bin (pic majoritaire au bin 6 pour FLS8_19 et au bin 7 pour FLR8_19). La plus petite distance ($y=32$) est obtenue quand FSL8_19 est décalé d'1 bin sur la droite ($x=1$).

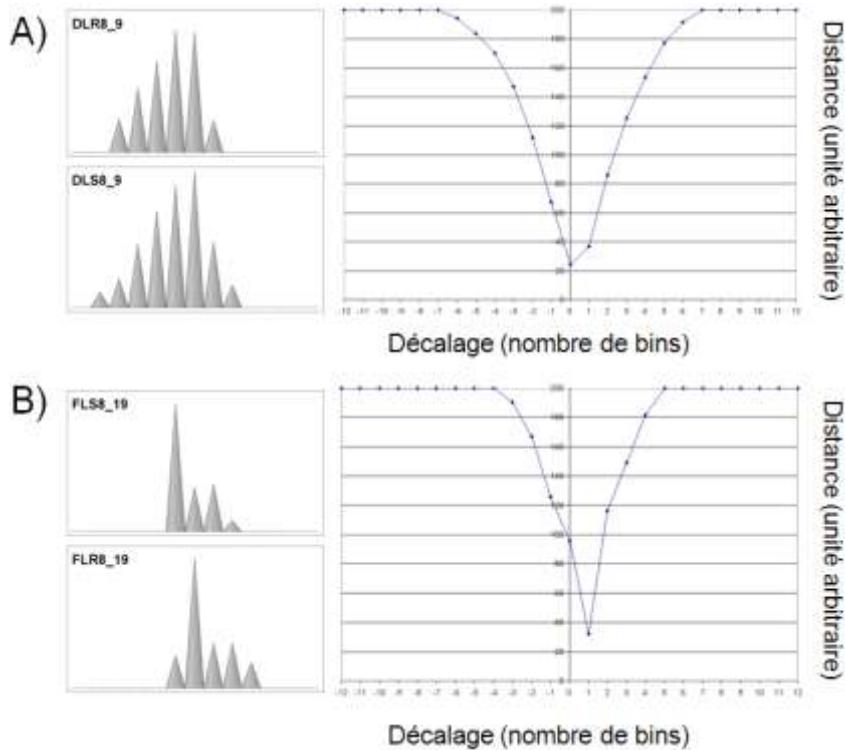


Figure 20 : Exemples de recherche du meilleur alignement entre deux couples de distributions. Les distances calculées sont des distances de Minkovski d'ordre 1. Le décalage simulé entre les deux distributions est défini par le nombre de bins décalés de -12 à +12.

Ce développement, permettant de trouver la plus petite distance entre deux distributions, avait été proposé avec un glissement contraint à deux bins (2 acides aminés) au maximum. Aujourd’hui, cette procédure n’est plus d’actualité, la robustesse et la reproductibilité du séquenceur à capillaire par rapport au séquenceur à gel ne produisant plus de décalages artéfactuels.

1.2 Exemple d’application : Reproductibilité de la méthode Immunoscope

La reproductibilité de la méthode Immunoscope est liée à la faculté de reproduire la même forme de CDR3 LD à partir du même échantillon. La méthode est dite reproductible si les profils issus d’un même échantillon, et obtenus dans des conditions différentes, sont similaires. Dans cette étude, il s’agit de quantifier la reproductibilité de la méthode sur un échantillon de référence.

1.2.1 Matériels et méthodes

L'échantillon utilisé est un échantillon commercial composé d'ARN total collecté à partir de thymus humains issus de trois caucasiens mâles décédés par mort subite, à l'âge de 22, 30 et 32 ans (Clontech référence 64028, Saint-Germain-en-Laye). L'ARN total est transcrit en ADNc en utilisant le kit de synthèse d'ADN complémentaire standard d'Invitrogen (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). L'ADN complémentaire est ensuite amplifié au moyen de couples d'amorces spécifiques de chaque gène V β (Sebille *et al.*, 2001). Par PCR, les produits d'amplification subissent un marquage grâce à une amorce fluorescente puis sont soumis à une électrophorèse afin de les séparer en fonction de leur longueur (Pannetier *et al.*, 1993), sur un séquenceur à gel (ABI Prism 377 Applied Biosystems). Les profils d'électrophorèse ainsi obtenus sont ensuite transformés en distributions mathématiques normalisées de telle sorte que l'aire totale soit égale à 1. L'échantillon est analysé, de manière indépendante, pour chacune des 26 familles de gènes V β qui composent le TcLandscape. Les profils ont été produits dans un intervalle de 20 mois.

1.2.2 Analyse statistique

Pour chacun des 26 gènes V β , l'approche consiste à évaluer le degré de similitude des distributions de longueur de CDR3 entre elles. Une mesure de la similitude nommée « pourcentage de similitude », P_s, a été développée. Pour chaque couple de CDR3 LD, il s'agit de calculer une distance de Minkowski d'ordre 1, D₁. Elle permet d'estimer le nombre de différences entre les deux distributions (voir paragraphe 1.1.3 intitulé *Distance mathématique*). La distance D₁ varie de la valeur 0, pour une identité complète entre les deux distributions, à la valeur 2 : lorsque les distributions ne se superposent pas. Le pourcentage de similitude (P_s) est inversement proportionnel à la distance qui sépare les deux distributions, il est défini par la formule suivante :

$$P_s = 100 - (D_1/2)$$

Le pourcentage de similitude varie de 0 à 100%, 100% de similitude représentant une identité parfaite des distributions. Pour quantifier la reproductibilité de la méthode Immunoscope en fonction du gène, toutes les comparaisons possibles de paires de

distributions ont été calculées pour chaque gène. Lorsqu'un échantillon est analysé n fois pour un gène $V\beta$ particulier, $n*(n-1)/2$ pourcentages de similitudes sont calculés.

1.2.3 Résultats et discussion

En fonction du gène $V\beta$, l'échantillon a été analysé, de manière indépendante, entre 47 et 57 fois ; 52,12 fois en moyenne.

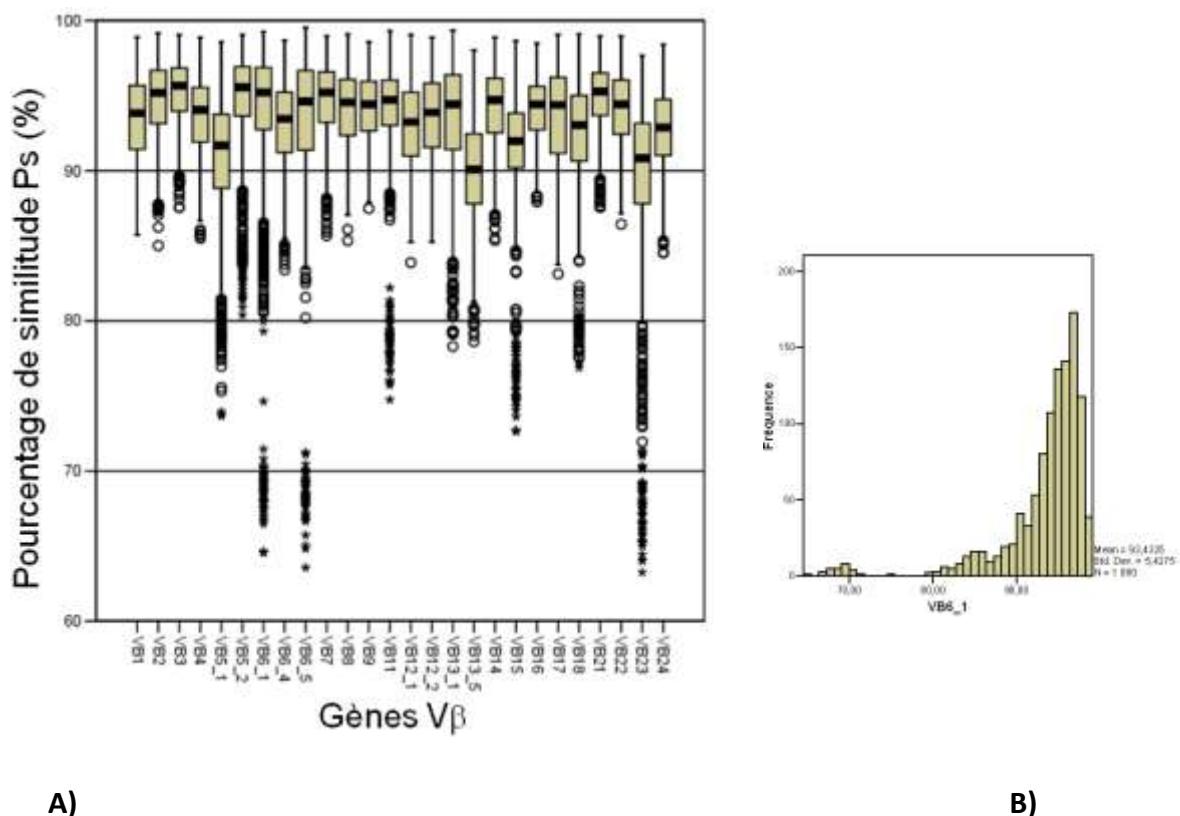


Figure 21 : Représentation sous forme de « boîte à moustache » des pourcentages de similitude (P_s) en fonction des gènes $V\beta$. Exemple de distribution des pourcentages de similitude pour le gène $V\beta$ 6.1.

D'après la figure 21A), il apparaît que la majorité des pourcentages de similitudes est supérieure à 90%. Il faut noter la présence de pourcentages de similitude très faibles (marqués par des (o) ou des (*) siils sont inférieurs à 1,5 ou 3 quartiles). Ces faibles pourcentages de similitude peuvent être expliqués par la présence de quelques distributions, très différentes des autres. Compte tenu du mode de calcul des P_s (à partir de distances entre deux distributions), chaque distribution atypique est responsable d'un groupe de « $n-1$ » pourcentages de similitude avec des valeurs plus faibles. Cet effet est visible au niveau des 70% de similitude sur la distribution des pourcentages de similitude du

$V\beta$ 6.1 (figure 21B). Les distributions de pourcentages de similitude ne satisfont donc pas l'hypothèse de normalité ; les médianes et les intervalles interquartiles (interquartile range, IQR) ont donc été calculés (figure 22).

Gènes $V\beta$	N (CDR3 LD)	Médiane	IQR
VB1	52	93,82	4,25
VB2	53	95,20	3,55
VB3	47	95,68	2,88
VB4	54	94,04	3,64
VB5,1	57	91,69	4,92
VB5,2	51	95,55	3,30
VB6,1	52	95,22	4,13
VB6,4	56	93,44	4,02
VB6,5	51	94,60	5,30
VB7	53	95,22	3,37
VB8	53	94,56	3,75
VB9	55	94,44	3,30
VB11	50	94,73	3,01
VB12,1	48	93,24	4,25
VB12,2	50	93,89	4,28
VB13,1	55	94,44	4,96
VB13,5	51	90,11	4,66
VB14	53	94,72	3,63
VB15	53	92,00	3,64
VB16	53	94,39	2,90
VB17	53	94,37	5,06
VB18	51	93,04	4,36
VB21	51	95,26	2,83
VB22	49	94,43	3,60
VB23	54	90,82	5,35
VB24	50	92,87	3,73
Moyenne		52,12	93,92
			3,95

Figure 22 : Médianes et écarts interquartiles (IQR) des pourcentages de similitude calculés à partir de N CDR3 LD (CDR3 LD) pour chacun des 26 gènes $V\beta$.

D'après la valeur des médianes pour les différents gènes $V\beta$, le pourcentage de similitude médian moyen, tous gènes confondus, est de 93,92% et l'écart interquartile moyen est de 3,95%. La variabilité des pourcentages de similitude médians, entre les différents gènes, n'est pas très importante (min : 90,11 pour le $V\beta$ 13,5, max : 95,68 pour le $V\beta$ 3). Les gènes $V\beta$ 5,1, $V\beta$ 13,5 et $V\beta$ 23 montrent la moins bonne reproductibilité. Il est à noter qu'il n'y a pas de corrélation entre le pourcentage de similitude médian et l'efficacité de PCR des amorces ; ni entre le pourcentage de similitude médian et le niveau d'expression moyen.

Les valeurs des pourcentages de similitude et des écarts interquartiles sont satisfaisantes et laissent apparaître une reproductibilité correcte de la méthode. Dans le cadre de l'étude de triplicats, les pourcentages médians ainsi que les IQR permettent de définir des intervalles

en dehors desquels la similitude des formes des distributions de triplicats n'est pas acceptable. Dans une démarche d'assurance qualité, l'expérimentateur sera alors alerté sur la mauvaise reproductibilité des données.

1.3 Modélisation d'un suivi dans le temps

L'approche de « comparaison par paires de distributions » peut aussi fortement contribuer à l'analyse de données longitudinales. En effet, le suivi d'un patient dans le temps peut être abordé avec une approche basée sur la notion de distance. Pour chaque gène $V\beta$, il s'agit de calculer les $n(n-1)/2$ distances entre les n points de l'individu dans le temps.

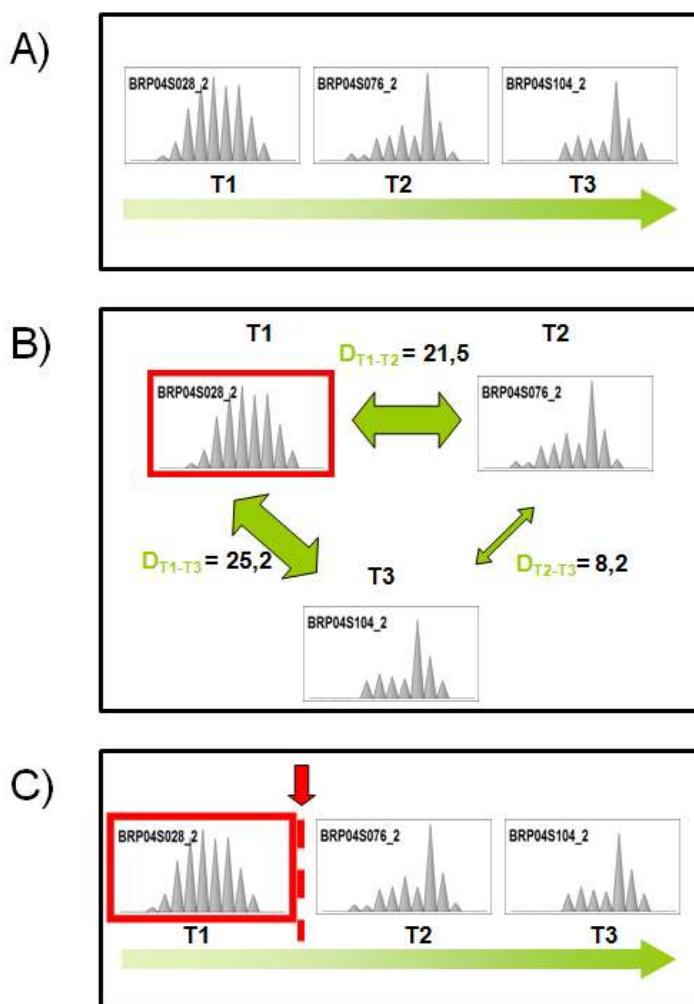


Figure 23 : Suivi dans le temps au moyen des distances. A) Exemple d'évolution au cours du temps de la forme d'une CDR3 LD (3 points dans le temps T1, T2 et T3). B) Calcul des $3*(3-1)/2$ distances D entre les trois CDR3 LD. C) Mise en évidence du changement de forme entre T1 et T2 avec persistance de la forme en T3 : $D_{T2-T3} \ll D_{T1-T2}$ et $D_{T2-T3} \ll D_{T1-T3}$.

La figure 23 illustre une façon de déceler de manière automatisée des modifications de CDR3 LD au cours du temps, pour un $V\beta$ précis. Dans cet exemple (A), la distribution d'allure gaussienne, au temps T1, est modifiée par l'apparition d'expansions clonales visibles à T2 ; la distribution demeure quasi inchangée à T3. Le calcul des distances entre les trois profils (B) illustre cette situation. La faible distance entre T2 et T3 (D_{T2-T3}) indique leur forte ressemblance. Les distances plus importantes entre T1 et T2, et, T1 et T3 indiquent une différence de forme à partir de T2 (C). *L'œil trompe moins que l'esprit* (Léonard de Vinci).

Pour une analyse globale de la modification du répertoire, la somme des 26 distances (26 familles de gènes $V\beta$), calculées à partir des CDR3 LD d'un individu à deux temps donnés, permet d'obtenir une distance globale pour les deux points dans le temps. La stabilité ou l'évolution au cours du temps des formes des CDR3 LD reflète l'activité du système immunitaire. La quantité de différences entre un TcLandscape à t_i et un TcLandscape à t_{i+1} reflète l'activité du système immunitaire entre les deux temps, c'est-à-dire la l'importance de la mobilisation des lymphocytes T pour passer d'un état immunologique à un autre.

Cette approche a été utilisée dans une étude sériée des altérations du répertoire T dans le sang de patients atteints de sclérose en plaques (voir partie Applications Cliniques). Les corrélations entre l'évolution du répertoire au cours du temps et les paramètres cliniques et données issues de l'Imagerie par Résonnance Magnétique a montré la pertinence de cette approche.

1.4 Application aux TcLandscapes : Analyse non supervisée

Il s'agit de proposer une analyse descriptive des n TcLandscapes sans a priori. La stratégie se déroule en trois étapes (voir figure 24) :

1. Pour chaque CDR3 LD, des variables témoignant de la forme des distributions sont calculées.

Pour l'analyse de n TcLandscapes, la méthode de « comparaison par paires de CDR3 LD » est utilisée, indépendamment, pour chacun des 26 gènes $V\beta$. Une matrice de distances de Minkowski d'ordre 2 de dimensions « $n \times n$ » est générée à partir des n CDR3 LD de chaque

gène V β . Grâce au positionnement multidimensionnel, une carte est générée pour chaque gène V β positionnant ainsi les n CDR3 LD. Les coordonnées des CDR3 LD sur les axes factoriels indiquent leurs positions dans l'espace à n dimensions. En considérant les trois premières coordonnées factorielles pour chaque CDR3 LD, le nombre de variables par CDR3 LD, initialement de 13, est réduit à 3. Ces trois variables sont les indicateurs des formes des CDR3 LD.

2. L'information résumant la forme de chaque CDR3 LD est pondérée par la quantité de transcrits qui lui est associée.

L'objectif de cette pondération est d'affecter un plus grand poids, dans l'analyse, aux CDR3 LD présentes en forte quantité. En effet, une faible quantité de transcrits peut engendrer des profils perturbés par rapport à la distribution gaussienne : une perturbation qui ne serait pas due à des expansions clonales, mais plutôt à un défaut de cellules dans l'échantillon. Mathématiquement, cette pondération consiste à attribuer un poids à chaque triplet de variables issues de l'étape précédente.

3. Utilisation d'une analyse en composantes principales pour comparer tous les TcLandscapes de l'étude.

Cette étape finale permet de synthétiser les différences entre les individus, en intégrant les analyses des 26 gènes V β . L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode statistique descriptive permettant de comprendre l'organisation des données et de visualiser les corrélations entre les variables de l'étude (Pearson, 1905).

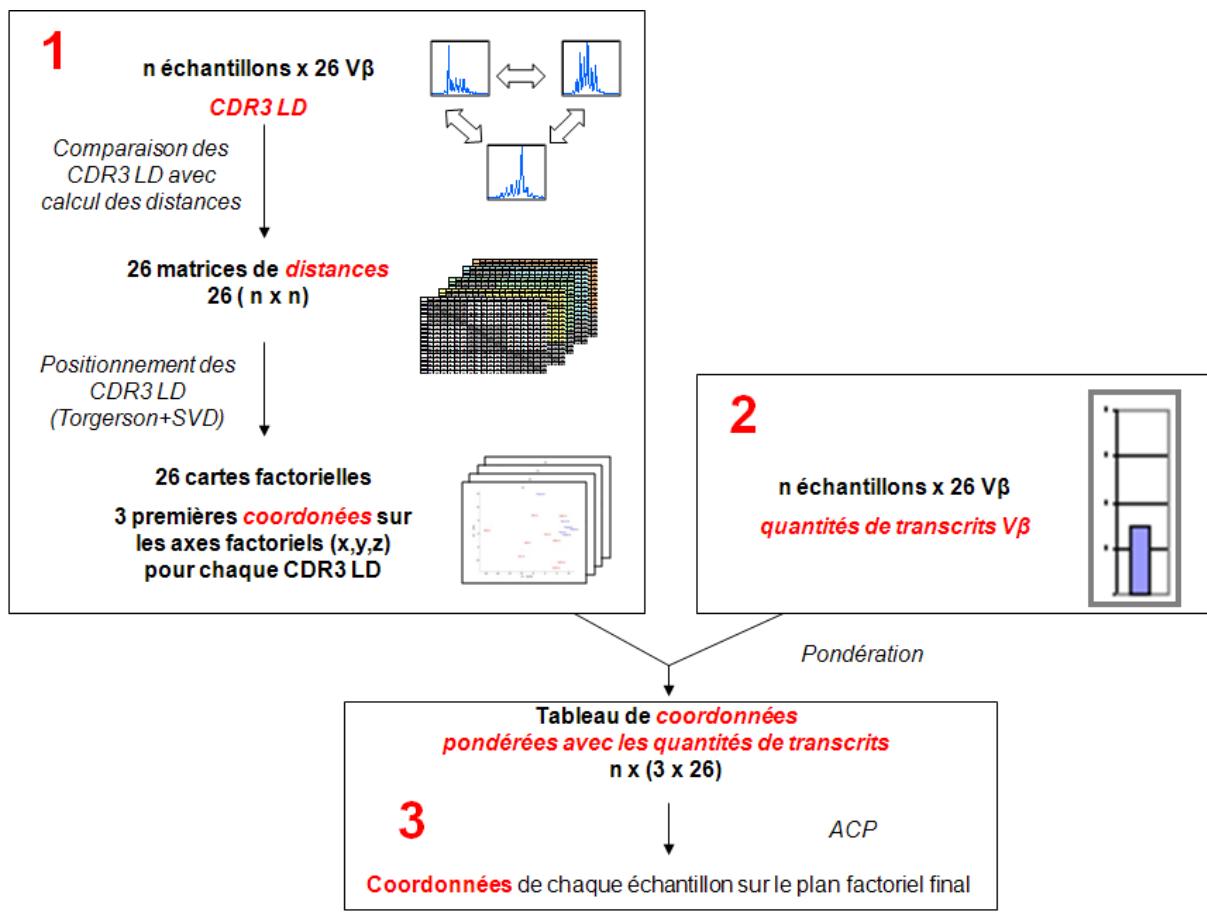


Figure 24 : Stratégie d'analyse non supervisée des TcLandscapes.

En conclusion pour chaque gène V β , l'approche de « comparaison par paires de distributions » permet de décrire chaque CDR3 LD en fonction de toutes les autres. Cette description « relative » et « gène V β spécifique » est ensuite associée à l'information de quantité de transcrits. La pondération dans l'ACP de la forme de la CDR3 LD par la quantité de transcrits correspond à l'analyse intuitive faite par l'expert qui se focalise sur la forme des CDR3 LD des gènes V β fortement exprimés.

Un exemple d'utilisation de ce type d'analyse non supervisée est détaillé dans le poster dans la partie Résultats. L'approche a été utilisée sur les données TcLandscape de patients greffés rénaux opérationnellement tolérants et présentant des signes de rejet chronique. Il s'agit de montrer la discrimination qui s'opère entre deux statuts cliniques au niveau de leur répertoire. Ces résultats ont été présentés oralement au World Transplantation Congress 2006 (Boston) et sous forme de poster à l'European Congress of Immunology 2006 (Paris).

1.5 Conclusions

La recherche de similitudes entre distributions est un concept intéressant. Il a déjà été utilisé dans le cadre précis de la comparaison de profils dans deux conditions différentes. Fozza *et al.*, par exemple, a comparé les formes des distributions pour des lymphocytes régulateurs CD25+, par rapport à des cellules CD4+CD25-, dans le cadre d'une transplantation de cellules souches hématopoïétiques (Fozza *et al.*, 2007). Afin de mesurer la similitude entre les profils de jumeaux discordant au niveau de la sclérose en plaques, Haegert *et al.* ont aussi développé une méthode basée sur un coefficient de corrélation entre les distributions (Haegert *et al.*, 1999) (Haegert *et al.*, 2003).

Nous proposons ici une généralisation du concept de distance ; en l'appliquant à n'importe quel type d'étude. La notion de distance entre distributions permet en effet de s'affranchir des biais liés à la comparaison à une distribution moyenne de référence. C'est une stratégie qui évalue les similitudes entre tous les profils de l'étude. Elle possède de solides avantages. Son aspect « auto-organisateur » a deux propriétés majeures :

- L'approche est « aveugle », aucune information n'est nécessaire a priori pour extraire l'information de forme des CDR3 LD.
- De plus, en regroupant automatiquement les profils qui se ressemblent et en éloignant ceux qui diffèrent, la méthode s'approche d'une méthode de reconnaissance de motifs (« pattern recognition »). On peut ainsi évoquer la perspective d'utiliser une banque de données de formes de CDR3 LD prédéfinies pour « reconnaître » la forme de nouvelles distributions.

Dans l'exploitation des TcLandscapes, l'approche par comparaison de profils étudie de manière automatique la similitude entre tous les profils. Couplée à une approche non supervisée (MDS et ACP), elle permet au final une unification de l'ensemble des données en pondérant chaque distribution par sa variable quantitative associée.

L'approche a cependant des limites. Comparée au pourcentage de perturbation, l'information sur la divergence par rapport à une distribution gaussienne est perdue. En effet, la position sur la carte MDS ne donne pas d'indication sur la forme réelle de la

distribution. De plus, l'explosion du nombre de données lié au calcul de distances entre tous les participants de l'étude est une limite de la méthode. Il est en effet nécessaire de calculer les $n*(n-1)/2$ comparaisons. Le nombre total de valeurs passe en effet de « $n \times 13$ » valeurs à « $n \times n$ » valeurs.

En termes d'utilisation et de développement, l'approche par comparaison de distributions a toute sa pertinence dans le domaine des suivis dans le temps. Concernant, l'utilisation dans le cadre de la recherche entre individus elle ne sera plus exploitée compte tenu de sa complexité.

1 Approche « features »

Brevet en cours...

Non publié dans cette thèse

Applications Cliniques

1 Les biomarqueurs

Un biomarqueur (marqueur biologique) est une caractéristique qui peut être objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou comme une réponse à une intervention thérapeutique (Atkinson Jr *et al.*, 2001). Le biomarqueur est mesuré grâce à un essai biologique ou bioessai. Le développement de biomarqueurs répond à différents objectifs comme le diagnostic d'une maladie ou d'un stade de celle-ci, ainsi que la prédition ou le suivi d'une pathologie dans le cadre ou non d'un essai clinique (Atkinson Jr *et al.*, 2001). La découverte de biomarqueurs a aussi pour objectif d'aider à l'identification de patients susceptibles de bénéficier d'une thérapie donnée, ou qui au contraire, seraient sujet à une réponse défavorable vis-à-vis de cette thérapie(Trusheim *et al.*, 2007).

Le concept de biomarqueur est associé aux termes de critère clinique (clinical endpoint) et de critère de substitution (surrogate endpoint). Un critère clinique est une mesure qui reflète l'état des fonctions vitales du patient, de sa survie ou de ses émotions, dans le cadre de la maladie observée ou suivant une intervention thérapeutique. Les critères cliniques sont les caractéristiques les plus crédibles utilisées dans l'estimation des bénéfices ou des risques liés à une intervention thérapeutique. Les critères de substitution sont des biomarqueurs destinés à se substituer à un critère clinique. Le tableau ci-dessous, issu de l'article de Lachenbruch (Lachenbruch *et al.*, 2004), illustre pour différentes pathologies, des critères cliniques avec leurs critères de substitution associés (figure 48).

Maladies	Critère clinique	Critère de substitution
Cancer	Mortalité	Réduction de la taille de la tumeur
Cancer de la prostate	Progression de la maladie	taux de d'antigène carcino-embryonnaire (CEA)
Cancer du colon	Progression de la maladie	Taux d'antigène spécifique de la prostate (PSA)
Infection au HIV	SIDA	Nombre de cellules T CD4
	Progression de la maladie	Virémie dans le plasma
Maladie Cardiovasculaire	Accident vasculaire cérébral	Pression sanguine Infarctus du myocarde Taux de cholestérol
Glaucome	Perte de la vue	Pression intraoculaire

Figure 25 : Exemple de critères de substitution (d'après (Lachenbruch *et al.*, 2004)).

Le critère de substitution a un lien très fort avec son critère clinique ; il tend aussi à être prédictif. Pour être considéré comme un critère de substitution, un biomarqueur doit être :

- sans danger : si possible le bioessai doit être non invasif avec des conséquences minimales sur le patient,
- précoce : le marqueur doit être présent et mesurable tôt dans le processus;
- mesurable : sa mesure doit être reproductible et si possible quantitative ;
- prédictif : des changements au niveau de la valeur du marqueur sont fortement corrélés ou sont prédictifs d'un changement au niveau du critère clinique (Lachenbruch *et al.*, 2004).

Compte tenu de ces pré-requis, peu de biomarqueurs sont de « vrais » critères de substitution . En effet, si de nombreux marqueurs sont associés à un stade de maladie (corrélation), le fait de pouvoir se substituer au critère clinique implique un pronostic clinique sans faille de la part du biomarqueur. Or, il est très difficile de trouver des biomarqueurs qui répondent « correctement » à tous les types de perturbations positives ou négatives qui peuvent affecter le critère clinique. C'est pourquoi les critères de substitution sont rares (Bielekova et Martin, 2004).

Afin de faire la distinction entre la performance du bioessai, qui mesure le biomarqueur, et le lien entre le biomarqueur et le phénomène qu'il décrit, les termes de validation et qualification sont fréquemment employés (Wagner, 2007). La validation consiste à apporter la preuve des performances liées à la mesure du biomarqueur et de déterminer les conditions expérimentales dans lesquelles le bioessai remplit les conditions de reproductibilité, de sensibilité et de spécificité (Lee *et al.*, 2002). La qualification, ou évaluation, est le processus permettant de lier le biomarqueur au processus biologique ou aux critères cliniques (Wagner, 2007).

Quatre classes de biomarqueurs ont été définies par Wagner (figure 49) :

- les biomarqueurs « exploratoires » : Outils de Recherche et de Développement, ils ont une pertinence dans les expériences in vitro ou sur les modèles animaux. Cependant, la preuve d'un lien entre le biomarqueur et un état clinique chez l'Homme n'a pas encore été démontrée.
- les biomarqueurs « de démonstration » : Leur sensibilité et leur spécificité a été évaluée dans le contexte pré-clinique et ils sont liés à un état clinique chez l'Homme. Cependant, leur reproductibilité dans un essai clinique n'a jamais été démontrée.
- les biomarqueurs « de caractérisation » : ils possèdent une sensibilité et une spécificité établies dans le contexte pré-clinique et ont démontré leur reproductibilité dans plus d'une étude prospective chez l'Homme.
- les biomarqueurs « de substitution » : Toutes les données disponibles sur le biomarqueur démontrent que le biomarqueur peut se substituer au critère clinique.

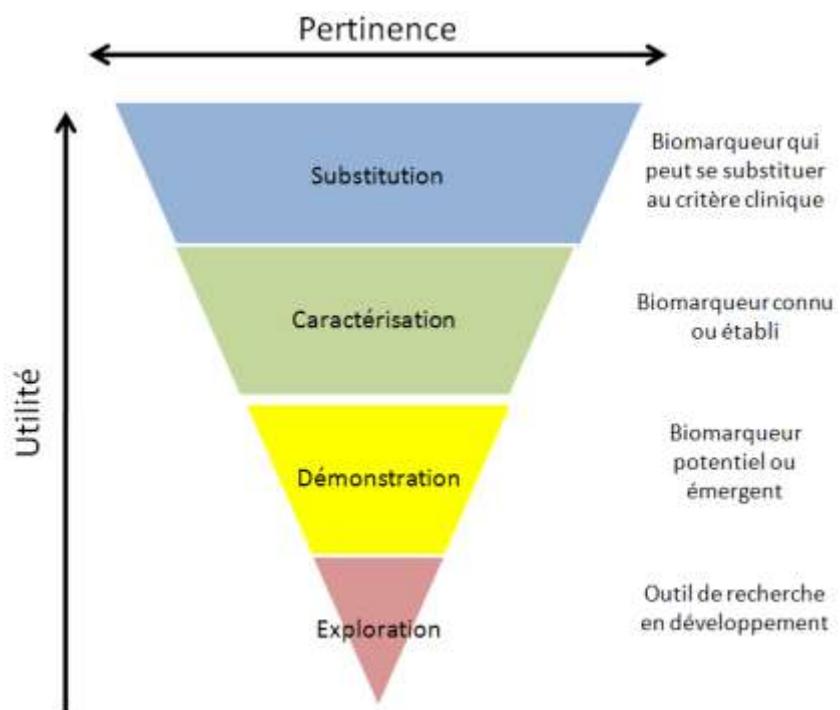


Figure 26 : Pyramide inversée de la qualification d'un biomarqueur montrant la relation croissante entre utilité et pertinence (à partir de (Wagner, 2007)).

La figure 49 montre qu'en fonction d'une qualification croissante, depuis la phase exploratoire jusqu'à la substitution au critère clinique, l'utilité du biomarqueur dans le processus de décision et sa pertinence s'accroissent conjointement. L'accréditation par les autorités réglementaires constitue le stade ultime de la pertinence d'un biomarqueur (Lesko et Atkinson Jr, 2001). Pour obtenir cette accréditation, la mise en place d'essais cliniques contrôlés permet d'évaluer l'effet de l'intervention thérapeutique sur le biomarqueur. Cette validation reste le moyen le plus convaincant du bénéfice lié au biomarqueur et permet ainsi d'évaluer le risque éventuel, associé à son utilisation (Lesko et Atkinson Jr, 2001). En fonction de la classe réglementaire du biomarqueur (classification liée au risque encouru par le patient), le niveau de validation du biomarqueur varie (Lee *et al.*, 2002).

Le risque d'adopter un critère de substitution à la place d'un critère clinique est souvent compensé par un accroissement de l'efficacité de la recherche clinique ou par un bénéfice clinique pour le patient (Lachenbruch *et al.*, 2004). En effet, le biomarqueur peut améliorer l'efficacité d'essais cliniques en réduisant le temps nécessaire pour aboutir à la conclusion. C'est le cas des essais cliniques où la survenue du critère clinique est rare. D'autre part, en réduisant le temps de l'essai clinique, celui-ci devient plus acceptable pour le patient. Dans certains cas, la réduction du temps de l'essai permet aussi d'améliorer la compliance (Lachenbruch *et al.*, 2004).

Nous proposons d'étudier le répertoire T dans le cadre de deux modèles cliniques, celui de la sclérose en plaques et celui de la transplantation rénale, grâce à la technologie TcLandscape. Il s'agit d'identifier des marqueurs biologiques liés, dans le cadre de la sclérose en plaques, à une évolution de la maladie. Dans le cadre de la transplantation rénale, le TcLandscape a trois objectifs :

- caractériser différents groupes de transplantés rénaux,
- prédire la survenue éventuelle du rejet de greffe,
- et prédire un état de tolérance.

2 Analyse longitudinale de patients atteints de sclérose en plaques par TcLandscape

2.1 La sclérose en plaques

La sclérose en plaques est une maladie chronique inflammatoire touchant le système nerveux central. Elle est caractérisée par une démyélinisation au niveau de la substance blanche du système nerveux central (McDonald *et al.*, 2001). C'est une maladie complexe, liée à différents processus pathologiques : inflammation, démyélinisation et mécanismes d'altération et de réparation axonales. De plus, ces processus ne sont pas uniformément représentés dans la population, et il en résulte une forte hétérogénéité phénotypique d'individus et une évolution clinique très différente d'un patient à l'autre (McDonald *et al.*, 2001). Les symptômes, causés par la défaillance de conduction nerveuse, correspondent, en général, à des pertes de fonctions motrices ou visuelles, mais aussi cognitives. La maladie est majoritairement divisée en deux grandes formes : la forme rémittente et la forme secondaire progressive (figure 50). La forme rémittente représente 85% des cas en début de maladie et ses symptômes alternent entre phase de poussée et phase de rémission. La forme secondaire progressive, présentée comme une évolution de la forme rémittente, est caractérisée par une aggravation irréversible des anomalies neurologiques corrélée avec une perte axonale généralisée diffuse et une diminution du parenchyme cérébral (Khoury *et al.*, 1994).

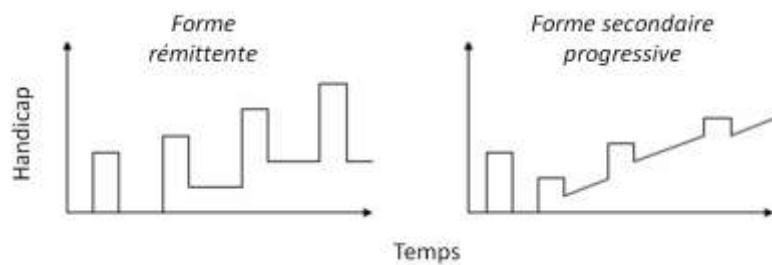


Figure 27 : Evolution schématique, au cours du temps, du handicap pour les deux formes de sclérose en plaques majeures.

Le diagnostic clinique est établi lorsque le patient présente des plaques, zones démyélinisées, détectées grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM), disséminées à différents endroits du système nerveux central (Polman *et al.*, 2005). Le suivi habituel des patients repose ensuite, sur un examen neurologique avec une cotation du handicap (score EDSS (Kurtzke, 1983)).

2.2 Les biomarqueurs et la sclérose en plaques

La recherche de biomarqueurs dans le domaine de la sclérose en plaques cible plusieurs objectifs : aider au diagnostic, caractériser les différentes formes de la maladie, permettre le développement de nouveaux traitements et prédire l'évolution de la maladie (Berger et Reindl, 2007). Concernant le diagnostic, la corrélation entre la présence de la maladie et un profil oligoclinal d'immunoglobulines au niveau du liquide céphalorachidien, détecté lors d'une ponction lombaire, est prometteuse (Freedman *et al.*, 2005). En ce qui concerne la caractérisation des différentes formes de la maladie, de nouveaux biomarqueurs mécanistiques issus des méthodes « génératrices d'hypothèses » (Littman *et al.*, 2007), comme par exemple l'établissement de profils génomiques (Comabella et Martin, 2007), transcriptomiques (Fossey *et al.*, 2007), protéomiques (Lehmensiek *et al.*, 2007) ou métabolomiques tentent de décrypter les grands processus pathologiques liés à la maladie (Bielekova et Martin, 2004). En terme d'évolution de la maladie, l'IRM permet aussi le suivi des patients ; elle peut aussi montrer l'impact des médicaments sur les lésions visibles en IRM (Bakshi *et al.*, 2005). Cependant, les corrélations sont faibles entre la charge lésionnelle visualisée par l'IRM et le handicap lié à la maladie (Filippi *et al.*, 1995) aboutissant à un paradoxe clinico-radiologique. Hormis des considérations techniques comme la non spécificité du signal émis en IRM (réflétant aussi bien la démyélinisation que la réparation tissulaire) ou la mauvaise appréciation du handicap par les échelles cliniques utilisées, une autre possibilité est que cette corrélation soit décalée dans le temps. Sur un suivi moyen de 13 ans, les travaux de Rudick *et al.* ont mis en évidence une relation entre l'accumulation précoce de lésions dans la sclérose en plaques et le handicap à long terme des patients (Rudick *et al.*, 2006). Ces résultats sont à mettre en perspective avec ceux obtenus par Brex *et al.* dans lesquels plus la charge lésionnelle est importante et plus le handicap est lourd 10 ans plus tard (Brex *et al.*, 2002). L'IRM paraît donc être un outil pertinent dans l'évolution à

long terme de la maladie ; mais il se révèle peu informatif à court et moyen terme. Le déroulement particulier de la maladie, avec l'alternance de phases de poussée et de rémission implique donc la recherche de biomarqueurs pronostiques permettant, en association avec les données cliniques et celle de l'IRM, de prédire l'évolution de la maladie.

2.3 Les lymphocytes T et la sclérose en plaques

L'implication du système immunitaire dans la sclérose en plaques présente de multiples facettes et ses mécanismes sous-jacents ne sont pas encore tous connus. La sclérose en plaques est considérée comme une maladie auto-immune, dans laquelle les lymphocytes T semblent jouer un rôle crucial (Waksman et Reynolds, 1984). Les techniques d'analyse du répertoire T ont permis de mettre en évidence, chez les patients atteints de sclérose en plaques, des expansions clonales de lymphocytes T dans le liquide céphalorachidien (Hafler *et al.*, 1988) ; ainsi que des réarrangements limités de la chaîne α du TCR au niveau du système nerveux central (Oksenberg *et al.*, 1990). Majoritairement, des biais d'usage du répertoire $V\beta$ sont détectés dans le sang de ces patients (Utz *et al.*, 1993) (Laplaud *et al.*, 2004). Ces expansions clonales corrèlent avec les réponses contre la protéine basique de la myéline, la MBP (Matsumoto *et al.*, 2003). De plus, une étude du répertoire T dans le liquide céphalorachidien d'un patient a montré que les altérations du répertoire sont augmentées pendant une poussée (Muraro *et al.*, 2006). Certaines études ont décrit, chez des patients porteurs de l'allèle CMH-DR2, des expansions clonales au niveau de familles $V\beta$ particulières : comme la famille $V\beta 5.2$ (Matsumoto *et al.*, 2003), le gène $V\beta 13$ (Demoulin *et al.*, 2003) ou le gène $V\beta 5.3$ (Musette *et al.*, 1996). D'après les travaux récents de Junker *et al.*, l'examen de 800 séquences de clones réactifs, présents dans des lésions situées dans différentes régions anatomiques, et où aucun des clones n'était commun entre les patients, a suggéré uniquement des réponses privées (Junker *et al.*, 2007). Ces résultats sont cohérents avec l'étude de Laplaud *et al.* (Laplaud *et al.*, 2004) où les altérations du répertoire touchent un grand nombre de familles $V\beta$, différent selon les individus, et ne permettant pas d'incriminer une famille $V\beta$ particulière dans la pathologie. Dans cette étude, les lymphocytes T qui expriment à leur surface les TCR $V\beta$ appartenant aux familles $V\beta$ altérées, se sont révélés auto-réactifs, répondant à une stimulation par la MBP et produisant de l'IFN γ . A partir de ces observations, il s'est donc avéré intéressant de déterminer si les

altérations du répertoire T dans le sang des patients atteints de sclérose en plaques pouvaient être liées à l'activité de la maladie mesurée par l'IRM.

2.4 Analyse longitudinale de patients atteints de sclérose en plaques

Serial evolution of TCRBV chain transcript mobilisation in multiple sclerosis patients and correlation with clinical and MRI parameters. Journal of Neurolimmunology +

Miqueu P*, Laplaud DA*, Berthelot L*, Bourcier K, Moynard J, Oudinet Y, Guillet M, Ruiz C, Oden N, Brouard S, Guttmann CR, Weiner HL, Khouri SJ, Souillou JP.

Publié dans Journal of Neuroimmunology (2006) 177(1-2):151-60.

* Les auteurs ont contribué de manière égale à ce travail.

+ Etude seriée des altérations du répertoire T dans le sang de patients atteints de sclérose en plaques et corrélations avec les paramètres cliniques et données issues de l'IRM.

Serial blood T cell repertoire alterations in multiple sclerosis patients; correlation with clinical and MRI parameters[☆]

David-Axel Laplaud ^{a,1}, Laureline Berthelot ^{a,1}, Patrick Miqueu ^{a,b,1}, Kasia Bourcier ^c,
Julien Moynard ^a, Yannick Oudinet ^a, Marina Guillet ^{a,b}, Catherine Ruiz ^b, Neal Oden ^d,
Sophie Brouard ^a, Charles R.G. Guttmann ^c, Howard L. Weiner ^c,
Samia J. Khoury ^{c,2}, Jean-Paul Soulillou ^{a,*,2}

^a Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (Inserm) Unité 643: "Immuno-intervention dans les allo- et Xénotransplantations", Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation (ITERT) CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex, France

^b TeLand SA, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex, France

^c Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

^d The EMMES Corporation, 401 N. Washington St., Suite 700, Rockville, MD 20850, USA

Received 3 January 2006; received in revised form 14 April 2006; accepted 2 May 2006

Abstract

A significant skewing of the peripheral T cell repertoire has been shown in relapsing-remitting multiple sclerosis (MS). Most of the studies already performed in this field are cross-sectional and therefore, little is known of the T cell repertoire evolution over time in MS and the correlation of T cell repertoire variation with clinical and MRI parameters. This study was performed on serially harvested frozen PBMC from nine untreated MS patients (27 samples) and 14 healthy individuals. The blood T cell repertoire of each patient was analysed at the complementarity determining region 3 (CDR3) level and compared with a monthly MRI scan performed over a six month period with assessment of T2 lesion load and gadolinium enhancing lesions. A highly significant blood T cell repertoire skewing was observed in MS patients as compared with healthy controls ($p<0.01$). In addition, the number of altered V β families correlated significantly with both the T2 lesion volume and the number of gadolinium enhancing lesions as assessed by MRI (Spearman correlation tests, $r=0.51$ and $r=0.44$, $p<0.01$ and $p<0.05$ respectively). Furthermore, the variation of the number of altered V β families over time also correlated with the appearance of new gadolinium enhancing lesions ($r=0.36$, $p=0.05$). These findings which need confirmation on larger serial cohorts, suggest an association between the magnitude of TCRBV CDR3 length distribution alterations in the peripheral blood of MS patients and the disease process.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Multiple sclerosis; T cell repertoire; V beta genes; CDR3; Spectratyping; Immunoscope; MRI

Abbreviations: BBB, Blood Brain Barrier; CDR3, Complementarity Determining Region 3; CNS, Central Nervous System; EDSS, Expanded Disability Status Scale; HPRT, Hypoxanthine-Phosphoryl-Ribosyl-Transferase; HI, Healthy Individuals; LD, Length Distribution; MBP, Myelin Basic Protein; MS, Multiple Sclerosis; PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells; RR, Relapsing–Rermitting; SP, Secondary-progressive; TCR, T Cell Receptor.

[☆] This research was performed as a project of the Immune Tolerance Network (#TOOA563254), a collaborative clinical research project headquartered at the University of California San Francisco and supported by the national institute of Allergy and Infectious Diseases, the National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, the Juvenile Diabetes Research Foundation and the French association for multiple sclerosis research (ARSEP).

* Corresponding author. INSERM U643, 30 Bd Jean-Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France. Tel.: +33 2 40 08 74 10; fax: +33 2 40 08 74 11.

E-mail address: jean-paul.soulillou@univ-nantes.fr (J.-P. Soulillou).

¹ These authors contributed equally.

² Both are senior authors.

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a central nervous system (CNS) disease associated with auto-immunity against myelin determinants (Noseworthy et al., 2000; Zamvil et al., 1985). A large body of evidence indicates that myelin reactive T cells are implicated at least in the early phase of the disease process, such cells being predominant in the active MS plaques (Booss et al., 1983). Recently, a humanized antibody directed against the T cell molecule VLA4 has shown its ability to reduce the formation of new gadolinium enhancing lesions in the CNS of MS patients, suggesting that activated autoreactive blood T cells cross the blood brain barrier (BBB) and contribute to MS lesions (Polman et al., 2006)(Miller et al., 2003). Investigations into the selective T cell repertoire of MS patients have shown preferential usage of certain selected V β families, with different individual-specific (private) TCR repertoire restrictions (Gran et al., 1998; Laplaud et al., 2004; Lozeron et al., 1998; Matsumoto et al., 2003; Muraro et al., 2002; Musette et al., 1996). Analysis of the entire T cell repertoire has also shown a significant global alteration at the very onset of the disease (Laplaud et al., 2004). However, the precise location where these T cells undergo selection, whether it be in the periphery or in the CNS itself, is still controversial (see (Prat and Antel, 2005) for review) as is the issue of cell migration fluxes from the blood to the CNS (and vice versa) (de Vos et al., 2002; Melchior et al., 2005). T cell clones with similar TCRBV chain hypervariable regions, as assessed by the complementarity determining region 3 (CDR3) length or sequence, have been observed in the blood as well as in the CNS of MS patients (Babbe et al., 2000). We have also shown that most of the T cells from the blood TCR V β families presenting an altered CDR3 length distribution pattern are in fact CD8 cells (Laplaud et al., 2004). CD8+ cells expressing adhesion molecules such as P-selectin ligand have been shown to efficiently cross the BBB (Battistini et al., 2003). In addition, we have shown that a high frequency of sorted T cells belonging to V β families with strongly biased TCR usage are MBP-reactive (6000/10 6) when tested in vitro (Laplaud et al., 2004).

In this study, we collected serial blood samples from MS patients and longitudinally studied TCR repertoire skewing at the V β CDR3 length distribution (LD) level on a patient by patient basis. We confirm and extend previous observations that MS patients' exhibit altered blood CDR3-LD compared to normal individuals. Moreover, we observed a significant positive correlation between T2 lesion volume, the number of gadolinium enhancing lesions as assessed by MRI, and the proportion of altered V β families in MS samples. Furthermore, a correlation between appearance of new gadolinium enhancing lesions with time and newly altered V β families was also observed. These data, which need confirmation by larger prospective studies, suggest that blood T cell repertoire analysis could be used as an additional non invasive method for disease follow-up in MS.

2. Patients and methods

2.1. Patients and study design

2.1.1. Patients

Nine MS patients were included in this longitudinal study between October 1994 and April 1995; 6 patients with Relapsing–Remitting (RR) MS and 3 patients with Secondary Progressive (SP) MS. All were followed at the MS Center of the Brigham and Women's Hospital in Boston, and were selected from the placebo arm of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II trial of linomide in the treatment of MS. All gave their informed consent before participating in this study, which was approved by the local IRB. None of the patients were on treatment with interferon, steroids or other immunosuppressive drugs for at least 3 months prior to entering the study. All were clinically examined by a neurologist at baseline, 12, 24, 36 and 48 weeks (Table 1).

2.1.2. Healthy controls

Blood from 14 healthy individuals, under the age of 35 years at the time of sampling, for whom PBMC were stored in liquid nitrogen tank since 1996, corresponding to a same time period of freezing than MS patients, were used. For three other healthy individuals, blood was drawn every month for 3 months, to determine the variations in CDR3-LD alterations (landscape Topview, see below) with time in a healthy population (see Supplementary Figure 1). All HI gave their informed consent to this study according to the local IRB.

2.2. Blood sampling and processing

2.2.1. PBMC preparation and freezing

Blood from MS patients was drawn at baseline and then every 4 weeks until week 48. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were subsequently isolated by Ficoll-Hypaque (Pharmacia) density gradient centrifugation and re-suspended at 2.10 6 /ml in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 4 mM L-glutamine, 25 mM Hepes buffer, 50 units/ml penicillin, and 50 mg/ml streptomycin (all from BioWhittaker, Walkersville, MD). After washing, the medium was discarded and 10 10 6 cells were re-suspended in 1 ml of Flash Freeze Buffer containing 10% DMSO and 90% heat inactivated fetal bovine serum before being frozen in liquid nitrogen. Frozen cells from healthy controls were obtained using the same process at a concentration of 10 10 6 per tube.

2.2.2. RNA extraction and cDNA synthesis

PBMC were thawed and washed in PBS. The cells were then resuspended in Trizol® reagent for RNA extraction according to the manufacturer's instructions. The concentration and quality of RNA for each sample was accurately determined using nanoRNA Chips (Agilent®, United

Table 1
Clinical characteristics of the patients at the time of inclusion

Patient number	Gender	Disease type	Age (year)	Disease duration	Date of bleeding	Lesion volume	Gd ⁺ ve lesions	New Gd ⁺ ve lesions	EDSS
704	M	RR	27		M0	3.1799	0	0	—
					M1	2.8055	0	0	—
					M2	3.3302	0	0	0
					M4	3.9973	0	0	—
					M6	4.0135	0	0	2,5
									3
820	F	RR	45	3	M0	10.4098	1	—	—
					M1	10.9371	3	2	—
					M2	10.7552	1	0,5	—
					M3	11.3906	1,5	1	3,5
					M4	11.3036	1,5	1	—
					M5	10.8158	0	0	—
818	F	RR	31	4	M0	6.4178	4	—	—
					M1	5.6426	1	1	—
					M2	6.5733	5	5	—
					M3	7.5384	5	3	—
					M4	6.1277	2	2	—
					M6	6.2701	0	0	—
808	F	RR	51	6	M0	8.7275	3,5	0,5	—
813	F	RR	42	2	M0	6.2965	0	0	1,5
812	F	RR	37		M1	0.9255	0	0	2
					M6	2.2755	0	0	2
507	M	SP	45	8	M0	9.3973	2	0,5	—
					M1	9.3683	2	2	—
611	F	SP	38		M0	14.4466	0	0	6
617	F	SP	39	12	M0	5.0625	0	0	3
					M2	4.6644	0	0	—
					M5	4.8727	0	0	3

Kingdom). According to these criteria, only 27 of the 65 frozen samples studied, were of good enough quality and were retained for analysis (corresponding to nine MS patients; six RR-MS and three SP-MS patients), the remaining samples showing some RNA degradation, likely due to the long freezing time, were thus discarded. None of the samples from HI showed RNA degradation. Next, 2 µg of RNA were reverse transcribed using an Invitrogen cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) and diluted to a final volume of 100 µl.

2.2.3. TCR repertoire analysis

cDNA was amplified by PCR using a C β primer and one of the 26 V β specific primers. The amplifications were performed in a 9600 Perkin-Elmer thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) as previously described (Gagné et al., 2000). Analysis of CDR3-LD was first performed using Immunoscope® software (Brouard et al., 1999; Douillard et al., 1996; Pannetier et al., 1995). The percentage of CDR3-LD alteration for each V β family and the global percentage of CDR3-LD alteration for each individual or each group was calculated as described (Gorochov et al., 1998). Briefly, the percentage of alteration was defined as the difference between the frequency of each CDR3 length in the distribution profile of the V β family studied and the average control distribution, calculated from 14 healthy individuals. Global CDR3-LD alterations were represented as an alteration “topview” landscape (see below) enabling an easy visual appraisal of the CDR3-LD biases.

Topview of Immunoscope alteration landscape will be referred to as “landscape topview” in the rest of the text. In this representation percentages of CDR3-LD alterations are represented as a colour code, from deep blue ($\leq -30\%$) to dark red ($\geq +30\%$). The X axis displays the 26 human V β families and the Y axis gives the CDR3 lengths. Missing data were represented as dark blue lines.

To evaluate changes in CDR3 distributions between two time points of a given patient, two by two comparisons were made of the distributions of all the V β families present. Briefly, comparison of two distributions makes it possible to quantify the amount of dissimilarity between the two distributions: a Minkowski distance of order one. Thus, a global distance between two time points could be calculated by summing the differences identified between the CDR3 distributions of all V β families present. A large “distance” means that the distributions greatly change from one time point to the next; a small distance means that the distributions do not really change during that time interval. These variations in the CDR3 length distributions were then compared to the variation of a gadolinium score G_i in the same time period (see below).

2.2.4. Assessment of altered V β families

To identify V β families presenting clonal expansions, we applied the following statistical method (Gorochov et al., 1998; Han et al., 1999). Briefly, a V β family was considered as having an altered distribution when it significantly differed from the mean distribution calculated from the 14

healthy controls. For a given V β family, a percentage of alteration exceeding the mean percentage of alteration in the control group for the same V β family by two standard deviations was considered as significant. Because CDR3-LD were missing in some samples, the proportion of altered V β families was used for statistical comparisons.

2.2.5. MR imaging and image evaluation

MRI scans were carried out for each patient at baseline, then every 4 weeks for 6 months. Imaging was performed on a General Electric Sigma 1.5-T unit (General Electric, Milwaukee, WI). Proton-density and T2-weighted images were obtained on the whole brain by contiguous 3 mm thick slices with an in-plane voxel size of 0.94 mm \times 0.94 mm (24 cm field of view with a 256 \times 192 acquisition matrix). Images were also obtained by applying a T1-weighted spin-echo pulse sequence after administration of an i.v. bolus of 10 ml of 0.5 M gadopentate dimeglumine (Gd-DTPA)

(Magnevist, Berlex). Post contrast T1-weighted (Gd+) images in the axial plane resulted from a 600/19/1 (repetition time/echo time/excitations) spin-echo sequence. Slice thickness was 4 mm with 1 mm gap. Proton density- and T2-weighted images were analysed using an automated computerized procedure allowing for a reproducible method of lesional volume assessment. Gd-enhanced T1-weighted images were evaluated by two radiologists for each patient data set. The total number of enhancing lesions and the number of new enhancing lesions at each time point were determined independently by each rater and the average number was used in the analysis.

The following 3 parameters were measured: total number of enhancing lesions, number of new enhancing lesions and total volume of T2 lesions.

The variation of gadolinium positive lesions with time was also assessed by a dedicated score, G_i . This score depends on the appearance, the persistence and the loss of

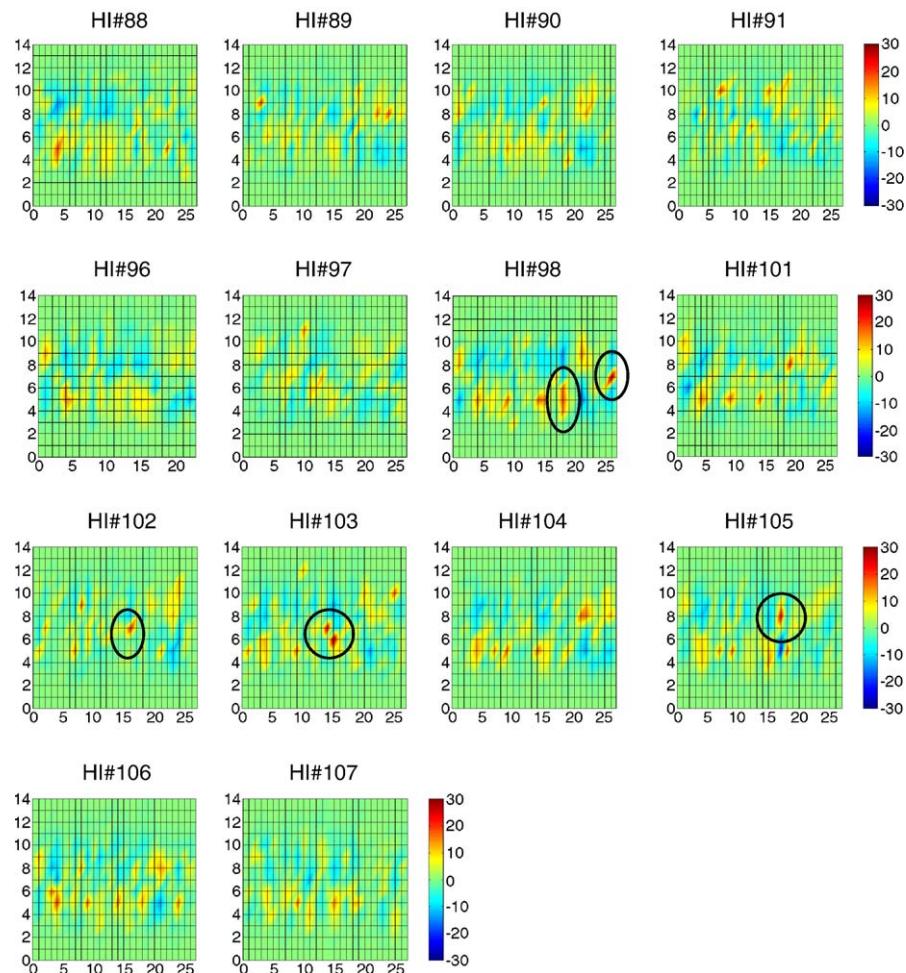


Fig. 1. Landscape Topviews of healthy individuals (HI) for whom PBMC had been frozen for a similar time period as those from MS patients. The X axis displays the V β families from V β 1 to V β 24. The Y axis displays the CDR3 length in amino-acid number for each V β family. The colour code represents the TCR skewing for each V β family from a deep blue (-30% of alteration) to a dark red ($+30\%$ of alteration). The circles indicate the altered V β families, as defined by a percentage of alteration exceeding two standard deviation from the mean calculated with the same V β family in the Healthy control group. Note that some V β families from other healthy individuals seemed to be skewed, appearing as spots on the landscape Topviews (for instance, V β 15, HI#101) but did not reach statistical significance.

gadolinium positive lesions and, thus, is related to lesion activity. Special weighting was attributed for each of these 3 events. The evolution of a patient's status between t_i and t_{i+1} could be summarized as follows by the gadolinium positive lesions score, $G_{i, i+1}$:

$$G_{i, i+1} = a*(N_{i+1}) + p*(S_{i+1}-N_{i+1}) + d*(S_i + N_{i+1}-S_{i+1})$$

Where:

- a is the weight of a lesion appearance;
- p is the weight of a persistent lesion;
- d is the weight of a lesion loss;

S_i is the total number of lesions at t_i ;
 S_{i+1} is the total number of lesions at t_{i+1} ;
 N_{i+1} is the number of new lesions at t_{i+1} .

The basic way of scoring these 3 kinds of event leads to the score “+1” for the appearance or persistence of a lesion and “−1” for the loss of a lesion.

We then compared the evolution of the total volume of T2 lesions and the gadolinium positive lesion score. Evolution of the total volume of T2 lesions between t_i and t_{i+n} was calculated by the difference between the lesion volume at t_{i+n} and at t_i . A linear relationship ($r^2=0.75$) was found between the evolution of the lesion

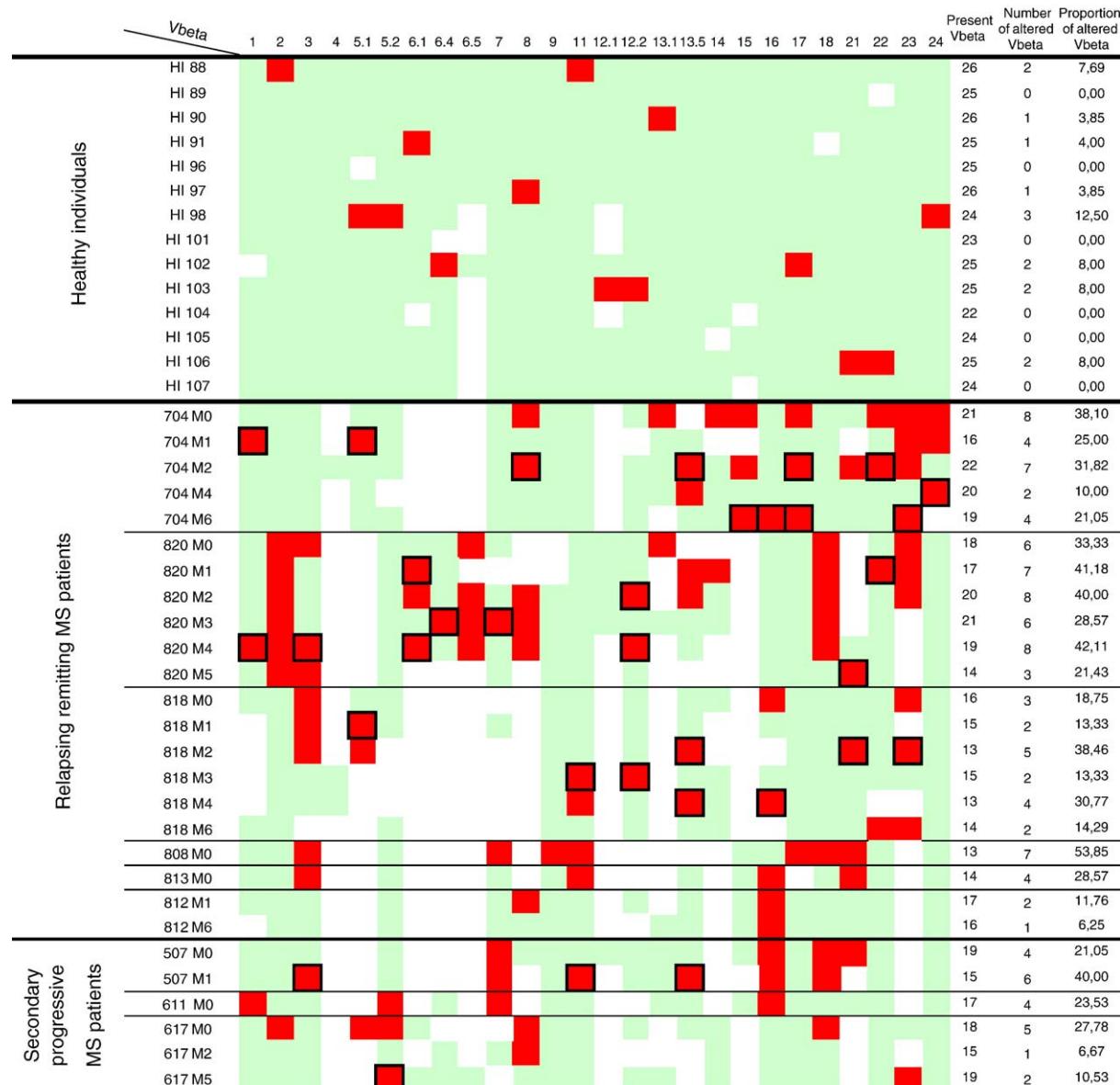


Fig. 2. CDR3 length alterations for all of the multiple sclerosis patients and healthy individuals. A green square indicates a global Gaussian distribution of the expressed V β family. A red square indicates an altered V β family (percentage of alteration exceeding the mean by two standard deviations). A surrounded red square indicates the appearance of a new altered V β family as compared to the preceding sample. A white square corresponds to missing data for the V β family.

volume and the gadolinium positive lesion score. The correlation between these two variables was significant at $p<0.01$ (non-parametric Spearman $\rho=0.884$) and bringing confidence on the relevance of the clinical parameters tested.

2.2.6. Statistical procedures

For all usual statistical tests the SPSS v 14.0 and PRISM software were used and a $p<0.05$ was considered significant. A Mann-Whitney test was used to compare the global percentage of CDR3-LD alteration, to compare each V β family and to compare the proportion of altered V β families in each patient group with the controls. For patients followed over time, the average of the percentage of alteration of each V β family was used. Next, six samples from the six RR-MS patients were compared to three samples from three SP-MS patients.

In order to explore the relationship between altered V β families and lesion activity, we correlated the number of gadolinium enhancing lesions and the T2 lesion load for each time point with the proportion of altered V β families at the same time point. To correlate the variation of gadolinium enhancing lesions with the variation of altered V β families, we compared the apparition of new gadolinium enhancing lesions and new altered V β families at each time point. The correlation between the T2 lesion load, the number of gadolinium enhancing lesions and the amount of altered V β families was calculated using a non-parametric Spearman correlation test, as well as correlation between the variation of the number of altered V β families between two time points and the appearance of new gadolinium enhancing lesions.

3. Results

3.1. CDR3 length distribution in normal individuals

First, 14 Healthy individuals (HI) whose PBMC had been frozen for a period of time similar to that of the MS samples (8 years) were used as controls to investigate the normal range of the level of CDR3 length distribution (CDR3-LD) alterations. The global percentage of CDR3-LD alteration in frozen samples was measured of $12.9\% \pm 5.7\%$ (ranging from 10.2 to 16%). Nevertheless, clonal expansions (corresponding to altered V β families) in PBMC, even following long-term freezing remained rare. Fig. 1 shows the 14 V β families with altered patterns of CDR3-LD on the landscape Topview display. V β families other than those outlined in Fig. 1 (for example V β 15, HI#101) display a borderline colour code but their percentage of alteration did not reach statistical significance (two standard deviations above the mean percentage of alteration in the control group, see Patients and methods). Collectively, eight of the 14 normal individuals tested displayed at least one V β family with clonal expansion. These results were summarized in Fig. 2.

3.2. MS patients exhibited higher global percentages of blood T cell CDR3-LD alterations than normal controls

We then compared the level of CDR3-LD alterations in samples from MS and healthy individuals that had been frozen for the same length of time. Several V β families were not investigated in all the MS samples because the signal was too weak (white bands for corresponding V β families in Fig. 2). The global percentage of CDR3-LD alterations in MS patients and normal individual controls was significantly different with a percentage of alteration of $19.7\% \pm 4.04\%$ (ranging from 14% to 24.7% in MS patients) as compared to $12.9\% \pm 5.7\%$ in controls ($p<0.001$, Mann-Whitney test, Fig. 3a).

CDR3-LD alterations in MS blood T cells preferentially affected certain V β families, as shown by the side by side comparison of each V β family from MS patients and normal individuals. Significant skewing involved several V β families: V β 5.2, 8, 12.2, 16 and V β 21 ($p<0.05$, Mann-Whitney test). A comparison of the proportion of altered V β families, shown as a red spot on the landscape Topview, revealed significantly higher proportion of altered V β families in the MS group than in the controls, with a mean proportion of altered V β families of 25.3%

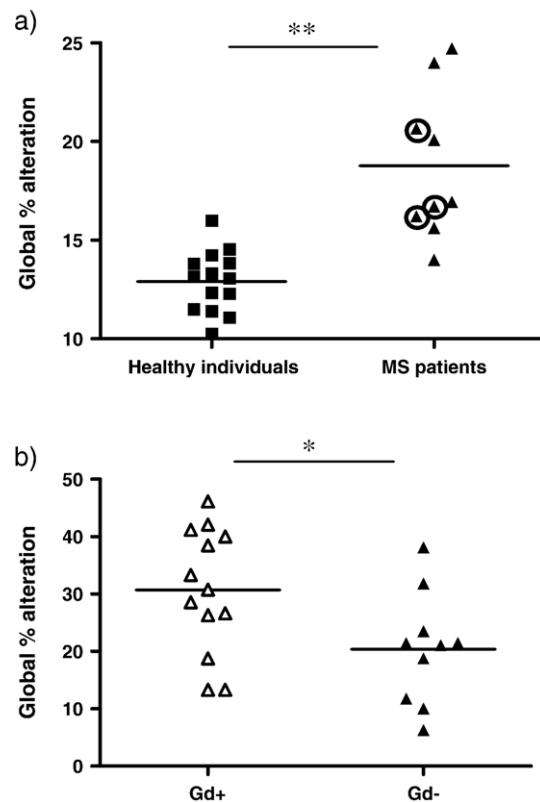


Fig. 3. a) Global percentage of alteration in RR-MS, SP-MS and healthy individuals. b) Global percentage of alteration in patients with gadolinium enhancing lesions according to MRI versus patients without gadolinium enhancing lesions. Mann-Whitney tests. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

in MS patients and 3.9% in healthy individuals (Mann-Whitney test, $p<0.001$). As shown in Fig. 2, all patients displayed at least one altered V β family, as compared with only eight among the 14 healthy individuals.

Taken collectively, these data confirm a significant skewing of blood T cell repertoire diversity in MS patients.

CDR3-LD was then analysed in the different clinical groups of MS patients. The global percentage of CDR3-LD alterations was compared in relapsing-remitting versus secondary progressive MS patients. The global percentage of CDR3-LD alteration was $20.6\pm 10.3\%$ (ranging from 14 to 24.7%) in RR-MS patients and $18.1\pm 7\%$ (ranging from 16.7 to 20.8%) in SP-MS patients (Mann-Whitney test, NS). Furthermore, even when considered independently, RR-MS as well as SP-MS patients were significantly more altered than the controls ($p<0.01$).

3.3. Serial analysis of TCR alterations in MS patients

In MS patients the presence of altered V β families was roughly stable over time in a given patient but differed from one patient to another. During the follow-up, some “red spots” corresponding to V β family transcripts with strong CDR3-LD alterations appeared and/or disappeared, as shown in the example given in Fig. 4 (patient 820) and summarized in Fig. 2 and in Supplementary figure 2. As shown in the example concerning patient 820, the V β 2 family exhibited a strong CD3-LD alteration and this spot was roughly stable over time. Nevertheless, other V β families exhibited significant CDR3-LD alterations appearing over the follow-up period and summarized in Fig. 2. As in the example shown in Fig. 4, V β 18 appeared significantly altered at M4 but not at M5 (Supplementary figure 3).

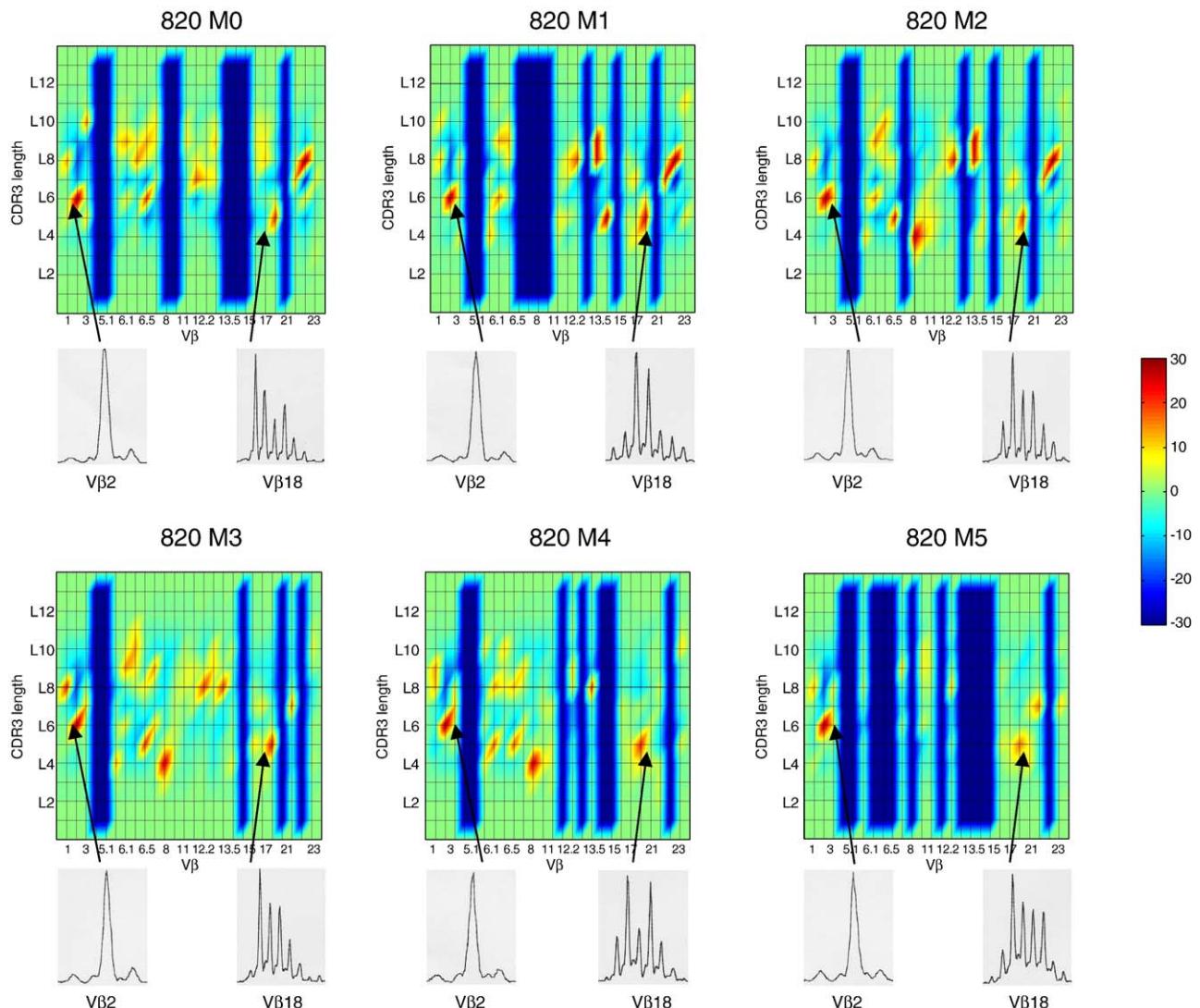


Fig. 4. A significant example of landscape Topviews from patient 820 and their variations with time. Arrows indicate an example of persisting altered V β families throughout the follow-up period. The Immunoscope profiles of the persisting altered families and of appearing/disappearing altered V β families are shown (V β 18).

3.4. Correlation of CDR3-LD alterations with MRI parameters

First, we compared the level of CDR3-LD alterations in patients with and without gadolinium enhancing lesions on their MRI and found a significant difference between the two patient groups ($30.6\% \pm 10.8$ and $20.4\% \pm 9.6\%$ respectively, Mann-Whitney test, $p < 0.05$, Fig. 3b). In addition, the proportion of altered V β families in each group of patients reached significant difference (9% versus 19%, Mann-Whitney test, $p < 0.01$). Furthermore, a significant correlation was observed between the proportion of altered V β families and the T2 lesion load (Spearman correlation test, $r = 0.51$, $p < 0.01$, Fig. 5a) and the number of gadolinium enhancing lesions ($r = 0.44$, $p < 0.05$, Fig. 5b).

3.5. Longitudinal analysis of variations in CDR3-LD alterations and lesion activity

Despite the relatively low number of patients, a significant correlation was also observed between the variation of gadolinium enhancing lesions with time and the appearance of new altered V β families (Spearman correlation test, $r = 0.36$, $p = 0.05$). The correlation was stronger when only patients 818 and 820 were considered, for whom sufficient data was available and gadolinium positive lesions were present ($r = 0.74$, $p < 0.01$, Fig. 5c).

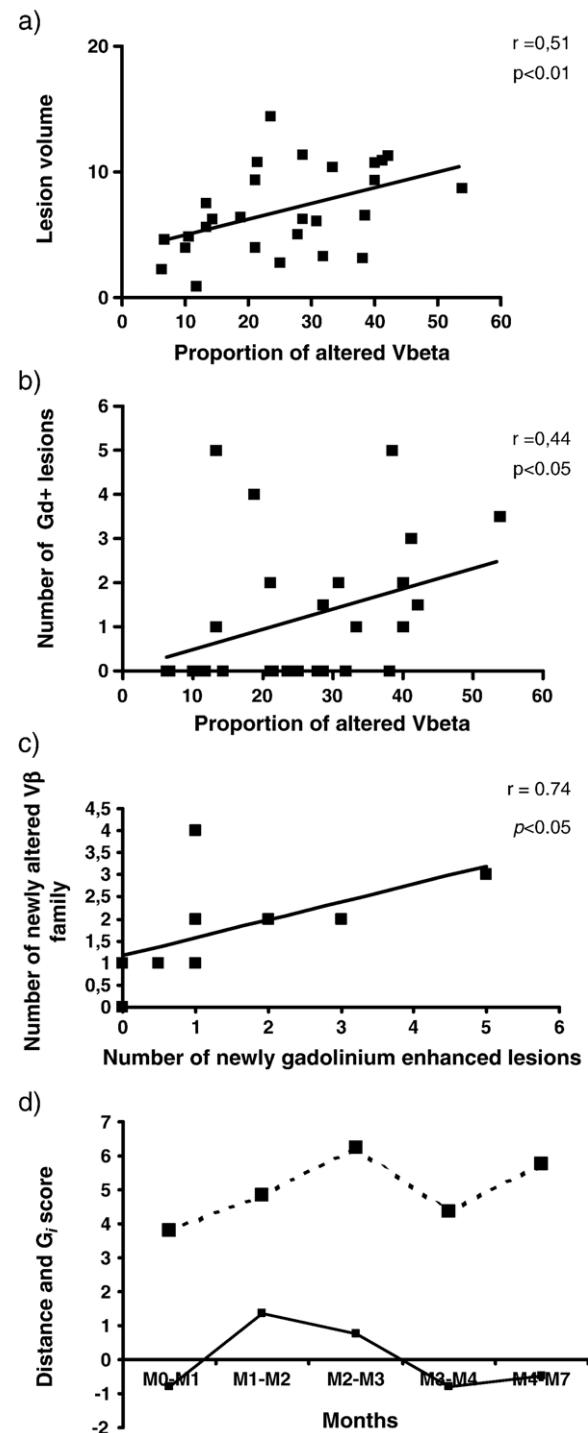
In addition, we compared the “amount” of T cell repertoire diversity changes that occurred at each time interval (by comparing the variation of the percentage of alteration for each V β family present between two samples, see Patients and methods) with the evolution of the gadolinium score G_i for patients 818 and 820. As shown in Fig. 5d, for patient 818, the level of CDR3 length distribution changes roughly paralleled the evolution of the G_i score.

Altogether, these data suggest an association between the lesion activity seen on the MRI and newly altered V β families in the blood of MS patients.

Fig. 5. Correlation of MRI parameters with altered V β families. a) Correlation between the T2 lesion load and the proportion of altered V β families (Spearman correlation test, $r = 0.51$, $p < 0.01$). The X axis indicates the T2 lesion volume assessed by MRI and the Y axis indicates the proportion of altered V β families. b) Correlation between the number of gadolinium enhancing lesions and the proportion of altered V β families ($r = 0.44$, $p < 0.05$). The X axis indicates the number of gadolinium enhancing lesions and the Y axis indicates the proportion of altered V β families. c) Correlation between the newly appearing altered V β families with time and the newly gadolinium enhancing lesions in patients 818 and 820 ($r = 0.74$, $p < 0.01$). d) Correlation with time between gadolinium score G_i and the variation of alterations assessed by a designated distance (see Patients and methods) in patient 818. The X axis indicates time (months) and the Y axis indicates G_i score and variation of distances. The dotted line indicates the variation in G_i score with time for patient 818. The black line indicates the variation of distances with time (see Patients and methods) for patient 818.

4. Discussion

Multiple sclerosis is thought to be an autoimmune T cell driven disease. In this study we serially analysed and monitored the TCR repertoire in the blood of MS patients with different disease types using an analysis of CDR3-LD alteration. In addition, we tested the hypothesis of possible correlations between TCR biases and clinical parameters in patients who had monthly MRI scans during their follow-up.



The fact that all of the patients in this cohort belonged to the placebo arm of an interrupted therapeutic trial rendered the biological study of this cohort even more informative since this enabled us to analyse patients in the absence of disease modifying therapies. Finally, the MRI data available for each patient at the time of each blood harvesting made it possible for us to perform correlations between the T cell repertoire biases and the different clinical parameters. Only samples giving high quality mRNA (as assessed by Agilent technology) were analysed.

Using appropriate controls (PBMCs from healthy volunteers stored for a same time period than those from MS patients), we confirm and extend the findings of our previous study of the TCR V β chain repertoire in fresh blood of MS patients (Laplaud et al., 2004). Although oligoclonal expansions of CD8 T cells have been shown to occur with age, the fact that the patients and healthy individuals were relatively young means that it is unlikely that the skewing observed in our group of patients was due to age (see (Effros et al., 2003) for review). The TCR skewing observed in our study involved several V β families, including V β 5.2 that has been extensively studied in other works. V β 5.2 family has been reported to be frequently used by MBP-specific clones from HLA-DR2 MS patients (Kotzin et al., 1991). We also found other V β families with significant skewing such as V β 12 that was also reported to be used by MBP specific cells (Hong et al., 1999; Wucherpfennig et al., 1990). Finally, V β 8 and V β 21 families, significantly altered in the MS group were also mentioned biased by other authors (Matsumoto et al., 2003).

We first studied the stability of TCR alteration over time in three healthy individuals over a period of 3 months. The TCR profiles showed some V β families with altered CDR3-LD which are reproducibly found over time (data not shown, see Supplementary file 1). Such private alterations have already been reported in healthy individuals and might correspond to the T cell response occurring during different virus infections such as influenza, CMV or EBV viruses (Bitmansour et al., 2001; Maini et al., 2000; Prevost-Blondel et al., 1997). The presence of persisting peripheral blood TCR CDR3-LD alterations are likely linked to the “immunological history” of each normal individual. It is likely that these patterns are also superimposed in MS patients.

The stability of the TCR alterations over time in MS has been only investigated in a small number of patients (Matsumoto et al., 2003; Muraro et al., 2002). In the latter studies, the global percentage of CDR3-LD alteration was roughly stable over time in a given patient. However, although some V β family alteration patterns remained stable throughout the follow-up, we also observed time-related variations, suggesting, as shown by Muraro et al. (2002), that some epitope spreading can also occur in the periphery.

The clinical significance of blood TCR skewing has been rarely investigated before in MS patients. In our previous study of TCR alterations, we showed that the T cells responsible for the skewing were mainly CD8 cells producing

Th1 cytokines, and importantly, that some of these cells produced IFN γ when stimulated with human MBP (Laplaud et al., 2004). TCR skewing has also been correlated to clinical symptoms in other diseases, such as AIDS (Gorochov et al., 1998), melanoma (Degauque et al., 2004) or in renal allograft recipients (Brouard et al., 2005; Degauque et al., 2004). Moreover, in this study, we found a positive correlation between the change in blood TCR biases (assessed by the variation of distances and by the apparition of newly altered V β families) and lesion activity, especially for two patients. This correlation, which was assessed either by the new appearing gadolinium positive lesions or by a G_i score taking into account the new gadolinium positive lesions, the persisting gadolinium positive lesions and the disappearance of gadolinium positive lesions, may be of potential relevance for the clinical management of MS. More importantly, a positive correlation was also detected between the TCR biases and the number of gadolinium positive lesions, suggesting that the level of TCR biases may be a marker of disease activity. These results are in accordance with those of Muraro et al. who also reported a positive correlation between lesion activity as assessed by MRI and the level of skewing of blood TCR repertoire based on V β gene expansions. However, the alteration of the V β families were not systematically tested in their work. Even though we found correlations between lesion activity/T2 lesion load and TCR biases by two different methods, our observations are based on a small cohort of patients with serial analysis, and should be interpreted with caution. Taken together, these data suggest a direct involvement of the T cells from altered V β families in the pathophysiological process. This work provides new insight into the clinical significance of the potential role of altered peripheral blood T cell repertoire in MS and suggests that the exhaustive study of V β transcriptome alteration may be of some value in the management of MS.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from the International Tolerance Network (to C.R.) and the Association pour la Recherche sur la Sclerose en Plaques (to D.A.L.). We thank Dr. Joanna Ashton-Chess for manuscript editing.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jneuroim.2006.05.006.

References

- Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Fries, M., Schroder, R., Deckert, M., Schmidt, S., Ravid, R., Rajewsky, K., 2000. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. J. Exp. Med. 192, 393–404.

- Battistini, L., Piccio, L., Rossi, B., Bach, S., Galgani, S., Gasperini, C., Ottoboni, L., Ciabini, D., Caramia, M.D., Bernardi, G., Laudanna, C., Scarpini, E., McEver, R.P., Butcher, E.C., Borsellino, G., Constantin, G., 2003. CD8+T cells from patients with acute multiple sclerosis display selective increase of adhesiveness in brain venules: a critical role for P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 101, 4775–4782.
- Bitmansour, A.D., Waldrop, S.L., Pitcher, C.J., Khatamzas, E., Kern, F., Maino, V.C., Picker, L.J., 2001. Clonotypic structure of the human CD4+ memory T cell response to cytomegalovirus. *J. Immunol.* 167, 1151–1163.
- Booss, J., Esiri, M.M., Tourtellotte, W.W., Mason, D.Y., 1983. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 62, 219–232.
- Brouard, S., Vanhove, B., Gagne, K., Neumann, A., Douillard, P., Moreau, A., Cuturi, C., Soulillou, J.P., 1999. T cell repertoire alterations of vascularized xenografts. *J. Immunol.* 162, 3367–3377.
- Brouard, S., Dupont, A., Giral, M., Louis, S., Lair, D., Braudeau, C., Degauque, N., Moizant, F., Pallier, A., Ruiz, C., Guillet, M., Laplaud, D., Soulillou, J.P., 2005. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am. J. Transplant.* 5, 330–340.
- de Vos, A.F., van Meurs, M., Brok, H.P., Boven, L.A., Hintzen, R.Q., van der Valk, P., Ravid, R., Rensing, S., Boon, L., t Hart, B.A., Laman, J.D., 2002. Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J. Immunol.* 169, 5415–5423.
- Degauque, N., Schadendorf, D., Brouard, S., Guillet, M., Sebille, F., Hohn, H., Pallier, A., Ruiz, C., Dupont, A., Chapin, S., Hofmann, U., Maeurer, M., Soulillou, J.P., 2004. Blood T-cell Vbeta transcriptome in melanoma patients. *Int. J. Cancer* 110, 721–729.
- Douillard, P., Pannetier, C., Josien, R., Menoret, S., Kourilsky, P., Soulillou, J.P., Cuturi, M.C., 1996. Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-Vbeta rearrangement in heart allografts. *J. Immunol.* 157, 1250–1260.
- Effros, R.B., Cai, Z., Linton, P.J., 2003. CD8 T cells and aging. *Crit. Rev. Immunol.* 23, 45–64.
- Gagne, K., Brouard, S., Giral, M., Sebille, F., Moreau, A., Guillet, M., Bignon, J.D., Imbert, B.M., Cuturi, M.C., Soulillou, J.P., 2000. Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J. Immunol.* 164, 1553–1563.
- Gorochov, G., Neumann, A.U., Kerever, A., Parizot, C., Li, T., Katlama, C., Karmochkine, M., Raguin, G., Autran, B., Debre, P., 1998. Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nat. Med.* 4, 215–221.
- Gran, B., Gestri, D., Sottini, A., Quiros Roldan, E., Bettinardi, A., Signorini, S., Primi, D., Ballerini, C., Taiuti, R., Amaducci, L., Massacesi, L., 1998. Detection of skewed T-cell receptor V-beta gene usage in the peripheral blood of patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 85, 22–32.
- Han, M., Harrison, L., Kehn, P., Stevenson, K., Currier, J., Robinson, M.A., 1999. Invariant or highly conserved TCR alpha are expressed on double-negative (CD3+CD4-CD8-) and CD8+ T cells. *J. Immunol.* 163, 301–311.
- Hong, J., Zang, Y.C., Tejada-Simon, M.V., Kozovska, M., Li, S., Singh, R.A., Yang, D., Rivera, V.M., Killian, J.K., Zhang, J.Z., 1999. A common TCR V-D-J sequence in V beta 13.1 T cells recognizing an immunodominant peptide of myelin basic protein in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 163, 3530–3538.
- Kotzin, B.L., Karuturi, S., Chou, Y.K., Lafferty, J., Forrester, J.M., Better, M., Nedwin, G.E., Offner, H., Vandenberg, A.A., 1991. Preferential T-cell receptor beta-chain variable gene use in myelin basic protein-reactive T-cell clones from patients with multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9161–9165.
- Laplaud, D.A., Ruiz, C., Wiertlewski, S., Brouard, S., Berthelot, L., Guillet, M., Melchior, B., Degauque, N., Edan, G., Brachet, P., Damier, P., Soulillou, J.P., 2004. Blood T-cell receptor beta chain transcriptome in multiple sclerosis. Characterization of the T cells with altered CDR3 length distribution. *Brain* 127, 981–995.
- Lozeron, P., Chabas, D., Duprey, B., Lyon-Caen, O., Liblau, R., 1998. T cell receptor V beta 5 and V beta 17 clonal diversity in cerebrospinal fluid and peripheral blood lymphocytes of multiple sclerosis patients. *Mult. Scler.* 4, 154–161.
- Maini, M.K., Gudgeon, N., Wedderburn, L.R., Rickinson, A.B., Beverley, P.C., 2000. Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype. *J. Immunol.* 165, 5729–5737.
- Matsumoto, Y., Yoon, W.K., Jee, Y., Fujihara, K., Misu, T., Sato, S., Nakashima, I., Itoyama, Y., 2003. Complementarity-determining region 3 spectratyping analysis of the TCR repertoire in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 170, 4846–4853.
- Melchior, B., Nerriere-Daguin, V., Degauque, N., Brouard, S., Guillet, M., Soulillou, J.P., Brachet, P., 2005. Compartmentalization of TCR repertoire alteration during rejection of an intrabrain xenograft. *Exp. Neurol.* 192, 373–383.
- Miller, D.H., Khan, O.A., Sheremata, W.A., Blumhardt, L.D., Rice, G.P., Libonati, M.A., Willmer-Hulme, A.J., Dalton, C.M., Miszkiel, K.A., O'Connor, P.W., 2003. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 348, 15–23.
- Muraro, P.A., Bonanni, L., Mazzanti, B., Pantalone, A., Traggiai, E., Massacesi, L., Vergelli, M., Gambi, D., 2002. Short-term dynamics of circulating T cell receptor V beta repertoire in relapsing-remitting MS. *J. Neuroimmunol.* 127, 149–159.
- Musette, P., Benveniste, O., Lim, A., Bequet, D., Kourilsky, P., Dormont, D., Gachelin, G., 1996. The pattern of production of cytokine mRNAs is markedly altered at the onset of multiple sclerosis. *Res. Immunol.* 147, 435–441.
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G., 2000. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 343, 938–952.
- Pannetier, C., Even, J., Kourilsky, P., 1995. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol. Today* 16, 176–181.
- Polman, C.H., O'Connor, P.W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D.H., Phillips, J.T., Lublin, F.D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M.A., Sandrock, A.W., 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 354, 899–910.
- Prat, A., Antel, J., 2005. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 18, 225–230.
- Prevost-Blondel, A., Lengagne, R., Letourneur, F., Pannetier, C., Gomard, E., Guillet, J.G., 1997. In vivo longitudinal analysis of a dominant TCR repertoire selected in human response to influenza virus. *Virology* 233, 93–104.
- Wucherpfennig, K.W., Ota, K., Endo, N., Seidman, J.G., Rosenzweig, A., Weiner, H.L., Hafler, D.A., 1990. Shared human T cell receptor V beta usage to immunodominant regions of myelin basic protein. *Science* 248, 1016–1019.
- Zamvil, S., Nelson, P., Trotter, J., Mitchell, D., Knobler, R., Fritz, R., Steinman, L., 1985. T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* 317, 355–358.

2.5 Résumé et Discussion

Une cohorte de 9 patients atteints de sclérose en plaques de la forme rémittente ($n=6$) et de la forme secondaire progressive ($n=3$) a été étudiée de façon seriée sur plusieurs années. A partir du sang de ces patients, l'analyse du répertoire $V\beta$ du TCR associée à celle des données obtenues par IRM a montré plusieurs corrélations : entre la proportion de familles $V\beta$ altérées et le volume lésionnel ainsi que le nombre de lésions. De plus, la formation de nouvelles lésions semble liée à l'apparition de nouvelles familles $V\beta$ altérées dans le sang des patients atteints de sclérose en plaques. Ces résultats étayent les données existantes sur le lien entre l'activation du système immunitaire et la démyélinisation du système nerveux central. L'approche basée sur la notion de distance (Cf Approches statistiques, § 1.3) a été mise en œuvre pour l'étude dans le temps de patients atteints de sclérose en plaques.

Dans cet article, l'activité du système immunitaire est évaluée, en particulier, par la stabilité dans le temps des formes des CDR3 LD. Pour chacun des trois individus présentant une forme rémittente de la maladie et suivis de manière régulière (individus 704, 820 et 818), une cinétique d'activité du répertoire T est proposée. Pour quantifier l'activité immunologique des patients au cours du temps, une distance globale a été utilisée (Explication dans le dernier paragraphe de la section 2.2.3 de l'article). Il s'agit de calculer les distances entre les CDR3 LD, pour chacune des familles $V\beta$, à des temps consécutifs. Si l'on somme les 26 distances calculées à partir des CDR3 LD d'un individu, à deux temps donnés, pour les 26 gènes $V\beta$, on obtient une distance globale (Distance) entre les deux points dans le temps. Plus cette distance est importante, plus le système immunitaire a été actif dans cette période de temps. Dans cette étude, les distances globales ont été calculées sur un nombre restreint de gènes $V\beta$ à cause des données manquantes ; respectivement 10, 8 et 7 familles $V\beta$ pour les individus 704, 820 et 818 ayant la forme rémittente.

Pour quantifier l'activité lésionnelle d'un patient à un temps précis, trois types de données ont été extraites à partir des images produites par IRM (Tableau 1 de l'article) : le volume lésionnel, le nombre total de lésions présentes (Gd^{+ve} lesions) et le nombre de nouvelles lésions apparues (New Gd^{+ve} lesions). Les données cliniques du patient 704 sont peu informatives : le volume lésionnel est très faible en valeur absolue ; aucune lésion n'est apparue durant toute la période de suivi. Pour quantifier l'activité lésionnelle entre le temps

T_i et le temps T_{i+1} , l'évolution du volume lésionnel a été traduite par le ratio « Volume lésionnel à T_{i+1} / Volume lésionnel à T_i ». En ce qui concerne l'évolution du nombre total de lésions présentes et apparues, un score a été inventé afin de rendre compte de la dynamique des lésions dans le cerveau. Ce score, nommé G_i (G pour gadolinium), permet de quantifier l'activité lésionnelle en tenant compte de l'apparition, du maintien et de la disparition des lésions prenant le gadolinium (détail du calcul dans le paragraphe 2.2.5 de l'article). La relation entre le score G_i et l'évolution du volume lésionnel a été testée sur les données des 2deux patients 820 et 818. Comme le montre la figure 51, le score G_i est fortement corrélé au ratio du « volume lésionnel » ($\rho=0,884$, $p<0,01$). Le score G_i donc semble être un indicateur pertinent de l'activité lésionnelle.

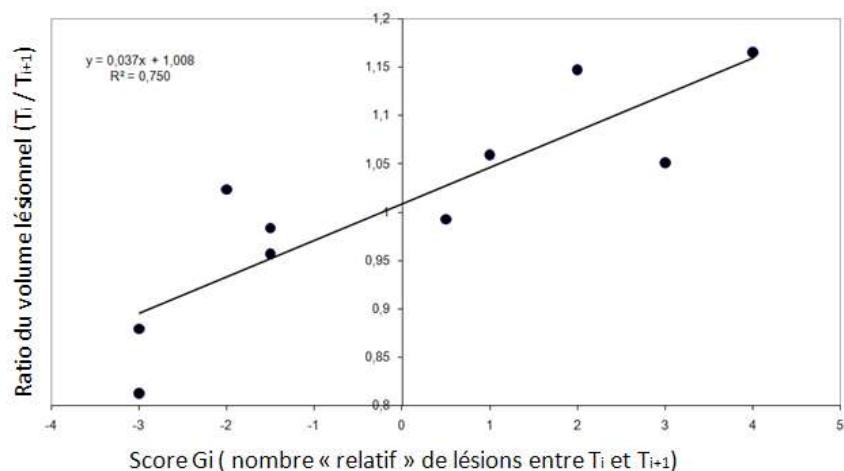


Figure 28 : Relation entre l'évolution du volume lésionnel et le score G_i (patients 820 et 818)

En ce qui concerne l'analyse longitudinale des variations des CDR3 LD et de l'activité lésionnelle, la figure 5d de l'article (reproduite ci-dessous, figure 52) illustre la concordance entre l'évolution dans le temps des formes de CDR3 LD (Distance) et l'évolution des lésions, traduite par le score G_i pour le patient 818.

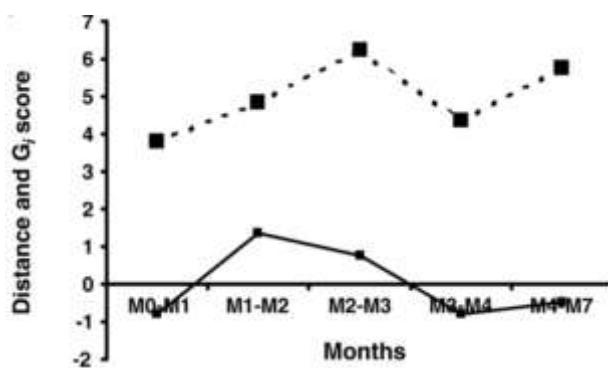


Figure 29 : Evolutions de l'activité immunologique (Distance, trait plein) et l'activité lésionnelle (Score Gi, trait pointillé) au cours du temps (en mois) pour le patient 818.

La variation synchrone des deux indices pour l'individu 818 est intéressante ; mais elle n'a pas pu être confirmée pour le patient 820. Il faut aussi noter que seulement 7 familles V β ont été prises en compte pour calculer la distance globale entre les points dans le temps, compte tenu des données manquantes.

Bien qu'ils aient été obtenus sur une petite cohorte de patients atteints de sclérose en plaques, les résultats de l'article suggèrent que l'analyse du répertoire T est possiblement corrélée aux données IRM. Réalisé à partir d'une simple prise de sang (alors que d'autres biomarqueurs comme le profil oligoclonal d'immunoglobulines découvert par Freedman *et al.* nécessitent une ponction lombaire (Freedman *et al.*, 2005)), le TcLandscape pourrait servir de marqueur biologique de la sclérose en plaques et permettre de suivre les patients au cours du temps. Dans cette perspective, le TcLandscape reste encore un marqueur très exploratoire (cf. pyramide de qualification de Wagner (Wagner, 2007), figure 49).

3 Analyse de patients transplantés rénaux par TcLandscape

Dans le cadre de la transplantation rénale, les différences qui existent entre les répertoires des patients atteints de rejet chronique et de ceux tolérant leur greffon sont mises en évidence par les deux approches statistiques décrites précédemment. L'approche des comparaisons par paires de distributions avec pondération par le caractère quantitatif a permis en 2006 de mettre en évidence ces différences. En 2007, l'utilisation d'une feature des CDR3 LD particulière, la Kurtosis, a confirmé cette observation et de caractériser le répertoire de patients ayant une fonction stable de leur greffon sous traitement immunsupresseur.

3.1 Rejet d'allogreffe et tolérance

3.1.1 *L'allotransplantation*

La transplantation se définit comme le transfert de cellules, de tissus ou d'organes d'un individu, le donneur, à un autre individu, le receveur. Lorsque le donneur et le receveur ont la même identité génétique, on parle d'autotransplantation.

L'allotransplantation est définie lorsque le donneur et le receveur, issus de la même espèce, sont deux individus génétiquement différents ; la xénotransplantation concerne un donneur et un receveur d'espèces différentes. L'allotransplantation rénale est le traitement de choix en cas d'insuffisance rénale chronique (Wolfe *et al.*, 1999). Par rapport à la dialyse, elle diminue la mortalité et la morbidité des patients et permet une réinsertion socioprofessionnelle et une amélioration de la qualité de vie des patients. La transplantation rénale est associée à la prise de traitements immunsupresseurs à vie, qui ont des effets secondaires importants (cancers, infections virales, complications métaboliques et cardiovasculaires) (Dantal *et al.*, 1998). De plus, ces traitements bien qu'ayant considérablement amélioré la survie du greffon ces vingt dernières années, notamment en réduisant la survenue du rejet aigu (Port *et al.*, 2007), ne préviennent pas à long terme l'apparition et le développement d'une dysfonction chronique du greffon (Nankivell *et al.*, 2003).

3.1.2 L'alloreconnaissance

Il s'agit de la reconnaissance par les lymphocytes T des alloantigènes. Ce processus a été mis en évidence au début des années 1940 par Gibson et Medawar lors d'une greffe de peau démontrant ainsi que le rejet d'organe avait une base immunologique (Gibson et Medawar, 1943). Le rejet d'allogreffe implique, en effet, la reconnaissance par les cellules T du receveur de molécules antigéniques ; et en premier lieu, des molécules du CMH du donneur. Ce processus n'a pas uniquement lieu au niveau du greffon lui-même mais plutôt au niveau des organes lymphoïdes secondaires (Lakkis *et al.*, 2000). Cette reconnaissance se fait selon deux processus : les alloreconnaisances directes et indirectes.

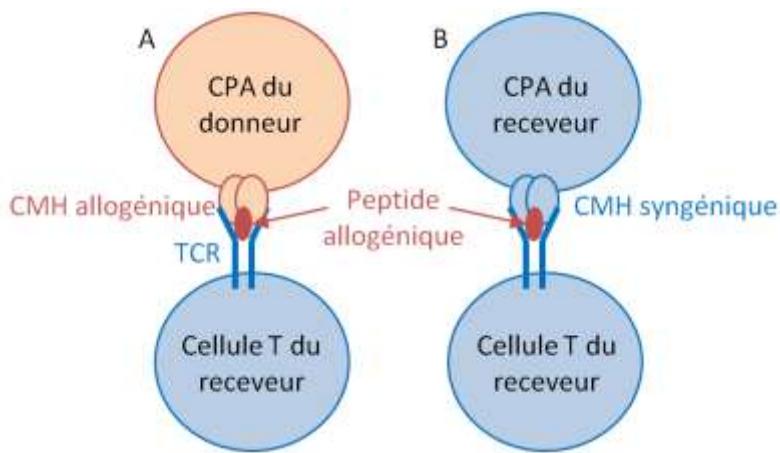


Figure 30 : Voies directe (A) et indirecte (B) de présentation des alloantigènes.

Comme l'indique la figure 53, selon la voie d'alloreconnaissance directe (A), les molécules du CMH allogéniques présentes à la surface des cellules présentatrices de l'antigène du donneur sont reconnues directement par les TCR des cellules T du receveur. Selon la voie d'alloreconnaissance indirecte (B), Les molécules allogéniques sont présentées par des molécules du CMH du receveur aux lymphocytes T du receveur suivant le processus classique de reconnaissance antigénique. Benichou et al. ont établi l'importance des deux types de présentation au cours des premiers jours de la greffe (Benichou, 1999) : au onzième jour de la greffe, plus de 90% des cellules alloréactives, au niveau des organes lymphoïdes du receveur, interagissent avec des molécules du CMH du donneur (voie directe) alors que seules 1 à 5% d'entre elles sont, à ce stade, dirigées contre des peptides du donneur présentés par des molécules CMH du soi (voie indirecte) (Benichou, 1999). En revanche, la fréquence des cellules alloréactives activées par voie indirecte se montre nettement

augmentée chez les sujets transplantés présentant un rejet chronique (Vella *et al.*, 1997). Après une transplantation, la présentation directe prédomine donc dans les phases précoce de la réponse immune, alors que la présentation indirecte intervient surtout dans les processus de rejet chronique.

3.1.3 Le rejet d'allo greffe

L'implantation d'éléments étrangers provoque chez le receveur une réponse immune appelée rejet de greffe. Ce phénomène regroupe trois types de rejets: le rejet hyper aigu, le rejet aigu et le rejet chronique (Orosz, 2003). Dès les premières minutes qui suivent la transplantation, peut survenir, dans un contexte particulier, un rejet hyperaigu dû à la présence chez le receveur d'anticorps circulants préformés et dirigés contre les antigènes du donneur (Stiller *et al.*, 1975). Ce type de rejet ne concerne que les organes vascularisés. De nos jours, rejet hyperaigu est évité dans la majorité des cas par la recherche d'anticorps anti-CMH (Cesbron-Gautier *et al.*, 2004) et par l'analyse des compatibilités CMH entre le donneur et le receveur réalisées avant toute transplantation (test du cross-match, (Patel et Terasaki, 1969)). Parce qu'il nécessite une immunisation, le rejet aigu peut survenir entre une semaine et plusieurs mois après la transplantation (Crespo *et al.*, 2001). Il est diagnostiqué par une biopsie de l'organe greffé et les lésions observées font l'objet d'une classifications internationale : la classification de Banff pour le rein (Solez *et al.*, 2007). Actuellement, grâce aux traitements immunsupresseurs, les épisodes de rejet aigu surviennent dans moins de 15% des transplantations (Port *et al.*, 2007). Bien qu'efficaces sur le rejet aigu, les traitements immunsupresseurs ne peuvent pas empêcher le développement d'une dysfonction chronique du greffon. Cette appellation ne correspond à aucune entité pathologique à proprement parler. Elle regroupe toutes les causes de perte des greffons, hormis le décès du patient (figure 54) (Pascual *et al.*, 2002).

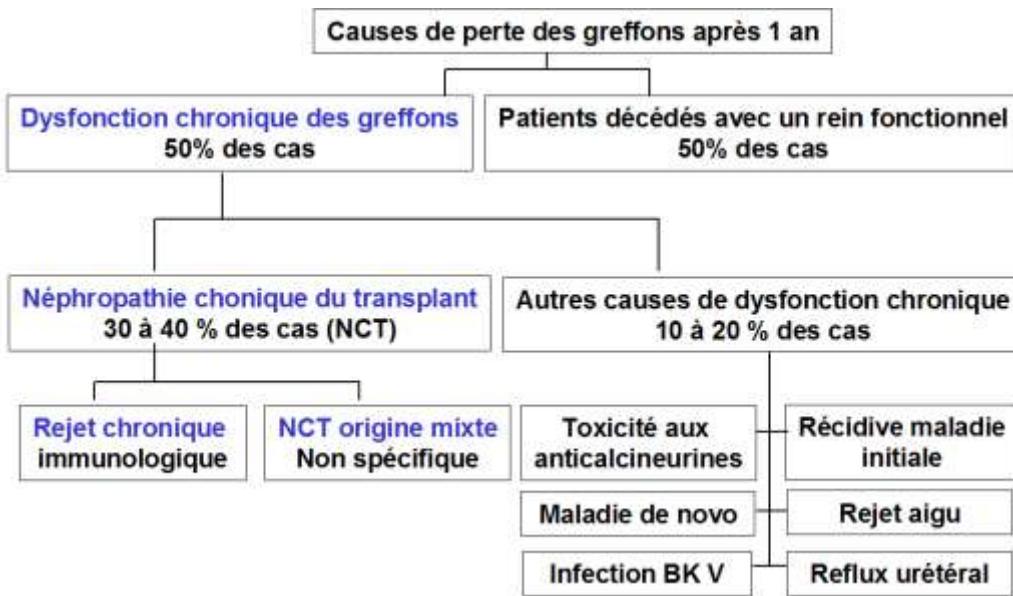


Figure 31 : Causes de dysfonction chronique du transplant (adapté de (Pascual et al., 2002)).

A l'intérieur de la dysfonction chronique du greffon, la néphropathie chronique du transplant représente de 30 à 40% des causes de perte des greffons. Elle peut être elle-même divisée en trois groupes :

- la néphropathie chronique à composante immunologique ou « rejet chronique vrai » (maladie traitée dans ce manuscrit)
- la néphropathie chronique d'origine mixte (présence de lésions aspécifiques).
- Les autres causes de dysfonction chronique dont : 1) la toxicité aux anticalcineurines (traitement immunosuppresseur), 2) la récidive de la maladie initiale, 3) l'apparition de maladie rénale de novo sur le greffon, 4) les infections du greffon par le BK virus (polyomavirus), 5) le rejet aigu, 6) le reflux urétéral (Pascual et al., 2002).

Au final, le rejet chronique est la principale cause de perte de greffon à long terme (Joosten et al., 2005) (Ballet et al., 2006), malgré l'amélioration du taux de transplants fonctionnels (Kasiske et al., 2005). Le rejet chronique est caractérisé histologiquement par une vasculopathie, avec un épaissement intimal et une prolifération des cellules musculaires lisses, et par une fibrose interstitielle. Dans le cas de la greffe rénale, il existe également une glomérulopathie qui est un dédoublement des membranes basales et une atrophie tubulaire (Nankivell et al., 2003; Nankivell et Chapman, 2006). La présence de C4d, un produit de dégradation de la fraction C4 du complément, dans la microvascularisation rénale et celle

d'anticorps anti-CMH signent une activité humorale caractéristique du rejet chronique (Solez *et al.*, 2007).

3.1.4 L'immunosuppression

L'évolution des traitements immunsupresseurs a été très importante ces 50 dernières années (Sayegh et Carpenter, 2004). Lors des premières greffes, une irradiation lymphoïde totale ayant pour objet de tuer les lymphocytes T était pratiquée sur le receveur (pour revue (Cortesini et Suciu-Foca, 2004)). L'administration d'agents antiprolifératifs comme l'azathioprine en 1962, de traitement inducteur, et enfin d'inhibiteur de calcineurines à la fin des années 1970 ont représenté un tournant dans le domaine de la transplantation (Pasqual *et al.*, 2002). Par la suite, de nouveaux immunsupresseurs ont agrandi l'arsenal thérapeutique (Mycophénolate Mofétil, tacrolimus, rapamycine). Cependant, la thérapie par immunsupresseur peut être considérée comme une épée à double tranchant (Lau *et al.*, 2006). Efficace à court terme pour la prévention du rejet aigu, elle entraîne à la suite d'une administration à long terme des problèmes de qualité de vie, de mortalité, de morbidité, un risque de cancer, une dysfonction rénale et de l'hypertension (Dantal *et al.*, 1998) (figure 55).

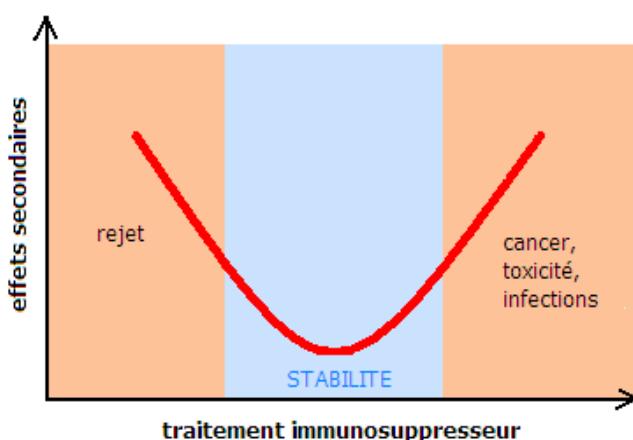


Figure 32 : Influence du traitement immunsupresseur sur le greffon et l'organisme.

En effet, les risques de cancer sont estimés à 40% après 20 ans d'immunosuppression, avec aussi, le risque de développement de maladies métaboliques délétères (hyperlipidémie, diabète) (Euvrard *et al.*, 2003). Les inhibiteurs de calcineurine ont aussi une importante nephrotoxicité responsable de la néphropathie du transplant (Joosten *et al.*, 2005). Il s'agit donc de fournir au patient un niveau d'immunosuppression qui permette de prévenir le rejet

de greffe tout en préservant l'immunocompétence contre les pathogènes environnant (Kirk *et al.*, 2005). Le but ultime en transplantation serait de supprimer toute immunosuppression en induisant une tolérance prolongée et spécifique du greffon.

3.1.5 *La tolérance*

3.1.5.1 Définition et mécanismes immunologiques

La tolérance immunitaire peut être définie comme une non réponse immunitaire spécifique à un antigène donné, coexistant avec le maintien d'une immunocompétence normale vis-à-vis des autres antigènes (Bach, 2006). La tolérance est un état qui requiert la perturbation de mécanismes immunitaires aussi bien centraux que périphériques (Starr *et al.*, 2003). Les mécanismes centraux se basent sur la différenciation des lymphocytes T dans le thymus où ils subissent une sélection positive suivie d'une sélection négative (voir Introduction, § 1.3.3) (Kyewski et Klein, 2006). On peut définir une tolérance centrale jouant un rôle essentiel dans la tolérance au soi, en éliminant une grande majorité des cellules T autoréactives (Kyewski et Klein, 2006). Malgré les sélections intrathymiques, certains lymphocytes autoréactifs ne subissent pas la sélection et doivent donc être supprimés en périphérie. L'organisme a développé des mécanismes périphériques pour contrôler ces lymphocytes potentiellement dangereux et ainsi se protéger (Walker et Abbas, 2002). Dans le cadre de la tolérance immunitaire à un antigène, divers mécanismes sont avancés comme : l'anergie, correspondant à un défaut d'activation des lymphocytes T qui ne leur permettent pas de répondre à une stimulation ultérieure (Jones *et al.*, 1990) ; la délétion clonale périphérique, élimination par apoptose des lymphocytes (Jones *et al.*, 1990) ; l'ignorance, il s'agit de l'incapacité des lymphocytes T à être activés par les antigènes en dehors des organes lymphoïdes secondaires (Lakkis *et al.*, 2000) ; et des mécanismes de suppression ou de régulation, faisant intervenir les cellules dites régulatrices ou suppressives dans le contrôle des fonctions des lymphocytes T (Wood et Sakaguchi, 2003).

3.1.5.2 La tolérance en transplantation

Chez l'homme, il existe plusieurs types de tolérance : la tolérance opérationnelle et la tolérance partielle.

La tolérance opérationnelle correspond à une survie prolongée d'une allogreffe d'organe avec une fonction stable en l'absence de traitement immunosuppresseur chez un receveur parfaitement immunocompétent (Ansari et Sayegh, 2004). Certains critères sont parfois retenus pour compléter la définition de la tolérance : l'absence d'anticorps anti-donneur, l'absence d'infiltration du greffon par des lymphocytes T et une faible réponse dirigée contre le donneur *in vitro*, alors que la réponse contre les cellules d'une autre personne est conservée (Fehr et Sykes, 2004). Le terme de tolérance opérationnelle ne signifie pas forcément aucune réponse du système immunitaire contre les cellules du donneur, mais se réfère plutôt à une réponse immunitaire n'entraînant pas la destruction du greffon, malgré la présence de capacités de réponse immune du receveur (Reding *et al.*, 2006). L'étude de patients greffés rénaux opérationnellement tolérants a montré qu'ils ne présentent pas de signes cliniques d'immunodépression; puisque depuis l'arrêt des traitements immunosuppresseurs, ils n'ont pas subi plus d'infections opportunistes que les autres patients (Roussey-Kesler *et al.*, 2006). De plus, l'analyse de la réponse immunitaire des patients opérationnellement tolérants après une vaccination antigrippale montre que ces patients répondent majoritairement comme des individus sains (Ballet *et al.*, 2006). Plusieurs études ont été menées sur ces patients dans le but de trouver des caractéristiques qui leur sont propres par rapport à d'autres groupes de transplantés rénaux, et ceci notamment au niveau sanguin. L'analyse du répertoire T (Brouard *et al.*, 2005), suivie d'une caractérisation phénotypique (Baeten *et al.*, 2006; Louis *et al.*, 2006), a montré que les patients opérationnellement tolérants présentaient des répertoires T particuliers (voir Discussion). Récemment, des analyses par puces à ADN ont permis de révéler les différences au niveau des transcriptomes des individus atteints de rejet chronique et des individus opérationnellement tolérants (Braud *et al.*, 2007; Brouard *et al.*, 2007) (voir Perspectives).

La tolérance partielle ou « propre » (« presque » en latin) développée par Calne et collaborateurs correspond à une survie prolongée du greffon avec une fonction stable chez un receveur parfaitement immunocompétent sous une dose minimale, non toxique, d'immunosuppresseurs (Calne, 2004; Cortesini et Suciu-Foca, 2004).

3.2 Les Biomarqueurs en transplantation

En transplantation, des biomarqueurs sont développés pour pouvoir prédire la survenue d'événements liés à la survie du greffon (Lachenbruch *et al.*, 2004). Grâce aux progrès réalisés dans le domaine des immunosuppresseurs, le taux de rejet aigu a considérablement baissé. Alors que l'évaluation de l'efficacité des traitements était plus « facile » dans le cadre du rejet aigu compte tenu de survenue précoce du rejet, il est désormais difficile d'évaluer des interventions thérapeutiques sur le rejet chronique. En effet, dans le cadre de la prévention du rejet chronique, il est nécessaire de réaliser un suivi à long-terme pour apprécier le devenir des patients. L'identification de marqueurs précoces est devenue cruciale pour tester plus rapidement, de manière moins coûteuse, et si possible de manière non invasive de nouveaux moyens thérapeutiques (Hernández *et al.*, 2007).

De nombreux biomarqueurs, à différents stades de qualification ont été découverts. Ces biomarqueurs sont des critères de substitution encore hypothétiques (Hernández *et al.*, 2007) (voir figure 56).

Critère clinique	Biomarqueur / Critère de substitution
Fonction rénale	Créatininé (Sérum) Clairance GFR (Taux de Filtration des Glomérules)
Dysfonction chronique du greffon	Fibrose interstitielle Arthériopathie chronique du greffon Score Banff
Réponses allogéniques	Anticorps ant-HLA Perforine / Granzyme B Cytokines Profil de puces à ADN
Morbidité/Mortalité/Qualité de Vie	Infections, tumeurs Hyperlipidémie Diabète

Figure 33 : Biomarqueurs / critères de substitution potentiels pour le devenir à long-terme du greffon.

3.2.1 Prévenir le rejet

La prévention de la dysfonction chronique du greffon est le nouveau challenge de la transplantation (Marsden, 2003). Il est nécessaire aujourd’hui d’identifier des biomarqueurs qui permettraient d’intervenir très tôt sur l’évolution d’une greffe et d’anticiper les modifications de stratégie thérapeutique, avant que des phénomènes irréversibles ne conduisent à la dysfonction chronique du greffon et à l’échec de greffe. Comme le montre en détail la figure 56, il existe quelques indicateurs pronostiques de l’état du greffon ; aucun n’est vraiment un critère de substitution. Par exemple, un taux élevé de créatinine dans le sang, à 6 mois et à un an, est associé à un risque élevé de dysfonction du greffon (Hariharan *et al.*, 2002). Malgré son caractère invasif, la biopsie est la technique de référence pour l’évaluation de la dysfonction du rein. Le score Banff, basé sur cet examen histopathologique, est un réel outil de diagnostic (Solez *et al.*, 2007). De plus, il apporte de précieuses indications pour discriminer le type de rejet (immunologique ou non immunologique), prédire la réponse à un agent immunsupresseur et prédire la survie à court ou long terme du greffon (Bates *et al.*, 1999). C'est cependant une technologie invasive, déclinée par une fraction non négligeable de patients (Lachenbruch *et al.*, 2004). Des marqueurs moléculaires sont nécessaires pour améliorer la précision de la biopsie dans le diagnostic et de l’activité de la maladie (Lachenbruch *et al.*, 2004).

Dans le domaine de la prévention du rejet chronique, les approches « génératrices d’hypothèses » comme les puces à ADN ont été récemment utilisées. Ces analyses ont un fort potentiel pour classer ou identifier de nouvelles classes de rejet. Par exemple, Sarwal *et al.* et Hoffman *et al.* ont permis de dégager différents sous-types de rejet aigu non différenciables en microscopie (Sarwal *et al.*, 2003) (Hoffmann *et al.*, 2005). Dans le cadre du rejet chronique, des approches similaires ont permis de montrer, sur des biopsies, que les patients transplantés, avec un rejet chronique établi ou en phase terminale de polycystite rénale, avaient des profils d'expression distincts (Donauer *et al.*, 2003). Pour pouvoir prédire la survenue du rejet chronique, Scherer et al. ont réalisé une étude rétrospective sur des biopsies de patients ayant une fonction stable à 6 mois, mais dont la moitié a développé des signes de rejet chronique à 12 mois (Scherer *et al.*, 2003). Dix gènes différentiellement exprimés entre les deux groupes ont été mis en évidence. Grâce à un groupe de validation, la

signature a permis de prédire, à 12 mois, l'occurrence du rejet chronique chez 15 patients sur 17 (Scherer *et al.*, 2003).

3.2.2 Identifier la tolérance

Même si le phénomène demeure très rare, l'observation de la tolérance en clinique a ouvert de larges perspectives au niveau de la qualité de vie des patients transplantés (Bluestone *et al.*, 2000). L'établissement d'un état de tolérance pour le plus grand nombre de patients est devenu l'objectif principal. La recherche de biomarqueurs s'est donc axée sur la compréhension de l'état de tolérance et sur l'identification des patients susceptibles de le développer (Ashton-Chess *et al.*, 2006). Aujourd'hui, différents tests sont susceptibles d'identifier les patients potentiellement tolérants (Reding *et al.*, 2006) (Newell et Larsen, 2006) (Lau *et al.*, 2006). Ces essais ont pour objectif de caractériser le système immunitaire des patients tolérants. Certains tests mesurent directement l'alloréactivité immune du receveur contre son greffon en détectant la présence de cellules T alloréactives (trans-vivo delayed-type hypersensitivity) (VanBuskirk *et al.*, 2000), d'autres mesurent la production de cytokines par ELISPOT (Hricik *et al.*, 2003) ou la présence d'anticorps anti-donneur (Rifle *et al.*, 2005). D'autres tests, basés sur l'analyse de sous-groupes de cellules dendritiques (Mazariegos *et al.*, 2003) ou sur la caractérisation phénotypique des cellules T, recherchent des populations cellulaires potentiellement associées à la tolérance, telles que les cellules dendritiques plasmocytaires ou les cellules T CD4⁺CD25^{high} (Li *et al.*, 2004). Les tests « omiques » font aussi partie du panel d'outils moléculaires pour la recherche de la signature de la tolérance. La détection des polymorphismes génétiques (approche “génomique”) a été engagée au niveau des gènes codants pour les cytokines (Akalin et Murphy, 2001). L'analyse de l'expression globale des gènes des individus, approche “transcriptomique”, a récemment permis de mettre en évidence des signatures de la tolérance (Braud *et al.*, 2007; Brouard *et al.*, 2007)). L'analyse de l'expression du répertoire T a aussi révélé une empreinte de la tolérance (Brouard *et al.*, 2005). L'utilisation de la spectrométrie des protéines dans l'urine des patients transplantés (approche “protéomique”) sont de nouveaux tests potentiels de la tolérance. Des études utilisant de plus grandes cohortes sont désormais nécessaires. Outre le diagnostic/pronostic de la tolérance, la recherche de biomarqueurs de la tolérance devrait aussi permettre d'assurer le suivi des patients opérationnellement tolérants (Ashton-Chess *et al.*, 2007).

3.3 Protocole d'étude

Dans ce manuscrit, deux études font intervenir des patients opérationnellement tolérants. La première étude a fait l'objet d'une présentation orale au congrès mondial de transplantation en juillet 2006 (WTC2006) (Miqueu *et al.*, 2006) et d'un poster au congrès européen d'immunologie ECI 2006 (voir partie 3.4). Cette étude avait pour objectif de montrer qu'il existait des différences entre les répertoires T périphériques des patients opérationnellement tolérants et des patients ayant des signes de rejet chronique. Dans un deuxième temps, l'élargissement de la cohorte de patients opérationnellement tolérants à 14 individus et l'analyse d'une cohorte de 200 patients ayant une fonction stable de leur greffon sous traitement immunosuppresseur ont amené de nouveaux résultats présentés sous la forme d'un article dans le chapitre suivant.

Concernant les études menées sur les patients opérationnellement tolérants, il faut mentionner le très faible effectif de ces patients dans le monde. En effet, il est assez exceptionnel de tolérer son greffon en l'absence de tout traitement immunosuppresseur. Comme l'ont indiqué Roussey-Kessler *et al.*, l'arrêt du traitement est majoritairement dû à de la non compliance ; les autres patients ont arrêté leur traitement à cause de la survenue de cancers ou de désordres lymphoprolifératifs (PTLD) (Roussey-Kessler *et al.*, 2006). Afin de regrouper et d'étudier des échantillons de patients, deux réseaux internationaux ont été mis en place: le réseau européen « Indices of Tolerance » (<http://www.transplant-tolerance.org.uk/>) dont l'unité INSERM U643 fait partie, et le réseau américain « Immune Tolerance Network » (<http://www.immunetolerance.org>) (Bluestone *et al.*, 2000). En novembre 2007, le consortium Indices of Tolerance avait recruté 11 patients et l'Immune Tolerance Network, 23 patients (dont la moitié aurait subi une greffe familiale). Concernant notre étude sur la tolérance opérationnelle, le recrutement des patients a débuté en 2002 et se poursuit actuellement. La première analyse publiée en 2005 comptait 5 patients opérationnellement tolérants (Brouard *et al.*, 2005) ; la seconde analyse en présentait 6, dont trois nouveaux patients (2 TcLandscapes de l'ancienne étude ayant été invalidés, à cause d'une probable altération du matériel biologique suite à un problème de décongélation) (Abstract WTC2006 (Miqueu *et al.*, 2006)). Le nombre de patients opérationnellement tolérants présents dans notre dernière étude s'élève à 14. Le faible

nombre de patients ainsi que la fréquence irrégulière du recrutement ont un impact sur la conception du plan expérimental et sur les méthodes statistiques employées. En effet, compte tenu du nombre important de variables composant un TcLandscape, et du faible nombre d'individus analysés, seules des analyses non supervisées ont été menées. Celles-ci correspondent à des analyses descriptives mettant en évidence les différences entre les groupes sans chercher à discriminer les individus sur la base d'une règle prédictive.

Dans les études sur la tolérance opérationnelle, la définition du groupe de référence à comparer aux patients opérationnellement tolérants est problématique qu'il s'agisse de la tolérance dans la greffe de rein (Brouard *et al.*, 2007) ou de foie (Martinez-Llordella *et al.*, 2007). Dans les deux études présentées ci-dessous, les patients opérationnellement tolérants ont été comparés à des patients en rejet chronique et à des individus sains. Sur le plan clinique, les patients opérationnellement tolérants sont très différents des patients ayant des signes de rejet chronique (Solez *et al.*, 2007) : mauvaise fonction rénale, greffon présentant des signes histologiques de rejet et prise de médicament (tous les patients de ce groupe sont, en effet, sous traitement immunosuppresseur dans les deux études présentées ci-dessous). Les patients opérationnellement tolérants n'ayant pas subi de biopsies, l'état histologique de leur greffe est inconnu. Les individus sains sont un groupe contrôle particulier, n'ayant pas reçu de greffe. Ils sont néanmoins inclus dans l'étude pour donner un point de repère « absolu » sur la situation d'un patient greffé.

Enrichie par l'augmentation du nombre de patients opérationnellement tolérants et de patients ayant des signes de rejet chronique, la deuxième étude est aussi complétée par les résultats obtenus dans le cadre de l'étude GenHomme – Programme Hospitalier de Recherche Clinique 2003 (Investigateur Principal : Magali Giral, ITERT). Cette étude a pour objet l'évaluation de tests prédictifs de la tolérance chez le receveur d'allogreffe de rein à fonction stable. 200 patients ayant une fonction stable, depuis plus de cinq ans et sous traitement immunosuppresseur, ont donc été recrutés. Un prélèvement sanguin a permis de réaliser une analyse TcLandscape et une analyse par puces à ADN. L'objectif de cette étude est d'identifier des patients potentiellement tolérants au sein de cette cohorte. Il s'agit donc de tester l'hypothèse qu'une proportion notable de greffés, depuis plus de cinq ans, et sous immunosuppresseurs présente un profil de type tolérant (TcLandscape et profil d'expression). Cette étude poserait les bases potentielles d'un essai clinique randomisé de

diminution progressive de l'immunosuppression chez des sujets ayant le phénotype tolérant. Afin d'analyser à l'inclusion les corrélations entre les résultats des deux bioessais et les données biologiques et cliniques des patients de l'étude GenHomme, l'ensemble des rapports cliniques des 200 patients a été saisi dans une base de données nommée DIVAT (Données Informatiques Validées en Transplantation, Magali Giral ITERT).

3.4 Discrimination de la tolérance opérationnelle et du rejet chronique

Discrimination of Kidney Graft Recipients Presenting Operational Tolerance or Chronic Rejection Based on a TcLandscape Analysis. +

Patrick Miqueu, Marina Guillet, Jean-Christophe Doré, Dominique Bertrand, El Mostafa Qannari, Jean-Paul Souillou and Sophie Brouard.

Abstract publié dans American Journal of Transplantation (2006) 6(s2): 403

+ Discrimination des patients transplantés rénaux opérationnellement tolérants ou présentant un rejet chronique par l'analyse TcLandscape.

Ce résumé présente les résultats de la première étude sur la tolérance, comprenant cinq patients opérationnellement tolérants et neuf patients présentant des signes de rejet chronique. L'utilisation de l'approche des comparaisons de distributions a permis de mettre en évidence la différence de répertoire entre ces deux groupes.

- Ces résultats ont fait l'objet d'une présentation orale au congrès mondial de transplantation en juillet 2006 (WTC2006), Abstract (Miqueu *et al.*, 2006).
- Ils ont aussi été présentés sous la forme d'un poster au congrès européen d'immunologie ECI, en septembre 2006.

cells. We have identified TRIB1 as a blood marker of CR in humans. A study of TRIB1 in 6 month protocol biopsies of informative renal transplants and correlation with renal function at 1 year is now underway. TRIB1 may serve as a diagnostic or prognostic marker of CR.

Abstract# 997

BEHAVIOR OF REGULATORY T CELLS IN KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS. A LONGITUDINAL STUDY. José C Crispín,¹ María Inés Vargas Rojas,¹ Gabriel Carrasco,¹ Claudia de Leo,² Luis Eduardo Morales Buenrostro,³ Jorge Alcocer Varela,¹ Josefina Alberú.² ¹*Department of Immunology and Rheumatology;* ²*Department of Transplantation;* ³*Department of Nephrology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico.*

The importance of regulatory T cells (Treg) in the allogenic response is being increasingly recognized. However, their assumed role in transplantation immunology is poorly understood in the human scenario. The aim of this work was to periodically quantify Treg in kidney transplant recipients (KTR) during an extended period of time in order to observe their quantitative behavior and seek relationships between their numbers and clinical outcomes.

Although 79 KTR have been enrolled in this study, this report considers 62 patients with more than 6 months of follow-up time. Transplants were performed between January 2004 and August 2005. Anti-HLA antibodies were quantified monthly (Luminex-One Lambda); Treg (CD4⁺CD25^{hi}) were quantified approximately every 3 months. Kidney biopsies were performed at the time of the transplant and a year after; biopsies were also obtained in case of renal dysfunction.

Mean age (\pm SD) of the study group was 34.3 ± 13.3 ; 55% of them were female. Mean follow-up time was 16.3 ± 6.0 months. Twenty patients developed antibodies against class II HLA molecules; they had significantly lower numbers of Tregs than the patients who did not (4.1 ± 3.3 vs. 10.6 ± 9.0 , $P=0.006$). Interestingly, 60% of them exhibited a sharp drop in Treg levels temporally associated with seroconversion (mean Treg 4.17 ± 2.5 vs. Treg during seroconversion 0.25 ± 0.2 , $P=0.05$). Biopsies were performed in 33 patients that completed one year of follow-up; 23 showed signs of chronic allograft nephropathy (CAN). Unexpectedly, patients who developed CAN had significantly higher numbers of Treg cells than patients who did not (6.2 ± 6.3 vs. 3.0 ± 1.5 , $P=0.05$). The increase in Treg numbers was particularly associated with interstitial fibrosis and mesangial matrix changes. Only 1 patient developed an acute rejection episode. No change in Treg numbers was associated with such event. At the time of the study, all of the patients maintained normal renal function. Hence, we were not able to observe if Treg counts have any effect in long-term graft function. Our results suggest that Treg play an important role in modulating the development of anti-HLA class II antibodies. Additionally, results suggest that Treg take part in the complex pathogenesis of CAN.

Abstract# 998

DISCRIMINATION OF KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS PRESENTING OPERATIONAL TOLERANCE OR CHRONIC REJECTION BASED ON RECOGNITION OF T CELL RECEPTOR CDR3 LENGTH DISTRIBUTION PATTERNS. Patrick Miqueu,¹ Marina Guillet,² Jean-Christophe Doré,³ Jean-Paul Soullilou,¹ Sophie Brouard.¹ ¹*Unit 643, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, Nantes, France;* ²*TcLand SA, Nantes, France;* ³*UMR 8041, CNRS – Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.*

Survival of solid organ grafts depends on life-long immunosuppression that results in increased rates of infection and malignancy. Therefore, development of tolerance by progressively decreasing immunosuppressive drugs remains the major goal in transplantation. When combined with a quantitative assessment of T Cell Receptor (TCR) beta chain transcripts, spectratyping, which consists in analyzing the CDR3 length distribution of the TCR beta chain, is a particularly sensitive method for revealing

recruitment of T cells involved in immunological responses. This method, called TcLandscape, was used to assess the TCR repertoire in the blood of drug-free recipients operationally tolerant to a renal allograft and patients with chronic rejection. In order to extract the information contained in the CDR3 length distributions, we develop a new statistical method based on pattern recognition. This method statistically categorizes each CDR3 length distributions according to their shape and compares them. Moreover, the shape of the CDR3 length distribution is combined with the respective quantity of TCR beta chain transcripts. Using this new method, we identified a distinct signature between operationally tolerant recipients ($n=6$) and patients with chronic rejection ($n=13$). When computed with correspondence factor analysis, the two groups of recipients were well separated (Phi 1=33.2%). In contrast to the previous method of analysis, this new method can link specific shapes of CDR3 length distributions and transcript quantities to clinical status. In this context, this new statistical procedure could provide a solid basis for the screening of a large cohort of stable patients under conventional immunosuppression where patients displaying a profile similar to the described tolerant profile would be identified and subsequently randomized for progressive and controlled immunosuppressive weaning.

Abstract# 999

INDICES OF TOLERANCE: INTERIM REPORT. Maria Hernandez-Fuentes,¹ Birgit Sawitszki,⁴ Pervinder Sagoo,¹ Flavia Rovis,¹ Elvira Jimenez,¹ Esperanza Perucha,¹ Alain Le Moine,³ Ligia Craciun,³ Bettina Peters,⁶ Cecile Braudeau,⁵ Sophie Brouard,⁵ Piotr Trzonkowski,⁷ Gregor Warnecke,⁷ Stephanie Chapman,⁷ Myriam Libin,³ Anthony Warrens,² Michel Goldman,³ Hans-Dieter Volk,⁴ Jean-Paul Soulillou,⁵ Uwe Janssen,⁶ Kathryn Wood,⁷ Robert I Lechler.¹ ¹*King's College London, United Kingdom;* ²*Imperial College London, United Kingdom;* ³*Université Libre Bruxelles, Belgium;* ⁴*Charité Medical Hospital, Berlin, Germany;* ⁵*INSERM U437, Nantes, France;* ⁶*Miltenyi Biotech GmbH, Germany;* ⁷*Oxford University, United Kingdom.*

This multi-centre study is aimed at finding specific immunological characteristics which identify tolerance, by *in vitro* immunological monitoring of 4 groups of renal transplant recipients; Stable renal function with (1) CNI or (2) non-CNI based immunosuppression, patients undergoing (3) chronic rejection (CR) & (4) drug-free Tolerant recipients.

Quantitative assessments of donor-specific responses are obtained by IFN γ ELISpot and CFSE analysis. Donor and 3rd party stimulation of directly and indirectly primed responder cells is also assessed by real time-PCR analysis of TH₁/TH₂ cytokines and FoxP3. CD4⁺CD25⁺ depletion from responder populations in these assays is used to detect donor-specific Treg-mediated suppression. Quantitative-PCR analysis of a panel of tolerance and rejection associated genes is performed on recipient PBMCs. Combined with other approaches used to examine these same patients (*trans-vivo* DTH, microarray, TCR-Landsotyping) this study may provide an immunological ‘fingerprint’ of the tolerant state.

Interim data shows that ELISpot can be effectively used to detect donor-specific hyporesponsiveness and donor-specific regulation of indirect allo-responses, where regulation is also detectable by RT-PCR cytokine analysis. By q-PCR analysis of PBMCs, there appears to be no clear correlation between the expression of single genes and tolerance versus rejection. However analysis of FoxP3 and α -Mannosidase expression as a ratio does appear to distinguish tolerant from CR patient groups, where CR patients display a significantly lower ratio and conversely, tolerant patients show a higher ratio compared to stable transplant recipients.

Donor-specific assays can provide an insight into the generation and regulation of recipient responses following transplantation. Preliminary q-PCR analysis shows it can be used to distinguish tolerant patients, with the potential to indicate patients where immunosuppression withdrawal may be possible.

discrimination of kidney graft recipients presenting operational tolerance or chronic rejection based on a TcLandscape® analysis

Patrick Miqueu^{1,2}, Marina Guillet², Jean-Christophe Doré³, Dominique Bertrand⁴, El Mostafa Qannari⁴, Jean-Paul Soulillou¹ and Sophie Brouard¹

rationale & goals

To prevent graft loss following kidney transplantation, transplant recipients take immunosuppressors. Despite this treatment, histological lesions may occur, suggesting chronic rejection. Anecdotal cases of kidney recipients who have interrupted their immunosuppression but tolerate their graft have been reported. To better understand this tolerance mechanism, the blood T cell Transcriptome of drug-free tolerant kidney recipients and individuals with chronic rejection was compared by analyzing the expression of the Complementarity Determining Region 3 (CDR3) of the T Cell Receptor (TCR) β chain.

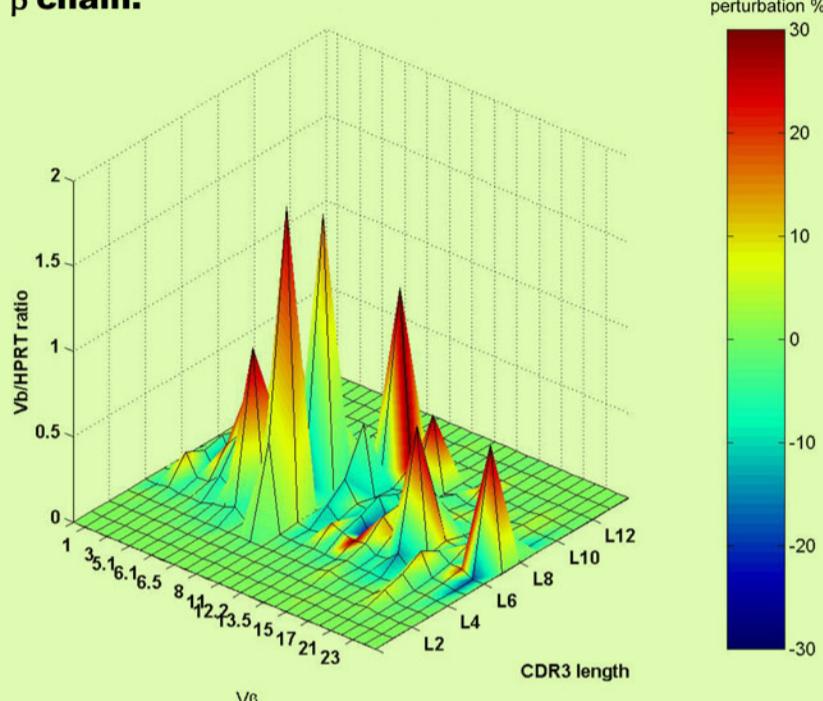


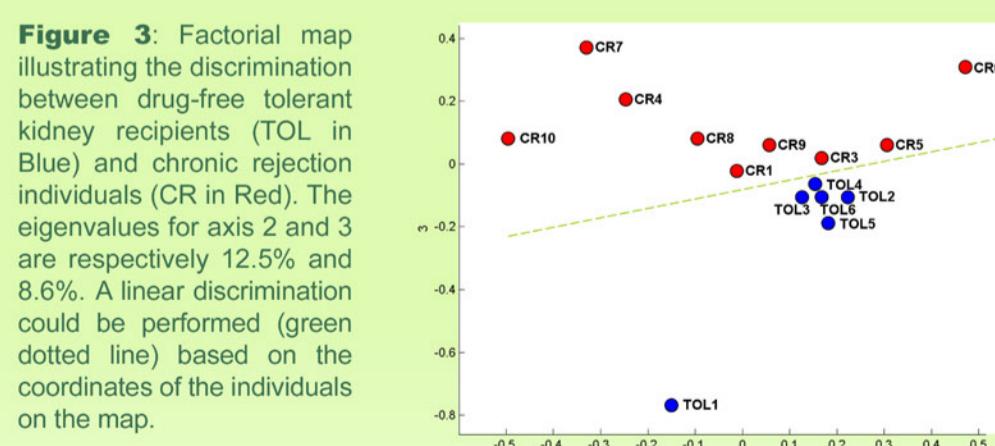
Figure 1: TcLandscape® of a patient from the CR group (CR7). The TcLandscape® is a 4 dimension representation which combines CDR3 LD of TCR V β transcripts and their normalized quantity (V β /HPRT). The color code illustrates the local difference between the CDR3 LD and a Gaussian distribution. A TcLandscape® is composed of 689 data.

statistical analysis

There are 3 major goals in the analysis of the TcLandscape® data:

- 1: Extracting the information contained in the CDR3 LD
- 2: Associating CDR3 LD and quantity of transcript
- 3: Reducing the dimensionality of the data

To achieve these goals, we developed a 3-step procedure which quantifies the “similarity” between all samples (Figure 2). This statistical method is totally unsupervised, i.e. it is without any group information *a priori*.



conclusion & perspectives

Analysis of the TcLandscape® data using this new unsupervised and automated pattern recognition method revealed a significant difference between the T cell repertoires of chronic rejection and those of operationally tolerant patients. These results could provide a solid basis for the screening of a large cohort of stable kidney graft recipients under conventional immunosuppression. Patients displaying a profile similar to the described “tolerant profile” would be identified for a potential, progressive and controlled immunosuppressive weaning.

¹ INSERM Unit 643/ITERT (Nantes, France) ² TcLand S.A. (Nantes, France)

³ CNRS/MNHN UMR 5154 (Paris, France) ⁴ ENITIAA/INRA UMR 1124 (Nantes, France)

patients

Operationally tolerant patients (TOL) had a stable kidney graft function (Creatinemia < 150 μ M/L, Proteinuria < 1g/24H) without any immunosuppressive drug for more than 1 year (n=6). The chronic rejection (CR) group was composed of patients displaying a degradation of their renal function with histological lesions of chronic rejection (BANFF 97 grade II or IIIb) associated or not with an allograft glomerulopathy (n=9).

method

When combined with a quantitative assessment of TCR β chain transcripts, the analysis of the CDR3 length distribution (CDR3 LD) is a particularly sensitive method for revealing recruitment of T cells selected during immunological responses. This method, called TcLandscape®, was used to assess the TCR repertoire in the blood of TOL and CR patients. 26 V β gene family transcripts were analyzed (Figure 1). ¹ Sébille et al. 2001.

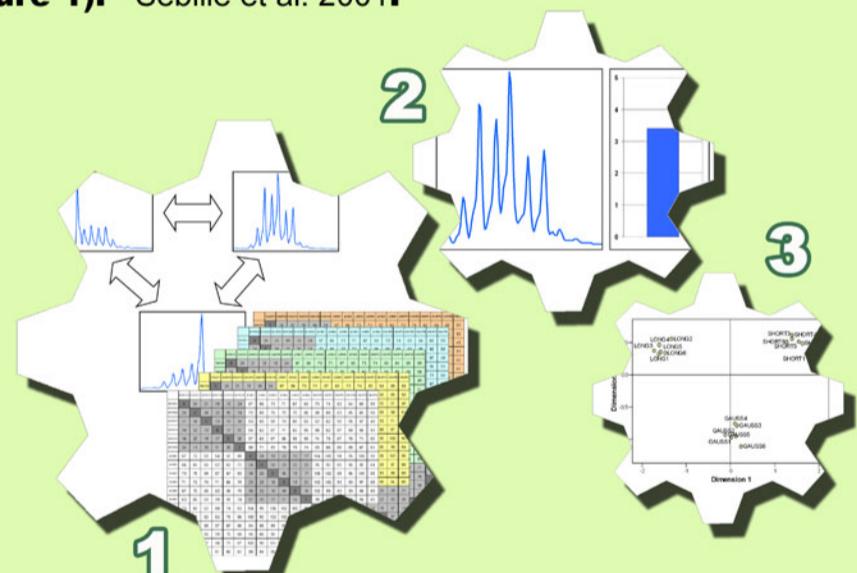


Figure 2: 3-step procedure to analyze the TcLandscape® data. The first step consists in calculating distances between CDR3 LD of all samples (1). Second, each CDR3 LD is weighted according to the importance of the quantity of transcript for the corresponding family (2). The third step uses an adapted factorial method to perform a data reduction and bi-plot representation (3).

results & discussion

Using this statistical method, the group of tolerant recipients and the group of patients with chronic rejection are well separated and illustrate a “descriptive and blind discrimination” (Figure 3). TOL patients are closely clustered except for one, whereas CR patients are widely dispersed according to the second axis. This reflects the heterogeneity of the CR patients compared to the high similarity of the TOL patients.

3.5 Risque de rejet chez des patients ayant une fonction stable du greffon

T cell repertoire analysis of stable kidney graft recipients for detection of low and high risk of chronic rejection.+

Patrick Miqueu, Marina Guillet, Magali Giral, Catherine Ruiz, Cécile Braudeau, Annaïck Pallier, Jean-Christophe Doré, Eric Thervet, Christophe Legendre, Maria P. Hernandez-Fuentes, Ligia Craciun, Pervinder Sagoo, Alain Le Moine, Birgit Sawitzki, Elvira Jimenez, Bettina Peters, Stephanie Chapman, Ian Roberts, Ruhena Sergeant, Rachel Hilton, Anthony Warrens, Michel Goldman, Hans-Dieter Volk, Uwe Janssen, Kathryn Wood, Robert I Lechler, El Mostafa Qannari, Véronique Sébille, Dominique Bertrand, Jean-Paul Soulillou and Sophie Brouard.

.Article en préparation (2008)

+ Analyse du répertoire T de patients transplantés rénaux présentant une fonction stable du greffon pour la détection de faible ou de fort risqué de rejet chronique

Cet article regroupe les résultats de la seconde étude comprenant 14 patients opérationnellement tolérants, 14 patients présentant des signes de rejet chronique, 14 individus sains et une cohorte de 200 patients ayant une fonction stable et sous immunosuppresseur.

T CELL REPERTOIRE ANALYSIS OF STABLE KIDNEY GRAFT RECIPIENTS FOR DETECTION OF LOW AND HIGH RISK OF CHRONIC REJECTION

Patrick Miqueu^{1,2}, Marina Guillet², Magali Giral¹, Catherine Ruiz², Cecile Braudeau¹, Annaïck Pallier¹, Jean-Christophe Doré³, Eric Thervet¹², Christophe Legendre¹², Maria P. Hernandez-Fuentes⁴, Ligia Craciun⁶, Pervinder Sagoo⁴, Alain Le Moine⁶, Birgit Sawitzki⁷, Elvira Jimenez⁴, Bettina Peters⁸, Stephanie Chapman⁹, Ian Roberts⁹, Ruhena Sergeant⁵, Rachel Hilton⁴, Anthony Warrens⁵, Michel Goldman⁶, Hans-Dieter Volk⁷, Uwe Janssen⁸, Kathryn Wood⁹, Robert I Lechler⁴, El Mostafa Qannari¹⁰, Véronique Sébille¹¹, Dominique Bertrand¹⁰, Jean-Paul Soulillou^{1*§} and Sophie Brouard^{1*}.

¹INSERM, U643, Nantes, F44000 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, F44000 France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France.

²TcLand S.A., Nantes, France;

³UMR 5154, CNRS/MNHN, Paris, France;

⁴Nephrology and Transplantation, King's College, London, United Kingdom;

⁵Immunology and Renal Medicine, Imperial College, London, United Kingdom;

⁶Institute for Medical Immunology, Université Libre de Bruxelles, Charleroi, Belgium;

⁷Institute of Medical Immunology, Charité University Medicine, Berlin, Germany;

⁸MACSmolecular Business Unit, Miltenyi Biotech GmbH, Cologne, Germany;

⁹Nuffield Dept of Surgery, Oxford University, Oxford, United Kingdom;

¹⁰UMR 112499, ENITIAA-INRA, Nantes, France;

¹¹Laboratoire de Biostatistiques, Faculté de Pharmacie, Nantes, France;

¹²Hôpital Saint-Louis, Paris, France.

* Both are senior authors.

§ Corresponding author: Jean-Paul Soulillou, INSERM U643, 30, Bd Jean Monnet, F-44093 Nantes cedex 1, FRANCE, Tel: +33.2.40.08.78.42, Fax: +33.2.40.08.74.11, e-mail:

jean-paul.soulillou@univ-nantes.fr

Keywords:

Transplantation, Tolerance, Chronic Rejection, TcLandscape, T cell Repertoire, TCR CDR3, statistical analysis, unsupervised analysis, biomarker

Abbreviations:

C : Component of the principal component analysis

CD : cluster of differentiation

CDR3-LD : complementarity determining region 3 - length distribution

CHR : chronic rejection

CMV : cytomegalovirus

EBV : Epstein-Barr virus

HEI : healthy individuals

IgG : Immunoglobulin G

IQR : inter-quartile range

MIS : patient with a stable function under minimal immunosuppression (corticosteroid)

PCA : principal component analysis

STA : patients with a stable graft function and under calcineurin inhibitor

STA-GH : STA patients involved in the “GenHomme” network

STA-IT : STA patients involved in the “Indices of Tolerance” network

STN : patients with a stable graft function without calcineurin inhibitor regimen

TcL : Tandscape

TCR : T cell receptor

TOL : drug-free operationally tolerant

V β : V genetic region of the TCR beta chain

Abstract

Banff 2005 humoral chronic rejection (C4d, HLA antibodies and graft glomerulopathy) remains a major cause of long-term graft failure; and currently, no treatment is available to reverse this process. Because the role of T cells has been well established in underlying alloreactivity mechanisms, we analyzed the T cell repertoire of a cohort of patients with a stable graft function for more than five years and under immunosuppression (n=229), and compared it with several reference groups: 1) patients with chronic rejection (n=14), 2) stable drug-free operationally tolerant recipients (n=14) and 3) healthy individuals (n=14). The length distribution and the amount of the CDR3 T Cell Receptor β chain transcripts were studied with the TcLandscape and a new unsupervised statistical analysis. We show that 46% of the patients with a stable graft function shared the moderately altered T cell repertoire of the stable operationally tolerant recipients. This matter is opposed to highly altered repertoires, found in 19% of the patients with a stable function, and whose profiles are similar to those of patients with chronic rejection and with a Banff grade III. These highly altered profiles are also correlated with a high CD8+/CD4+ T cells ratio and the presence of CMV IgG. All together, our results suggest that the TcLandscape typology could be a pertinent tool for the surveillance of recipients with a stable kidney graft function in order to identify patient at high to low risk of chronic failure.

Introduction

To prevent graft rejection following kidney transplantation, recipients have to take long-life immunosuppressors. Despite this treatment, the half life of a kidney graft has made only minor progress in the last two decades. Manifested by a gradual decrease in renal function associated with physiopathological lesions (Solez, Colvin et al. 2007), chronic rejection remains the major problem of late allograft loss (Ballet, Giral et al. 2006). The identification of biomarkers predictive of chronic rejection occurrence in patients with a stable graft function under immunosuppressive agents could be a valuable tool in order to treat infraclinic chronic rejection (Scherer, Krause et al. 2003). In contrast to the patients evolving towards chronic rejection, rare cases of kidney graft recipients who tolerate their graft despite interruption of immunosuppressors have been reported (Roussey-Kesler, Giral et al. 2006). Because T cells were shown to be involved in both chronic rejection and operational tolerance (Wood and Sakaguchi 2003), both immunological status of these two contrasted clinical situations have been studied at the T cell receptor (TCR) level. In a previous preliminary work, using the TcLandscape® technology (Sebille, Gagne et al. 2001), Brouard et al. showed that drug-free operational tolerant patients and patients with chronic rejection both displayed altered repertoire different from normal individuals (Brouard, Dupont et al. 2005). These results (Brouard, Dupont et al. 2005) and those of another team (Alvarez, Paris et al. 2004) have encouraged us to analyse the repertoire of a cohort of kidney graft recipients tested at distance of their graft, including 14 drug-free operationally tolerant patients, 14 patients with Banff 2005 humoral chronic rejection (C4d, antibodies and/or graft glomerulopathy). and 229 patients with a stable graft function under immunosuppression. Based on the differences that may exist between the repertoire of operationally tolerant patients and patients with Banff 2005 humoral chronic rejection, we develop new statistical methods to analyze the TcLandscape data in a dedicated and unsupervised

way in the hope to contribute to assess the immunological risk in patients with a stable graft function under current immunosuppressive regimen. These data drive potentially useful perspectives for the medical follow-up of patients with stable graft function under conventional immunosuppression.

Materials & Methods

Patients

Two hundred and seventy one patients were included in the study. Two hundred and ten patients have been recruited within the “GenHomme” project that implied the Nantes Institute of Transplantation, the Necker Hospital in Paris and the TcLand Company. Sixty-one additional patient were recruited in the framework of the “Indices of Tolerance” Network. The protocol of the study was approved by the Ethical Committee of the six Framework Programmes. All patients signed a written informed consent before inclusion.

Four different clinical groups were studied (Table 1):

Operationally tolerant patients (TOL, n=14) had a stable kidney graft function (Creatinemia < 150 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, Proteinuria < 1 g.24h $^{-1}$) and were without any immunosuppressive drugs for more than 1 year (mean drug-free duration = 8.3±5.7 years) at the time of blood test. Immunosuppressive treatment, including corticosteroids, was stopped due to non-compliance (n=11), post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD, n=1), calcineurin inhibitor toxicity (n=1) or cancer (n=1).

Chronic rejection (CHR, n=14) group was defined according to clinical and histological criteria (Colvin 2007; Solez, Colvin et al. 2007). All CHR patients had a progressive degradation of their renal function (Creatinemia > 150 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, Proteinuria > 1g.24h $^{-1}$). In addition, transplant renal biopsies from all CHR patients revealed histological signs of vascular chronic rejection at the blood test time (Banff 05 grade II or IIIb) with C4d deposition in 9 patients out of 14 and circulating anti-donor class II antibodies in 7 out of 14 patients.

Minimally immunosuppressed group (MIS, n=12) are patients with stable graft function under steroid monotherapy only (<10mg/day). Calcineurin inhibitors and CellCept® were removed mainly due to previous cancer or uncontrolled infectious disease.

Long-term stable group (n=217): patients also grafted since at least 5 years displaying stable kidney graft function under calcineurin inhibitor regimen (STA, n=209) or not (STN, n=8) associated with mycophenolate mofetil or azathioprine, and maintenance steroids. The STA cohort has been divided into 2 groups: 182 patients have been recruited within the “GenHomme” project and will be referred as STA-GH; 27 patients have been recruited in the framework of the “Indices of Tolerance” network and will be referred as STA-IT. The 27 STA-IT patients have been analyzed independently from the cohort of 182 STA-GH patients in order to validate the reproducibility of the TcLandscape data between various European Centers. For the STA-GH cohort, major clinical and biological parameters (issued from venous blood sampling), have been collected at the time of inclusion: pre-graft transfusion number, anti T PRA, anti B PRA, CD2 and CD3 percentages. In this article, we will focus on the percentages of CD8⁺ and CD4⁺ T cells (Mean = 30%±12 ; Mean = 44%±12) and the presence of CMV IgG and EBV IgG in blood, observed in 36% (65/182) and 54% (97/181) of the patients.

Finally, a group of Healthy individuals (HEI, n=14) with normal blood formula and no known infectious pathology for at least 6 months prior to the study.

T Cell Repertoire Analysis

Blood, collected in EDTA tubes, was obtained from a peripheral vein or arterio-venous fistula. Peripheral Blood Lymphocytes (PBL) were separated on a Ficoll layer (Eurobio, Les Ulis, France) and frozen in TRIzol® reagent (Invitrogen, Life technologies, California) for RNA extraction. Total RNA was reverse-transcribed using an Invitrogen cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Complementary DNA was amplified by PCR using couples of primers specific of each V β genes (Brouard, Dupont et al. 2005). The amplification products were then elongated and electrophoresed as previously indicated in order to separate the amplification products according to their length (Pannetier, Cochet et al. 1993). Two different devices have been used to perform the electrophoresis step: a gel sequencer Applied Biosystems 377 and a capillary

sequencer Applied 3730. The CDR3 profiles obtained were transformed into mathematical distributions and normalized so that the total area was equal to one. In parallel, the level of V β family transcripts was measured by real-time quantitative PCR and normalized by an housekeeping gene (HPRT). The CDR3 length distribution (CDR3-LD) are then combined with each normalized V β transcript amounts to obtain the TcLandscape® data as previously described (Guillet, Sebille et al. 2001; Sebille, Gagne et al. 2001).

TcLandscape Data Organization

To organize and make the data available for the analysis, the TcLandscape data were gathered in 271 matrices referred as $\mathbf{X}^{(1)}, \mathbf{X}^{(2)}, \dots, \mathbf{X}^{(k)}, \mathbf{X}^{(271)}$. A given table $\mathbf{X}^{(k)}$, dimensioned 26 x 13 (26 V β families x 13 CDR3 lengths), contains all results of the CDR3-LD analysis for the patient k . An element $x_{ij}^{(k)}$ of $\mathbf{X}^{(k)}$ indicates the frequency of transcripts of the j^{th} length in the i^{th} V β family for the patient k . A row $\mathbf{x}_{i \cdot}^{(k)}$ of $\mathbf{X}^{(k)}$ was thus the CDR3-LD of the i^{th} V β family. The normalized quantities of transcripts associated with each CDR3-LD were gathered in column-vectors $\mathbf{y}^{(1)}, \mathbf{y}^{(2)}, \dots, \mathbf{y}^{(k)}, \mathbf{y}^{(271)}$. An $y_i^{(k)}$ element indicates the quantity of transcripts associated with the i^{th} V β family for the patient k .

Kurtosis

There are many parameters or metrics that can be used to describe, and summarize with one value, the shape of the CDR3-LD. Indeed, the distribution of 13 length of CDR3 reflects different immunological situations and should be carefully analyze (Miqueu, Guillet et al. 2007). Kurtosis, a mathematical index, has been chosen to quantify the CDR3-LD diversity (Peggs, Verfuerth et al. 2003). The Kurtosis compares the amount of data in the tails with the amount of data in the central part of the distribution; it thus reflects the degree of “peakedness” of a distribution

(Pearson 1905)(Fig 1). This parameter is perfectly suitable for describing CDR3-LD with a monoclonal expansion.

Statistical TcLandscape Unsupervised Analysis

To explore the repertoire diversity, we developed a totally unsupervised statistical analysis method which combines the shape of the 26 V β CDR3-LD (Kurtosis) and their respective quantity of transcripts (Figure 1). First, each given CDR3-LD of each patient V β family ($\mathbf{x}_i^{(k)}$) was summarized by a unique value: its Kurtosis, noted u_{ik} . From all individual matrices $\mathbf{X}^{(1)}, \mathbf{X}^{(2)}, \dots, \mathbf{X}^{(k)}, \mathbf{X}^{(271)}$, it was then possible to build up a global matrix $\mathbf{U}=\{u_{ik}\}$ (with $i=1\dots26$; $k=1\dots271$). Kurtosis was normalized according to the sequencer used to obtain the CDR3-LD (median normalization). Second, to give a bigger influence to CDR3-LD associated to an important transcript amount than to CDR3-LD associated with small transcript amounts which may correspond to artefactual highly peaked CDR3-LD due to an insufficient number of transcripts, the information of shape, given by the value of the Kurtosis for each CDR3-LD (i.e u_{ik}) is weighted by the normalized quantity of V β transcripts ($y_i^{(k)}$). Third, Principal Component Analysis (PCA) is used on the $\mathbf{U.y}$ matrix to take into account both the CDR3-LD shape and the corresponding amount of transcripts. PCA is an exploratory multivariate statistical technique used to simplify complex data sets (Pearson 1905) and to provide a “projection” of such complexe data onto a reduced, easily visualized space. In our context, the coordinates of the patients on the axes, named component (C), define their positions in the factorial space. The distance between 2 patients is related to their TcLandscape similarity. According to this, when the TcLandscapes tend to be similar, the corresponding patients appear closely clustered. In contrast, high distance between patients suggests different V β gene expression. Due to the particular nature of these data (complex and large number of variables in comparison with the number of observations), we privileged a dedicated unsupervised technique rather than

supervised methods, such as discriminant analysis, to prevent leading to an overfitted, and thus unreliable predictive model. The data processing has been carried out in the Matlab environment (The Mathworks company) using the SAISIR package (Bertrand 2007).

Statistical tests

When data are not normally distributed median and inter-quartile range (IQR) are calculated. Statistical tests have been performed using SPSS 12.0 and data representation using PAST software (Palstat: Statistics for Palaeontologists and Palaeobiologists. JS Whalley, PD Ryan 1995) and Excel 2007 (Microsoft Corporation). All correlations are based on non parametric Spearman ρ and Kendall τ statistics for respectively continuous and ordinal variables. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were considered statistically significant at $p<0.01$. Bonferroni adjustment has been used for multiple group comparisons.

Results

Operationally tolerant and chronic rejection patients display different TCR repertoire usage

TcLandscape unsupervised statistical analysis (Figure 1) has been used to explore both the qualitative (Kurtosis of CDR3-LD) and quantitative (amount of V β transcripts) diversity of the repertoire of the TOL (n=14), CHR (n=14) and HEI (n=14) patients (Figure 2). On the three-dimensional factorial space obtained, the 42 patients are distributed based on their TcLandscape similarity. In accordance with our previous study (Brouard, Dupont et al. 2005), multiple comparisons indicate that TOL repertoire differs from the Gaussian repertoire of HEI ($p<0.05$) and that CHR differs significantly from TOL and HEI ($p<0.01$) and display the higher level of clonal CDR3-LD associated with high quantity of V β family transcripts. These observations are reinforced by the factorial analysis showing that TOL and CHR are not located in the same area and present divergences in their distribution in the factorial space (Mean Kurtosis TOL = -0.09 IQR = 1.70; CHR group, median Kurtosis CHR = 0.73 and IQR = 4.05). Whereas the TOL and HEI groups (Median Kurtosis HEI = -0.18, IQR = 0.94) are centered except for two TOL patients whose coordinates on C1, C2 and C3 are [0.06 0.31 0.22], [0.07 0.04 -0.23], the significant higher Kurtosis IQR of the CHR compared with TOL reflects a high heterogeneity of the TcLandscapes within the CHR group likely due to the presence of highly peaked CDR3-LD in several V β families according to the patient analyzed.

The repertoire of patients with stable kidney graft function follows a gradient running from a Gaussian to a highly altered TCR repertoire

In order to investigate the T cell repertoire of patients with a stable graft function, 229 patients under calcineurin inhibitor regimen (STA) (n=209) or not (STN) (n=8), and patients under

minimal immunosuppression (MIS) ($n=12$) have been analyzed. The same unsupervised statistical method has been used to position on a factorial plan the 229 TcLandscapes of patients with stable graft function, the TOL ($n=14$) and CHR ($n=14$) TcLandscapes. The widespread location of the patients with a stable graft function in the factorial map highlights the diversity of their T cell repertoire (Figure 3A). To better analyze this heterogeneity, a classification of the TcLandscape shapes was performed. The 182 patients enrolled within the GenHomme project (STA-GH subgroup) have been analyzed according to their coordinates on the axis C1, the component which carries most of the information of TcLandscape shapes. As observed on the segmented distribution of the C1 coordinate values of the 182 STA-GH, three major gaps are present in the distribution at the following C1 values: -0.03, 0.015 and 0.07 (dashed lines on Figure 3B). These 3 values of the C1 coordinate mark the boundaries of four classes of TcLandscapes which differ in term of TcLandscape shape, and allow defining four different “TcLandscape patterns”. A representative TcLandscape for each of the four classes is shown in Figure 3C. TcLandscape pattern 1 is composed of “Gaussian-like” V β CDR3-LD (Median Kurtosis $K_{Gr1}=-0.12$, IQR=1.45). TcLandscape pattern 2 and 3 are TcLandscapes with an increased level of V β CDR3-LD alterations (increased Kurtosis) compared to TcLandscape pattern 1 ($K_{Gr2}=0.43$, IQR=2.64, $K_{Gr3}=1.01$, IQR=4.34). TcLandscape pattern 4 is an altered TcLandscape with distinct “monoclonal-like” V β CDR3-LD ($K_{Gr4}=1.67$, IQR=6.88). Multiple group comparisons on Kurtosis show that the 4 TcLandscape classes are significantly different whereas no statistical differences have been observed on V β /HPRT ratios within the 4 different classes. According to the TcLandscape shape classification described (fig 3C), the repartition of the patients with a stable graft function within each TcLandscape class has been calculated (Figure 3B). Most of the STA-GH patients (45%) display a TcLandscape similar to the TcLandscape pattern 1 while 21%, 15% and 19% of the STA-GH patients respectively display a TcLandscape like TcLandscape pattern 2, 3 and 4 (Figure 3B and 4A). The analysis of the other

groups of patients with stable graft function (STA-IT, STN and MIS) shows no difference in term of repartition within the 4 TcLandscape classes (Figure 4A). This observation demonstrates that the samples obtained from the French network “GenHomme”, STA-GH, present the same TcLandscape patterns’ heterogeneity than the independent cohort of samples obtained from the multicentric European study “Indices of Tolerance”, STA-IT. Finally, the fact that no difference exist both between STN and STA and between STA and MIS suggest that calcineurin inhibitors do not significantly modify the T cell repertoire.

Correlations between the ratio of CD8⁺/CD4⁺ T cells, the presence of CMV IgG in blood and the TcLandscape shape of patients with stable graft function

To better understand the heterogeneity of the patients with stable kidney graft function, correlations between the TcLandscape shape and clinical/biological parameters were analyzed on the STA-GH cohort for whom all variables were available. Highly positive significant correlation exists between the PCA C1 coordinate and the ratio of CD8⁺/CD4⁺ T cells ($\rho=0.72$, $p<0.01$). This could also be illustrated by the fact that CD8⁺/CD4⁺ T cell ratios are statistically different between the TcLandscape classes (Figure 5). The presence of CMV IgG in the blood of the 182 STA-GH patients is also positively correlated with the TcLandscape shape ($\tau=0.34$, $p<0.01$). 36% of the STA-GH patients are CMV+, whereas 70% and 64% of respectively the TOL and CHR have peripheral CMV IgG. No correlation also exists between the CMV status of the CHR and the class of its TcLandscape. In figure 6A, the number of CD8⁺ T cells (Log normalized) is plotted with the CD8⁺/CD4⁺ T cell ratio for the 182 individuals of the STA-GH cohort. When decomposed according to the different TcLandscape classes (Figure 6B), it appears that a majority of individuals in TcLandscape class 1 have a low CD8⁺/CD4⁺ T cell ratio and a low amount of CD8+ T cells. Only 17% of these patients have peripheral CMV IgG, while 61% of the STA-GH patients in the grouped TcLandscape classes 3 and 4. Low correlations also exist

between the TcLandscape shape and the recipient ($\rho=0.36$, $p<0.01$) or the donor age ($\rho=0.36$, $p<0.01$). By contrast, no correlation has been revealed between the TcLandscape shape and the presence of anti-HLA antibodies, the quality of the graft function measured by the proteinuria and creatinemia level and the medical treatment in the cohort of patients with a stable function. There is also no correlation between the age of the recipient and the presence of CMV specific IgG. In summary, it thus appears that the CD8 $^{+}$ /CD4 $^{+}$ T cells ratio and the presence of CMV specific IgG are correlated with the TcLandscape shape of the 182 STA-GH patients, summarized by the PCA C1 coordinate.

The similarity of the T cell repertoire of STA patients with the one of CHR or TOL patients potentially defines STA patients with high risk or low risk of chronic rejection

Despite the larger number of TcLandscapes analyzed and shown in the Figure 3A (257) compared to Figure 2 (42), the global difference observed between the TOL and CHR patients in the figure 2 is confirmed in the figure 3A. Component 1 in Figure 3A globally signs the divergence between TOL and CHR. According to the TcLandscape shape classification, 64% (9 out of 14) of the TOL patients have a C1 coordinate beneath -0.03 and are similar to TcLandscape pattern 1 while no CHR patients is similar to this pattern (Figure 4B). In contrast, only 1 out of the 14 TOL patients is located in the TcLandscape class 3, while 65% of the CHR belongs to the TcLandscape classes 3 and 4. These data indicate that the TcLandscape shape classification thus may serve both to globally describe the T cell repertoire and to give an indication, for a patient with a defined stable function, on its similarity to the TOL or CHR cohort. When analyzing the localization of the patients with a stable kidney graft function (STA-GH and STA-IT combined), 46% of them have a TcLandscape similar to TcLandscape pattern 1 like 64% of the TOL. In contrast, 19% of patients with a stable kidney graft function have a

TcLandscape similar to TcLandscape pattern 4 like the CHR with a high Banff grade and anti-HLA antibodies. Indeed, a positive and highly significant correlation exist between the Banff score and the TcLandscape class of the CHR patients ($\tau=0.650$, $p=0.013$). 4/4 of the CHR with the TcLandscape pattern 4 have a Banff grade III. The proportion of anti-HLA antibody positive CHR in the various TcLandscape classes also demonstrates the relationship between the repertoire and the clinical status. Indeed, it appears that 75% of the CHR patients with the TcLandscape pattern 4 have anti-HLA antibodies, rather than 40% with the TcLandscape pattern 2 or 3. These indications show that grades of chronic rejection seem well described by the TcLandscape profiles, and suggest that STA patients with a TcLandscape pattern 4 (19%) may have a high risk of chronic rejection.

Discussion

In this article, we compare the TCR repertoire of a large cohort of 257 patients with stereotypic clinical typologies including patients with stable graft function for more than five years and patients characterized by two contrasted situations: operational tolerance and chronic rejection. In this approach, we aimed exploring whether repertoire alteration is associated with low or high immunological risk of rejection and how are distributed the patients with stable graft function. A special emphasis has been put on analyzing the data in a total unsupervised way in order to identify transcriptional patterns without any a priori (Boutros and Okey 2005). This approach led us to use the Kurtosis of the CDR3-LD, an unbiased metric which is pertinent to reveal peaked CDR3-LD and which gives an indication on the shape of the CDR3-LD by estimating the clonality of the distribution (Peggs, Verfuerth et al. 2003). Moreover, we designed a dedicated statistical approach to weight the importance of a CDR3-LD, according to its quantity of transcripts; avoiding then a separate analysis of these 2 kinds of data. Based on this dedicated unsupervised analysis of the TcLandscapes data, differences have been first confirmed in the repertoires of operationally tolerant recipients and patients with chronic rejection. We first confirm that the repertoire of operationally tolerant recipients and patients with chronic rejection is different and significantly more altered than the repertoire of healthy individuals (Brouard, Dupont et al. 2005). We then showed that a higher altered TCR repertoire is associated with a profile of rejection. These results enrich the vision of the repertoire of the operationally tolerant recipients as described in our previous study (Brouard, Dupont et al. 2005) and the study of Alvarez and al.(Alvarez, Opelz et al. 2005). The moderately altered and homogenous pattern of operationally tolerant patients, with 12 out of 14 patients closely clustered, is complemented by the previous observation on the phenotypical and functional CD8⁺/CD4⁺ T cells similarity between operationally tolerant recipients and healthy individuals (Baeten, Louis et al. 2006)

(Louis, Braudeau et al. 2006). In these previous studies, it appears that the operationally tolerant recipients have a similar number of CD8⁺CD28⁻ effector lymphocytes and peripheral CD25^{hi}CD4⁺ T cells, as healthy individuals (Baeten, Louis et al. 2006; Louis, Braudeau et al. 2006). These observations suggest that tolerance is defined as a state of “quiescence” of the transplanted organ, functioning without a destructive immune response (Waldmann and Cobbold 2001) and that operational tolerance can be associated with a “low immunological risk rejection”. In contrast, we demonstrate in this article that peaked distributions associated with quantity of transcripts, suggesting accumulation of oligoclonal or clonal expansions in different V β gene families, are in preference observed in patients with chronic rejection. Our results are in accordance with those of Matsutani and al. who reported that the levels of the skew in the TCR usage and clonal T-cell expansion were significantly greater in the recipients with a graft failure than in those with a stable graft function (Matsutani, Ohashi et al. 2003). These potential clonal expansions at different V β levels could be related to private alloimmune responses of patients against the graft; alloreactivity becoming the main cause of the CHR repertoire perturbation (Ballet, Giral et al. 2006). Global repertoire analysis, at a combined qualitative and quantitative level, is indeed pertinent to detect alloreactivity (Guillet, Sebille et al. 2001). The correlation between the Banff score and the shape of the TcLandscape reinforce this observation. Based on a simple blood sampling, this correlation, that should be tested on a larger cohort, suggests that the TcLandscape can indicate the magnitude of the clonal selection and define the “proximity” to a pattern of chronic rejection.

Importantly, T cell landscaping showed the heterogeneity of the pattern of repertoire alteration of stable kidney graft recipients, despite clinical stability and the effort made by clinicians to select the homogenous group of stable patients. As shown in two previous studies from our laboratories (Baeten, Louis et al. 2006) (Louis, Braudeau et al. 2006), such an heterogeneity was also found in the CD8⁺ and CD4⁺ T cell populations of these patients, independently of treatment and time of

sampling. Based on the shape of their TcLandscape (established by the C1 coordinate of the PCA in Fig 4A), we proposed a classification of the patients involved in the study, from class 1 to class 4, and correlated it according to the resemblance of their repertoire usage toward a profile of low risk (operational tolerance) or high risk (chronic rejection) of rejection. When analyzing the TcLandscape topologies with several biological and clinical factors, it appears that 45% of the STA-GH TcLandscapes are class 1, and among them, only 17% is CMV⁺ individuals; whereas 36% of the STA-GH is CMV⁺. As the opposite, 61% of the patients with a stable graft function, whose TcLandscapes are classes 3 and 4, is CMV⁺. Because the STA-GH cohort has been selected on its high graft function stability (up to 5 years), it maybe be not surprising that its CMV prevalence is relatively low (36% vs 71,8% for the overall Italian population (Natali, Valcavi et al. 1997)) due to the fact that CMV is associated with a poor long-term outcome (Reinke, Prosch et al. 1999; Rubin 2001). Second, the fact that patients with a stable function and associated with a low risk pattern (class 1) are predominantly CMV⁻ is coherent. We should also notice that, individuals with class 1 TcLandscape have the particularity to have low to moderate CD8⁺/CD4⁺ T cell ratios. As the opposite, the TcLandscape classes 3 and 4 patients with a stable graft function have higher CD8⁺/CD4⁺ T cell ratios which may be due to the CMV seropositivity of the patient. In fact, CMV is known to play a significant role in shaping the development of CD8+ T cells (Moss and Khan 2004). Associated to the fact that 65% of the CHR belongs to the TcLandscape classes 3 and 4 and has the highest Banff scores, these findings raise the hypothesis of a potential cross-reactivity of the CD8⁺ T cells of the classes 3 and 4 patients with a stable graft function with CMV and donor antigens. Brehm et al. has shown that memory CD8⁺ T cells generated in response to viral infections, such as CMV, cross-react with specific allogeneic antigens (Brehm, Markees et al. 2003). Moreover, Gamadia et al. also shows evidence of cross-reactivity of CMV specific CD8⁺ T cells to allo-major histocompatibility complex class I molecules (Gamadia, Remmerswaal et al. 2004). We may face then 2 situations for patients with

a stable graft function: CMV⁻ patients with “operational tolerant-like” TcLandscape associated with a low CD8⁺/CD4⁺ T cell ratio and CMV⁺ patients with “chronic rejection-like” TcLandscape associated with a high CD8⁺/CD4⁺ T cell ratio. Currently, the CD8⁺ nature of the T cells, responsible of the expansions that sign classes 3 and 4 TcLandscape shapes, need to be confirmed, like the potential cross-reactivity of these cells with both CMV and donor antigen.

The moderate correlation between the donor age and the perturbation of the TcLandscape for the patients with stable graft function is also of interest since donor age is a major progression factors of chronic rejection (Joosten, Sijpkens et al. 2005). As shown by Halloran et al. (Halloran, Melk et al. 1999) and also recently suggested in a rat model (Reutzel-Selke, Jurisch et al. 2007), donor age increased T-cell alloreactivity and accelerates chronic graft failure (Halloran, Melk et al. 1999) (Oppenheimer, Aljama et al. 2004; Giral, Nguyen et al. 2005).

Patients with a stable graft function and with a TcLandscape pattern 4 seem to cumulate indices of a nearby chronic rejection and may have a higher risk of chronic rejection than the patients with a resting immunological repertoire. In contrast, no correlation is found with creatinemia/proteinuria or anti-HLA antibodies. Renal function indicators, such as creatinemia and proteinuria are not informative because they were criteria of enrolment. Absence of correlation between the presence of anti-HLA antibodies and the perturbed TcLandscapes is the more surprising, according to the finding of Terasaki et al. (Terasaki and Ozawa 2005) where de novo synthesis of donor-specific antibodies at 2 years is predictive of graft loss. Anti-HLA antibodies is, indeed, a good marker of potential graft failure, therefore, our cohort differs significantly from the cohort of Terasaki et al. We recruited well established patients with stable graft function, having a good renal function for at least 5 years, who have already gone through the risky immediate pre-transplantation period and whose characteristics are similar to the ones described by Hourmant et al. (Hourmant, Cesbron-Gautier et al. 2005).

All these results and correlations suggest that the TcLandscape may be a useful tool to monitor the follow-up of graft recipient under immunosuppressors. In fact, it is possible that the subpopulation of patients with stable graft function with TcLandscape, classified in TcLandscape class 3 and 4, are at a higher risk of chronic rejection. We could also say that CMV⁻ patient with a stable function and with a class 1 TcLandscape may have a better prognostic than CMV⁺ patient with a stable function and with a class 3 or 4 TcLandscape. Biopsies should be done in preference to these last patients for detection of early chronic change (Colvin 2003).

The TcLandscape, as a non invasive method, could be a valuable predictor of late renal allograft failure in patient with a stable function. Prognosis of chronic rejection would be still important for such an advanced time point in the transplant history and for this apparently highly stable population where other clinical parameters are still in the normal postoperative range.

Acknowledgments

We would like to thank the 5th PCRDT, the French Ministry of Research, which labeled the GenHomme project, the Hospital of Nantes and the TcLand Company for their financial support; the Indices of Tolerance (www.transplant-tolerance.org.uk) and Joanna Ashton-Chess manuscript reviewing.

Tables and Figures

Table 1: Clinical and biological characteristics of the cohort of 271 patients. TOL, drug-free operationally kidney graft recipients; CHR, patients with a chronic rejection of their kidney graft; MIS, patients with a stable graft function under minimal immunosuppression; STA, patients with a stable graft function under calcineurin inhibitor. This group comprises patients from the “GenHomme” framework (STA-GH) and from the “Indice of Tolerance” framework (STA-IT). STN, patients with a stable graft function without calcineurin inhibitor. HEI, Healthy Volunteers. Values are mean \pm SD for continuous variables or number of patients (%) for categorical variables. $^{\#}$ indicates 1 missing data, $^{\$}$ indicates 2 missing data, * indicates more than 2 missing data.

Table 1

	TOL (N=14)	CHR (N=14)	MIS (N=12)	STA-IT (N=27)	STA (N=182)	STA-GH (N=182)	STN (N=8)	HEI (N=14)
Age (years)	48 ± 15	50 ± 17	50 ± 12	45 ± 13	53 ± 14	51 ± 8	31 ± 8	31 ± 8
Gender (male)	10 (71)	6 (43)	8 (67)	15 (56)	111 (61)	5 (63)	5 (36)	-
CMV status (%)	7 (70) #	9 (64)	2 (66) #	13 (59) #	65 (36) *	-	-	-
Time btw sampling and Tx (years)	17 ± 10	8 ± 5	15 ± 7	8 ± 4	9 ± 4	25 ± 2	-	-
Creatinemia (μmol.l⁻¹)	108 ± 24	297 ± 141	117 ± 33	120 ± 27	118 ± 31	104 ± 26	-	-
Proteinuria > 1 g.24h⁻¹ (%)	2 (14)	12 (92) #	2 (17)	3 (11)	0 (0)	0 (0)	-	-
Banff grade	-	2.3 ± 0.8 #	-	-	-	-	-	-
C4d staining (%)	-	9 (64)	-	-	-	-	-	-
Anti-HLA Class I and/or Class II Antibodies (%)	3 (23) #	7 (50)	3 (25)	6 (22)	19 (12) *	4 (50)	-	-
<i>Donor</i>								
Donor age (years)	29 ± 12 *	45 ± 14	25 ± 13 *	42 ± 13	36 ± 15 *	43 ± 7 #	-	-
Donor gender (male)	8 (90) *	7 (50)	5 (83) *	15 (56)	120 (75) *	2 (29) #	-	-
Number of total HLA mismatches (A,B, DR)	2.5 ± 1.2	2.9 ± 1.8	2.9 ± 1.4	2.5 ± 1.5	3.4 ± 1.4	1.4 ± 1.3	-	-
<i>Medical Treatment</i>								
CNI - Tacrolimus, Cyclosporine A (%)	0 (0)	14 (100)	0 (0)	25 (100) §	182 (100)	0 (0) #	-	-
Corticosteroid - Prednisone (%)	0 (0)	8 (57)	12 (100)	11 (44) §	42 (23)	6 (86) #	-	-
MMF - CellCept (%)	0 (0)	6 (43)	0 (0)	9 (36) §	87 (48)	0 (0) #	-	-
Azathioprine (%)	0 (0)	7 (1)	1 (8)	13 (52) §	50 (28)	6 (86) #	-	-

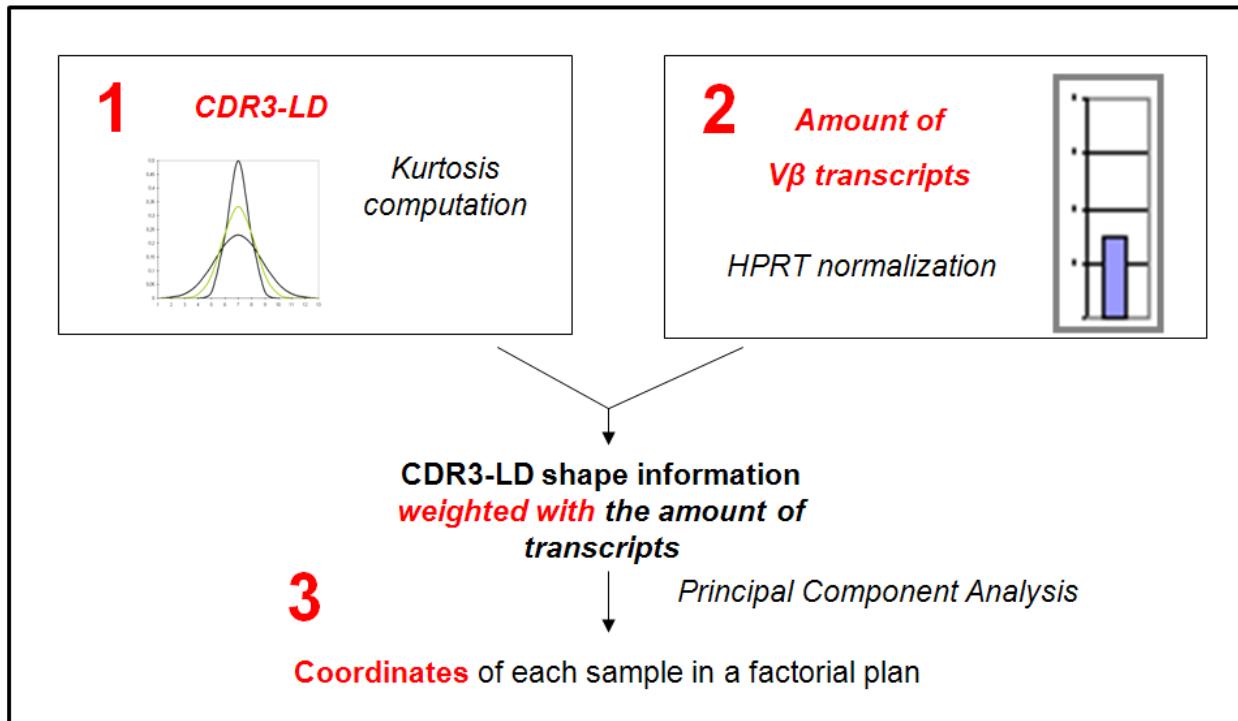


Figure 1: 3-step procedure to analyze the TcLandscape data. The first step consists in calculating Kurtosis for all CDR3-LD of all samples (1). Second, each CDR3-LD of each sample is weighted according to the quantity of transcript for the corresponding family (2). The third step uses a factorial method to perform a data reduction and plot representation (3).

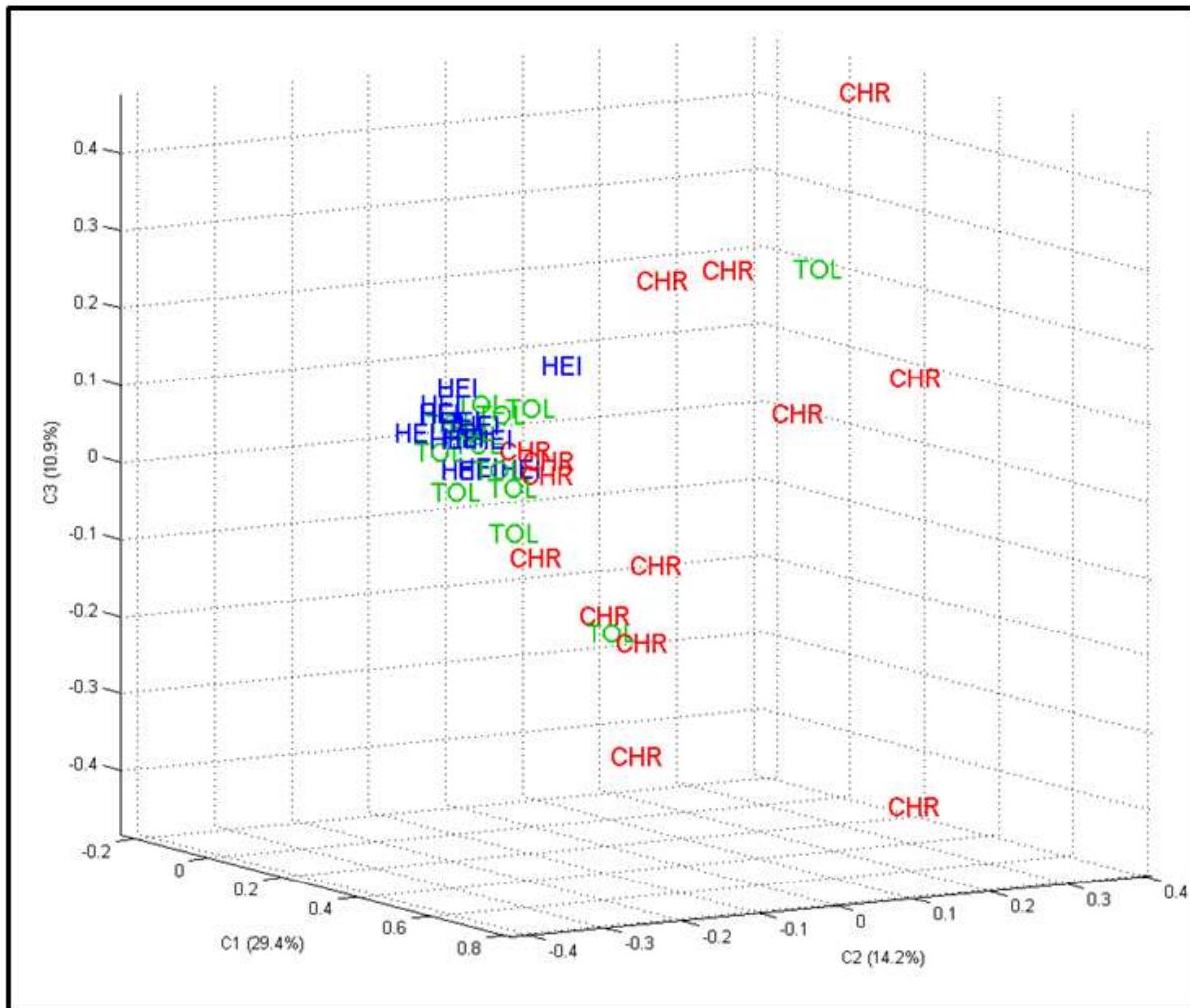
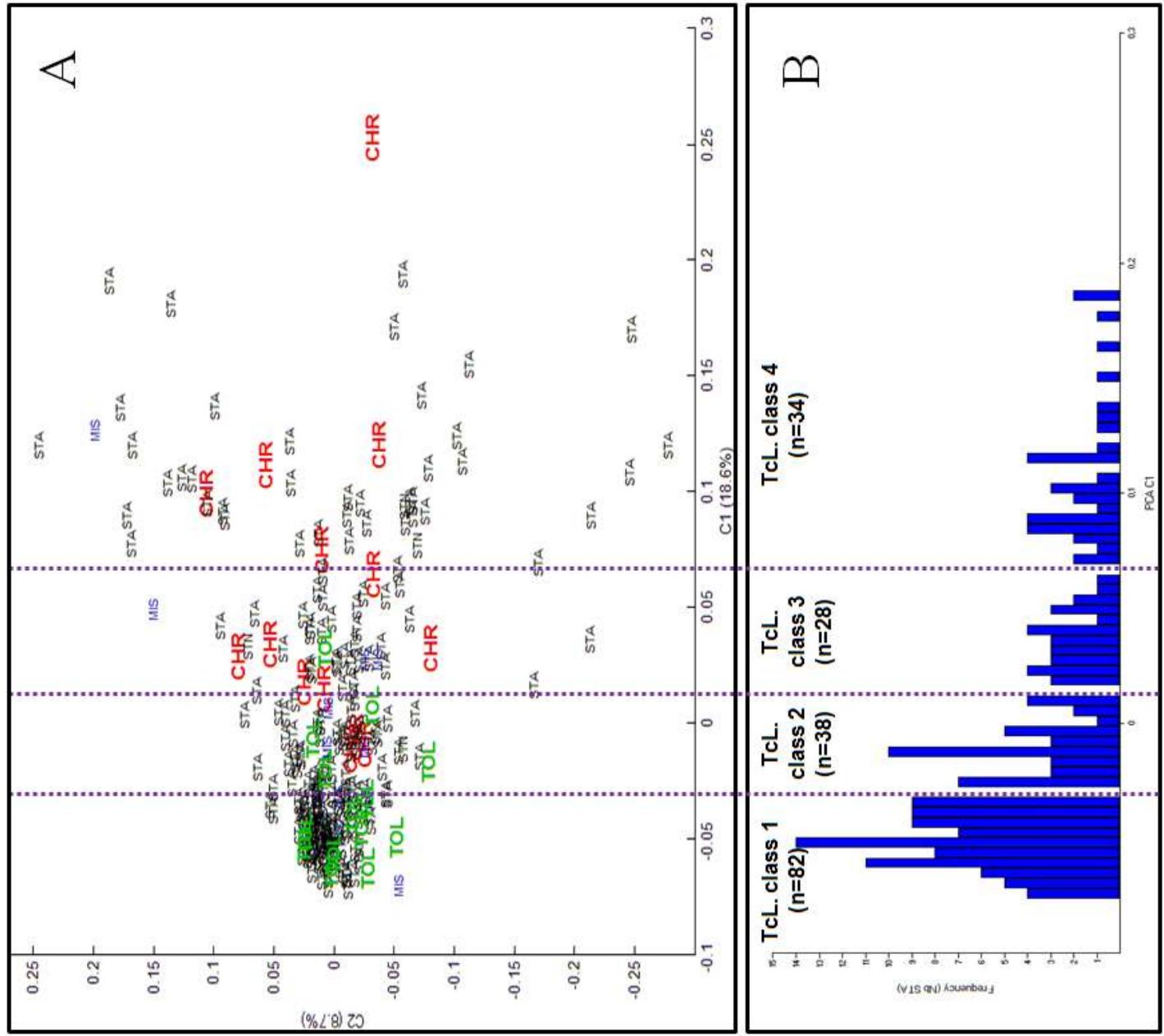


Figure 2: Principal Component Analysis of 42 TcLandscapes: TOL (n=14, green), CHR (n=14, red) and HEI (n=14, blue). PCA allows visualizing the multidimensional data set of 42 TcLandscapes in a 3 dimension factorial map. 54 % of the total variance is held by the 3 first components: C1, C2 and C3.

Figure 3: **A:** Principal Component Analysis of the 257 TcLandscapes: STA (n=209 [182 STA-GH + 27 STA-IT] black), STN (n=8, black), MIS (n=12, blue), TOL (n=14, green) and CHR (n=14, red) 27.3% of the variance is explained by components C1 (18.6%) and C2 (8.7%). **B:** Distribution of the values of the component 1 of the PCA (C1) coordinate of the STA-GH. According to the observed segmentation of the distribution of the coordinates of the 182 STA-GH on the C1 axis, 4 classes of TcLandscapes have been determined. Samples for which C1 coordinate is inferior to -0.03 belong to TcLandscape class 1. TcLandscape class 2 is defined by the C1 value interval [-0.03; 0.015[, TcLandscape class 3 the respective C1 value interval [0.015; 0.07[, Samples for which $C1 \geq 0.07$ belong to TcLandscape class 4 **C:** Examples of TcLandscapes of STA-GH patient for each of the 4 TcLandscape classes.

Fig 3



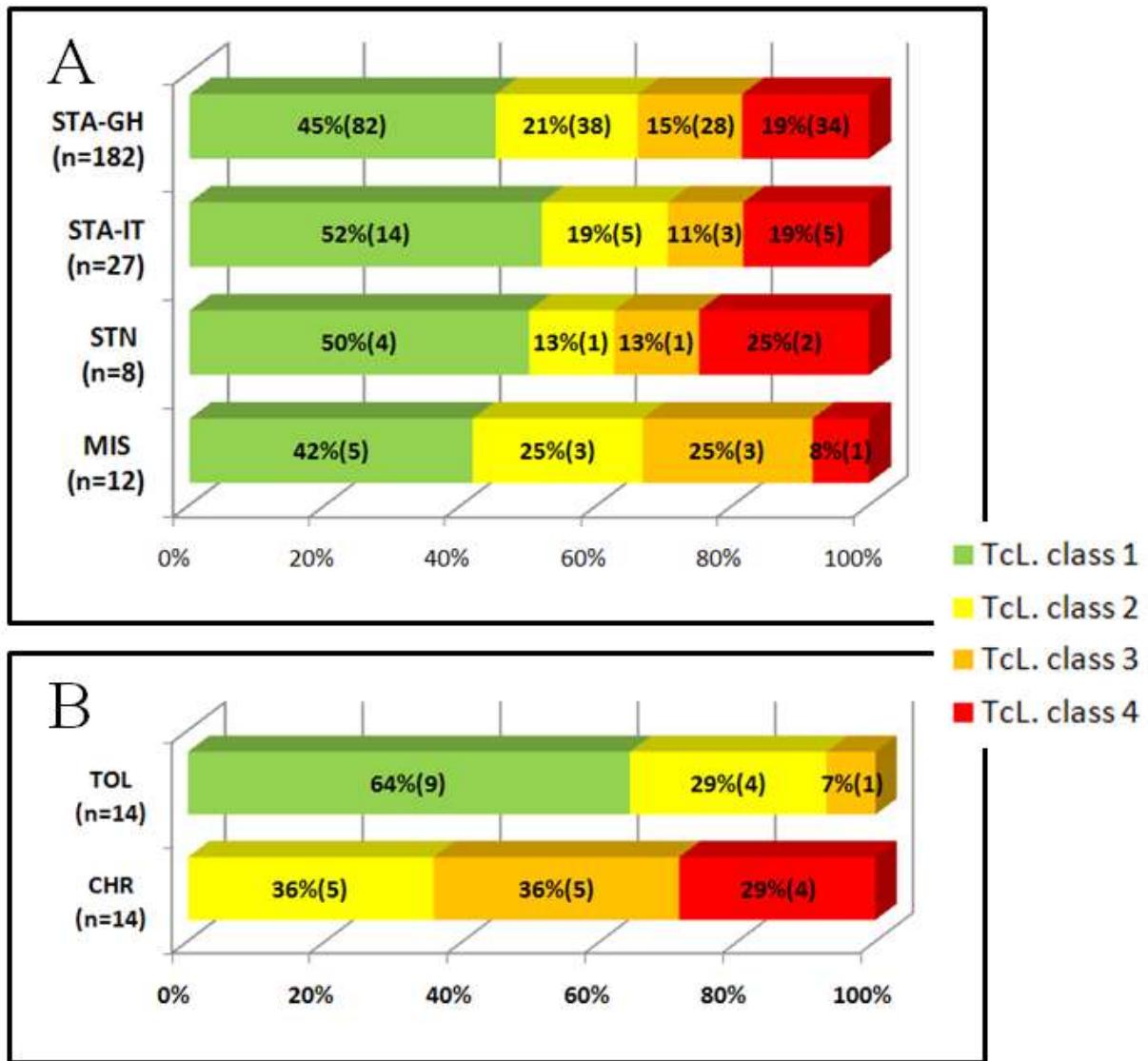


Figure 4: Percentages and numbers of patients of the different clinical groups belonging to the 4 different TcLandscape class based on their respective PCA C1 coordinate. **A:** Stable kidney graft function patients repartition. **B :** TOL and CHR repartition.

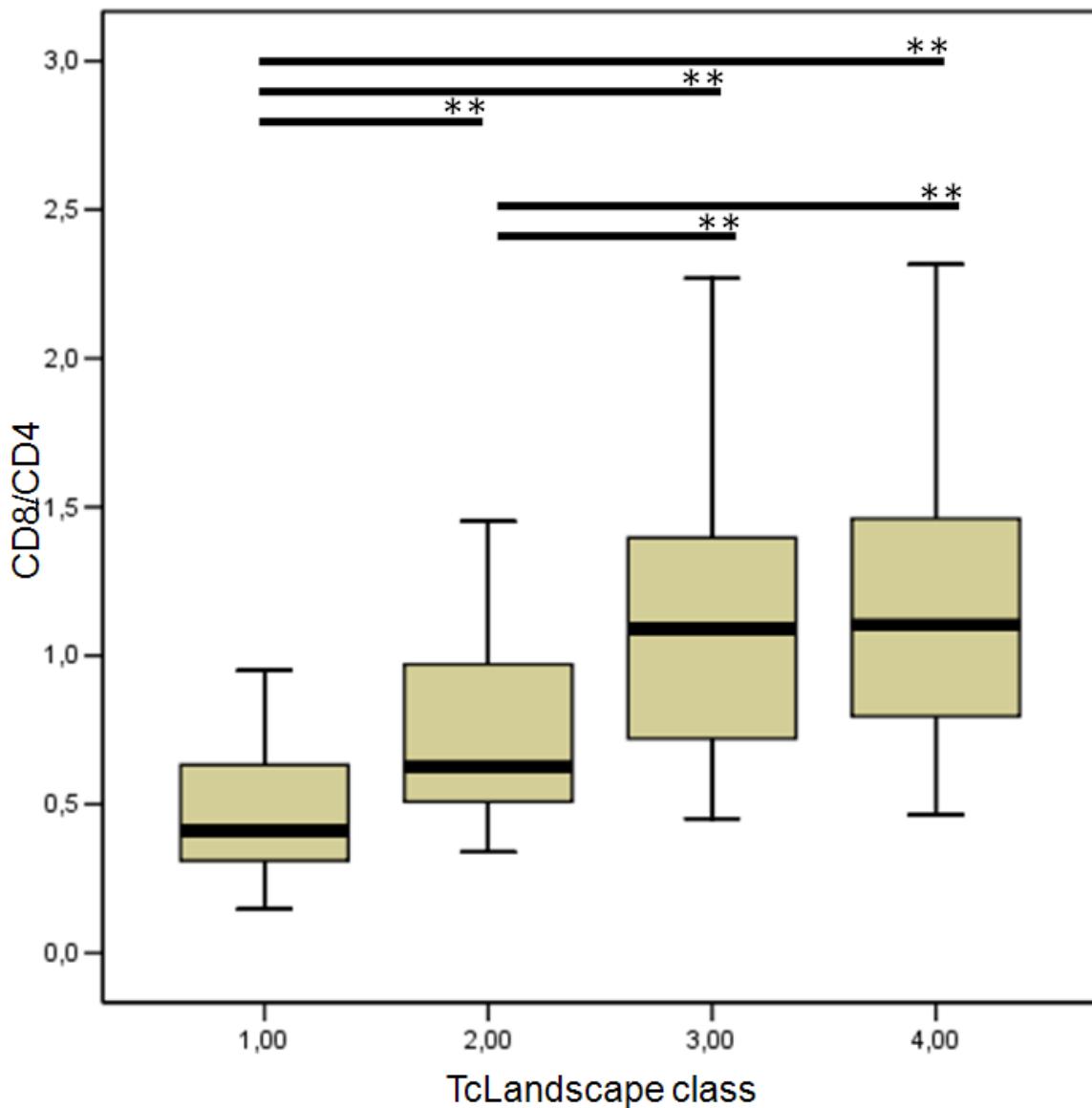


Figure 5: Distributions of the $\text{CD8}^+/\text{CD4}^+$ T cell ratios of the STA-GH individuals, according to their TcLandscape class (box and whisker plot). Statistical differences exist between TcLandscape class 1 and TcLandscape class 2, 3 and 4; and TcLandscape class 2 with TcLandscape class 3 and 4 ($p<0.01$).

Figure 6: Relationship between the CD8⁺/CD4⁺ T cell ratios, the absolute number of CD8⁺ T cells (log normalized) and the CMV seropositivity of the patients of the STA-GH cohort. (A) All individuals are represented on the same graph. (B) The individuals are devised according to their TcLandscape (TcL) class. The percentage of CMV⁺ individuals is noticed in the top right corner. Green circles depict CMV⁻ individuals, red circles CMV⁺ ones.

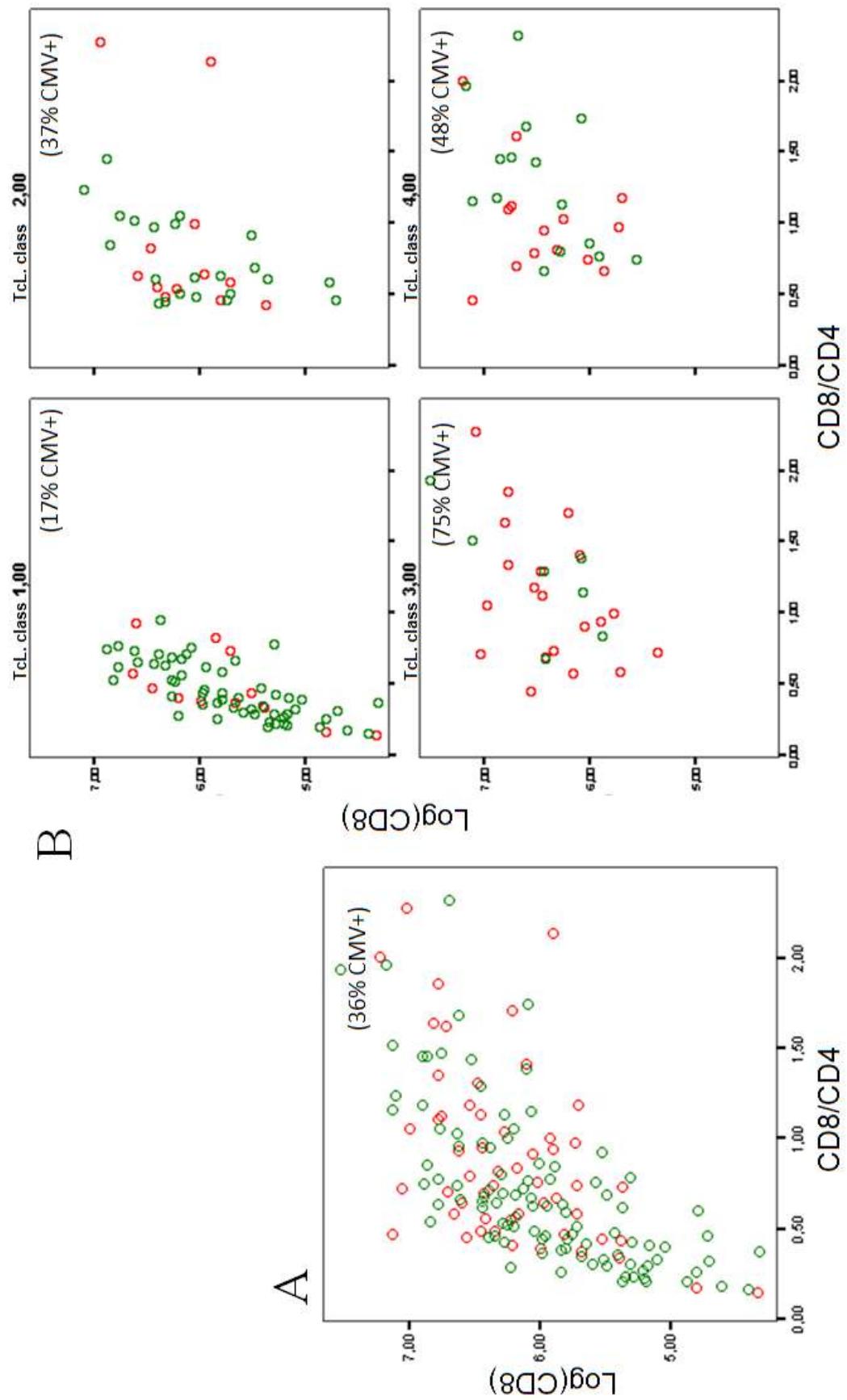


Fig 6

Bibliography

- Alvarez, C. M., G. Opelz, et al. (2005). "Evaluation of T-cell receptor repertoires in patients with long-term renal allograft survival." *Am J Transplant* **5**(4 Pt 1): 746-56.
- Alvarez, C. M., S. C. Paris, et al. (2004). "Kidney transplant patients with long-term graft survival have altered expression of molecules associated with T-cell activation." *Transplantation* **78**(10): 1541-7.
- Baeten, D., S. Louis, et al. (2006). "Phenotypically and functionally distinct CD8+ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients." *J Am Soc Nephrol* **17**(1): 294-304.
- Ballet, C., M. Giral, et al. (2006). "Chronic rejection of human kidney allografts." *Expert Review of Clinical Immunology* **2**(3): 393-402.
- Bertrand, D. (2007). "SAISIR: Package of procedures devoted to chemometrics in the Matlab environment." *D. Bertrand, Unité de Sensométrie et de Chimiométrie, ENITIAA-INRA, Nantes (France)*.
- Boutros, P. C. and A. B. Okey (2005). "Unsupervised pattern recognition: an introduction to the whys and wherefores of clustering microarray data." *Brief Bioinform* **6**(4): 331-43.
- Brehm, M. A., T. G. Markees, et al. (2003). "Direct visualization of cross-reactive effector and memory allo-specific CD8 T cells generated in response to viral infections." *J Immunol* **170**(8): 4077-86.
- Brouard, S., A. Dupont, et al. (2005). "Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation." *Am J Transplant* **5**(2): 330-40.
- Colvin, R. B. (2003). "Chronic allograft nephropathy." *N Engl J Med* **349**(24): 2288-90.
- Colvin, R. B. (2007). "Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis." *J Am Soc Nephrol* **18**(4): 1046-56.
- Gamadia, L. E., E. B. Remmerswaal, et al. (2004). "Cross-reactivity of cytomegalovirus-specific CD8+ T cells to allo-major histocompatibility complex class I molecules." *Transplantation* **77**(12): 1879-85.
- Giral, M., J. M. Nguyen, et al. (2005). "Impact of graft mass on the clinical outcome of kidney transplants." *J Am Soc Nephrol* **16**(1): 261-8.
- Guillet, M., F. Sebille, et al. (2001). "TCR usage in naive and committed alloreactive cells: implications for the understanding of TCR biases in transplantation." *Curr Opin Immunol* **13**(5): 566-71.
- Halloran, P. F., A. Melk, et al. (1999). "Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence." *J Am Soc Nephrol* **10**(1): 167-81.
- Hourmant, M., A. Cesbron-Gautier, et al. (2005). "Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation." *J Am Soc Nephrol* **16**(9): 2804-12.
- Joosten, S. A., Y. W. Sijpkens, et al. (2005). "Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations." *Kidney Int* **68**(1): 1-13.
- Louis, S., C. Braudeau, et al. (2006). "Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance." *Transplantation* **81**(3): 398-407.
- Matsutani, T., Y. Ohashi, et al. (2003). "Skew in T-cell receptor usage and clonal T-cell expansion in patients with chronic rejection of transplanted kidneys." *Transplantation* **75**(3): 398-407.
- Miqueu, P., M. Guillet, et al. (2007). "Statistical analysis of CDR3 length distributions for the assessment of T and B cell repertoire biases." *Mol Immunol* **44**(6): 1057-1064.

- Moss, P. and N. Khan (2004). "CD8(+) T-cell immunity to cytomegalovirus." *Hum Immunol* **65**(5): 456-64.
- Natali, A., P. Valcavi, et al. (1997). "Cytomegalovirus infection in an Italian population: antibody prevalence, virus excretion and maternal transmission." *New Microbiol* **20**(2): 123-33.
- Oppenheimer, F., P. Aljama, et al. (2004). "The impact of donor age on the results of renal transplantation." *Nephrol Dial Transplant* **19 Suppl 3**: iii11-5.
- Pannetier, C., M. Cochet, et al. (1993). "The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(9): 4319-23.
- Pearson, K. (1905). "Das Fehlergesetz und seine Verallgemeinerungen durch Fechner und Pearson." *Biometrika* **4**: 169-212.
- Peggs, K. S., S. Verfuerth, et al. (2003). "Assessing diversity: immune reconstitution and T-cell receptor BV spectratype analysis following stem cell transplantation." *Br J Haematol* **120**(1): 154-65.
- Reinke, P., S. Prosch, et al. (1999). "Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients." *Transpl Infect Dis* **1**(3): 157-64.
- Reutzel-Selke, A., A. Jurisch, et al. (2007). "Donor age intensifies the early immune response after transplantation." *Kidney Int* **71**(7): 629-36.
- Roussey-Kesler, G., M. Giral, et al. (2006). "Clinical operational tolerance after kidney transplantation." *Am J Transplant* **6**(4): 736-46.
- Rubin, R. H. (2001). "Cytomegalovirus in solid organ transplantation." *Transplant Infectious Disease* **3**(s 2): 1-5.
- Scherer, A., A. Krause, et al. (2003). "Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies." *Transplantation* **75**(8): 1323-30.
- Sebille, F., K. Gagne, et al. (2001). "Direct recognition of foreign MHC determinants by naive T cells mobilizes specific Vbeta families without skewing of the complementarity-determining region 3 length distribution." *J Immunol* **167**(6): 3082-8.
- Solez, K., R. B. Colvin, et al. (2007). "Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN')." *Am J Transplant* **7**(3): 518-26.
- Terasaki, P. I. and M. Ozawa (2005). "Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial." *Transplantation* **80**(9): 1194-7.
- Waldmann, H. and S. Cobbold (2001). "Regulating the immune response to transplants. a role for CD4+ regulatory cells?" *Immunity* **14**(4): 399-406.
- Wood, K. J. and S. Sakaguchi (2003). "Regulatory T cells in transplantation tolerance." *Nat Rev Immunol* **3**(3): 199-210.

3.6 Résumé et Discussion

Depuis la publication des résultats publiés par Brouard *et al.* en 2005, le développement de deux nouvelles méthodes statistiques non supervisées, utilisées sur deux jeux de données plus conséquents, a permis de renforcer et d'apporter des informations complémentaires sur les résultats initialement obtenus (Brouard *et al.*, 2005).

En ce qui concerne les résultats présentés au World Transplantation Congress 2006 (Miqueu *et al.*, 2006), la méthode des comparaisons par paires est une méthode exploratoire non supervisée qui convient au nombre de sujets de l'étude à ce stade : six patients opérationnellement tolérants et neuf patients présentant des signes de rejet chronique. En utilisant de manière conjuguée les CDR3 LD et les quantités de transcrits, cette approche a permis de mettre en évidence, pour la première fois, l'homogénéité des patients opérationnellement tolérants du point de vue de leur TcLandscape (cluster). La séparation spatiale des groupes de patients opérationnellement tolérants et de patients présentant des signes de rejet chronique, sur le plan factoriel, a reflété la différence de leur répertoire T respectif. Toutefois, aucune interprétation immunologique de cette différence n'avait été avancée à ce stade, la méthode des comparaisons par paires ne donnant pas d'information sur la forme des distributions. Aussi, l'élimination du groupe de référence (une des caractéristiques de la méthode, voir § 1.1.1.2) n'a pas permis de confronter les répertoires des patients opérationnellement tolérants à ceux des individus sains.

Selon l'article de Brouard *et al.* publié en 2005, la signature de la tolérance opérationnelle semble liée à la présence d'expansions clonales (Brouard *et al.*, 2005). Or, grâce au développement de l'approche « features » utilisant comme nouvel indice, la kurtosis pondérée par la quantité de transcrits, cette signature est désormais mieux caractérisée. En effet, un nouveau recrutement dans le cadre du réseau européen « Indices of Tolerance » a porté la cohorte à quatorze patients opérationnellement tolérants, quatorze patients atteints de rejet chronique et quatorze individus sains. Douze des quatorze patients opérationnellement tolérants présentent un répertoire T avec des distributions relativement gaussiennes, sans expansion clonale particulière. Cette divergence est probablement due à la cohorte de petite taille ($n=5$) utilisée en 2005 et à l'altération probable de deux échantillons suite à un problème de décongélation. La signature de la tolérance

opérationnelle mise en évidence dans notre article en préparation ne serait pas liée à la présence d'expansions clonales caractéristiques.

Cette signature T n'est pas surprenante en raison des profils transcriptionnels de cytokines déjà obtenus en 2005 sur les cellules T triées des patients opérationnellement tolérants (Brouard *et al.*, 2005). En effet, aucune accumulation de transcrits des cytokines IL10, IL2, IL13, IFN γ chez les patients opérationnellement tolérants n'a été observée suggérant une réponse T plus faible que chez les patients atteints de rejet chronique et similaire à celle des individus sains. Plus récemment, ces résultats ont été confirmés grâce à une analyse par puces à ADN où 90% des cytokines pro-inflammatoires étaient réduites chez les patients opérationnellement tolérants (Brouard *et al.*, 2007). Les TcLandscapes et le niveau d'expression des cytokines semblent indiquer que la tolérance opérationnelle serait liée à un phénomène de quiescence immunitaire qui pourrait impliquer une ignorance de la greffe (Lakkis *et al.*, 2000).

Concernant les patients atteints de rejet chronique, la présence de clones fortement accumulés est cohérente avec les résultats obtenus en 2005 (Brouard *et al.*, 2005) ainsi qu'avec ceux d'autres études chez l'Homme (Matsutani *et al.*, 2003) (Obata *et al.*, 2004) et dans les modèles animaux (Gagne *et al.*, 2000). L'hypothèse selon laquelle ces clones pourraient être alloréactifs, c'est-à-dire dirigés contre le greffon, a été discutée dans l'article en préparation, mais reste à démontrer. La corrélation positive entre les typologies de TcLandscapes et le score Banff illustre la pertinence du TcLandscape comme un biomarqueur potentiel du stade du rejet chronique.

Le plus grand groupe de patients transplantés analysé dans cette étude, est la cohorte de 200 patients avec une fonction stable du greffon. Parmi les critères d'inclusion, les patients devaient avoir reçu une 1^{ère} greffe de rein depuis au moins cinq ans, n'avoir jamais fait d'épisode de rejet durant leur suivi, avoir une bonne compliance thérapeutique, être sous traitement immunosuppresseur (anti-calcineurines avec ou sans stéroïdes), et avoir une fonction rénale stable (i.e. : $\pm 25\%$ de la valeur moyenne de l'année qui précède l'inclusion) : clearance calculée selon la formule de Nankivell supérieure ou égale à 40 ml/min et protéinurie des 24 heures inférieure ou égale à 1g/jour au moment de l'inclusion. Malgré cette relative exigence des critères cliniques, une grande hétérogénéité caractérise ce

groupe du point de vue des analyses TcLandscapes. La population des patients avec une fonction rénale stable a été stratifiée et décomposée en quatre classes, selon la forme générale du TcLandscape. De plus, comparés aux répertoires des patients opérationnellement tolérants et des patients présentant des signes de rejet chronique, les TcLandscapes des patients avec une fonction rénale stable ont été associés à une signature allant du faible risque de rejet (classe 1) au fort risque de rejet (classe 3-4). L'analyse des corrélations entre les TcLandscapes et certains paramètres biologiques et cliniques pourrait expliquer la diversité des TcLandscapes des patients avec une fonction stable de leur greffon. En effet, le ratio des cellules T CD8⁺/CD4⁺ et la présence d'IgG anti-CMV corrélerent significativement et positivement avec le TcLandscape. Il apparaît, en effet, que les patients ayant une fonction stable dont le TcLandscape est très proche de celui des patients opérationnellement tolérants (classe 1) ont un faible ratio de cellules T CD8⁺/CD4⁺, dû pour moitié à un faible nombre de cellules CD8⁺. De plus, seulement 17% de ces individus ont des anticorps anti-CMV. Cette faible proportion, par rapport à la prévalence dans la population normale (autour des 70% (Natali *et al.*, 1997)), pourrait indiquer que ces patients auraient un faible risque de développer un rejet chronique ; le CMV étant un facteur de risque connu du rejet de greffe (Reinke *et al.*, 1999; Rubin, 2001). A l'inverse, le groupe de patients ayant un TcLandscape classé 3-4 a un fort ratio de cellules T CD8⁺/CD4⁺ et la présence d'anticorps anti-CMV, dans le sang. Comme l'ont souligné Moss *et al.*, les antigènes les plus immunodominants reconnus par l'homme sont portés par le CMV ; ils stimulent très fortement les réponses des cellules T CD8⁺ (Moss et Khan, 2004). La conjugaison des facteurs « ratio de cellules T CD8⁺/CD4⁺ » et « présence de CMV », associée à la similitude des profils TcLandscape de ces patients ayant une fonction stable avec ceux des patients présentant un rejet chronique, pourrait indiquer que les cellules T CD8⁺ de ces patients soient réactives au CMV et induiraient une réponse contre le greffon par le biais d'un phénomène de réaction croisée (Brehm *et al.*, 2003; Gamadia *et al.*, 2004). Ces patients devraient ainsi être classés comme ayant un fort risque de rejet.

De plus, il est apparaît que la proportion des patients stables ressemblant aux patients opérationnellement tolérants, par rapport aux patients en rejet chronique, est de 46%. Comparé au 20% de patients potentiellement opérationnellement tolérant en greffe de foie (20% (Martinez-Llordella *et al.*, 2007)), le pourcentage semble trop important, bien

qu'aucune estimation n'existe en greffe de rein (Ashton-Chess *et al.*, 2006). On notera que les critères d'inclusion ont vraisemblablement participé à la sélection de candidats, particulièrement pertinents, pour être potentiellement tolérants. L'absence d'expansions clonales ne permet pas de bien caractériser la tolérance et rend ainsi difficile l'exploitation de cette signature. Malgré tout, le caractère particulier de la signature de la tolérance opérationnelle par le TcLandscape, et le fort pourcentage de patients potentiellement tolérant, nous amène à rester prudent quand à l'enrôlement de ces patients dans des protocoles de minimisation du traitement.

Conclusion

Du point de vue de l'analyse de données, la recherche de méthodes innovantes destinées à caractériser les CDR3LD a abouti au développement de deux approches. L'approche « comparaisons par paires de distributions » et l'approche « features » ont été mises au point et utilisées sur deux pathologies liées aux lymphocytes T : la sclérose en plaques et le rejet chronique/la tolérance en transplantation rénale. Les études menées dans ces deux domaines sont basées sur une utilisation de la technologie TcLandscape dans le cadre de la « génération d'hypothèses » plutôt que dans celui de la « validation d'hypothèses » prédefinies (Littman *et al.*, 2007). Bien que descriptives, ces approches ont permis d'étudier l'évolution du répertoire T des patients atteints de sclérose en plaques et de caractériser les particularités du répertoire T des patients transplantés. Compte tenu de la complexité de ces pathologies, l'utilisation de ce type d'approches dites « non biaisées » permet de découvrir sans *a priori* de nouvelles informations (Marincola, 2003).

L'approche « comparaisons par paires de distributions » permet de comparer de manière aveugle tous les TcLandscape de l'étude. Elle s'est montrée intéressante pour l'analyse de données longitudinales, dans l'étude sur la sclérose en plaques par exemple. La deuxième approche a pour vocation de décrire très précisément les distributions de longueurs de CDR3. Cette méthode a de nombreuses applications et promet de révéler des signatures de manière très fine. Partiellement utilisée dans le cadre de l'étude des transplantés rénaux, elle a permis de mettre en évidence des différences entre les groupes.

Au niveau des résultats sur la sclérose en plaques, la corrélation entre l'activité immunologique mesurée par les changements de formes des CDR3 LD et l'activité lésionnelle mesurée par IRM est prometteuse. Le faible nombre de patients nous incite à rester prudents sur les conclusions de cette étude, une confirmation de ces résultats sur une plus grande cohorte demeure importante.

La mise en évidence des différences, grâce au TcLandscape, entre les patients opérationnellement tolérants et les patients présentant des signes de rejet chronique permet de mieux caractériser les répertoires T de ces deux groupes de patients. Les patients opérationnellement tolérant se distinguent des patients ayant des signes de rejet chronique

par un répertoire avec présentant peu d'expansions clonales. L'analyse des TcLandscapes de patients avec une fonction stable de leur greffon mais sous immunosupresseur comparée aux répertoires T des patients opérationnellement tolérants ou présentant des signes de rejet chronique a aussi ouvert de nouvelles perspectives. L'établissement d'une échelle de risque de rejet, réalisée à partir du TcLandscape permettrait, une fois validée, d'aider au diagnostic du rejet chez des patient présentant une fonction stable.

Une des questions importantes est de savoir si le TcLandscape est un biomarqueur potentiel et s'il pourra être transposé pour une utilisation clinique. Les études que nous avons menées, bien qu'exploratoires, indiquent la pertinence de ce test dans une dimension clinique. Il est apparu dans ces deux exemples que le degré de résolution et le type de signature que fournit le TcLandscape permettent d'identifier des populations de patients cliniquement différenciées. Si on analyse de plus près le type de signatures du rejet chronique ou de la sclérose en plaques, il ne s'agit pas d'une signature «publique», c'est-à-dire où des expansions (représentées par une quantité significative de transcrits, pour une longueur précise de CDR3, au sein d'une famille V β donnée) sont présentes dans l'ensemble des échantillons du groupe clinique testé. En réalité, le TcLandscape est considéré, dans ces deux exemples, comme une signature qui rassemble des expansions « privées ». Dans ce cadre de révélation de « réponses privées », présentes dans un groupe et pas dans son groupe contrôle, le TcLandscape, en l'état, peut être considéré comme un biomarqueur.

Perspectives

Les perspectives de ces travaux visent à améliorer les approches statistiques dédiées aux analyses TcLandscapes. De plus, les résultats cliniques obtenus dans les domaines de la sclérose en plaques et de la transplantation rénale, nous incitent à la validation des hypothèses avancées sur le pouvoir diagnostique/pronostique du TcLandscape.

Approches statistiques

Concernant la première méthode d'analyse des CDR3 LD, l'approche de comparaison par paires de distributions a montré tout son intérêt pour suivre dans le temps l'évolution du TcLandscape. L'amélioration majeure réside dans le choix de la distance, un paramètre qui doit être traité soigneusement lors de l'analyse de spectres ou d'images (Osada *et al.*, 2002). L'utilisation de la « Earth mover's distance » est une alternative intéressante. En effet, cette distance cherche à déterminer la quantité de « travail » à effectuer pour passer d'une distribution à une autre (Rubner *et al.*, 2000). L'utilisation de cette distance sera appliquée sur les distributions brutes (en nucléotides) afin de supprimer les problèmes liés à la transformation d'une distribution de longueurs en « nucléotide » en une distribution de longueurs en « acide aminé » (voir Introduction, § 2.2).

L'approche Features, telle que décrite dans ce manuscrit, permet de caractériser très précisément les différentes formes de CDR3 LD. Elle sera employée pour l'étude sur l'évaluation du risque de rejet chronique. Cependant, avant de pouvoir l'utiliser en routine, une validation de la méthode est programmée et consiste à évaluer la satisfaction de l'expert quant au pouvoir descriptif de l'approche. La méthodologie envisagée est de demander à l'expert de classer un groupe aléatoire de CDR3 LD et de vérifier que l'algorithme reproduit le classement. Cette étape de validation concerne aussi la méthode de calcul des features avec l'utilisation du gradient de filtres. En effet, il est nécessaire de filtrer certaines CDR3 LD afin d'obtenir une valeur « stable » des features. Une étude sur l'impact du gradient de filtres sur la valeur des features sera réalisée dans le protocole de validation. Elle consistera à évaluer la nature de l'impact du gradient de filtres sur un groupe de CDR3 LD prises au hasard : impact positif entraînant un « débruitage », impact négatif entraînant une altération significative de la forme, ou sans d'impact, aucune incidence sur la

valeur de la feature. Une fois validée la méthode des features sera directement utilisée sur des CDR3 LD brutes en « nucléotide ». En effet, la majorité des features ne nécessitent pas d'être calculées sur des CDR3 LD en « acide aminé », Enfin, l'approche Features est une approche où l'on peut s'intéresser aux différentes caractéristiques de « manière imbriquée ». En effet, certains paramètres comme la « kurtosis » définissent à eux seuls la forme générale de la distribution (distribution « pointue » ou « aplatie »). Une attention plus fine sur le nombre de pics ou le nombre de modes sera portée dans un deuxième temps. Afin de construire un « arbre de description » par une caractérisation pas à pas, sur la base des valeurs des features. Les réseaux bayésiens sont des outils intéressants pour développer cette approche de caractérisation avec les features (Friedman *et al.*, 1997).

Améliorations technologiques

Le TcLandscape est un outil exploratoire révélant la diversité des lymphocytes T par le biais de l'analyse des CDR3 LD de la chaîne β du TCR. La mise en évidence d'expansions clonales avec la combinaison de la technologie Immunoscope et de la PCR quantitative est intéressante. Cependant, un de nos objectifs est d'inscrire le TcLandscape dans un corpus de données plus large alliant des données fonctionnelles pour mieux caractériser les populations T (phénotypage, le profil transcriptionnel ...).

Un projet est en cours de développement pour améliorer la technologie TcLandscape : le projet TcChip consiste à développer une puce à ADN dédiée au TCR pour l'analyse des lymphocytes T(confidentiel). Ce projet s'inscrit dans la thématique biodiagnostic du pôle de compétitivité « *Atlantic Biothérapies* » et a obtenu un financement par le fonds unique interministériel d'appui aux projets de R&D des pôles de compétitivité (FCE). Les partenaires du projet sont TcLand, la société Serial Genetics implantée à Evry et les laboratoires de l'ITERT et l'ESPCI.

TcLandscape et sclérose en plaques

A partir d'une analyse longitudinale de patients atteints de sclérose en plaques les résultats de l'article suggèrent que l'analyse du répertoire T est possiblement corrélée aux données IRM (Laplaud *et al.*, 2006). Afin de consolider ces résultats, une étude prospective est

réalisée pour étudier les corrélations entre les paramètres de l'IRM et les paramètres immunologiques sur un nombre plus important de malades (demande de PHRC 2008). Dans le cadre d'un essai multicentrique, une soixantaine de patients, ayant uniquement la forme rémittente de la maladie, est recrutée. La cohorte est suivie pendant un an avec une IRM encéphalique tous les trois mois ainsi qu'une prise de sang concomitante pour l'étude du répertoire T. Le calcul du volume lésionnel, du nombre de lésions et leurs variations au cours du temps seront corrélés avec les paramètres qualitatifs et quantitatifs issus du TcLandscape. Grâce à cette étude, un véritable suivi de la mobilisation lymphocytaire T pour chaque patient pourra être entrepris. Si les corrélations observées sur la petite cohorte de l'étude sont confirmées dans cette prochaine étude, une simple prise de sang pourrait ainsi permettre de suivre l'évolution naturelle de la maladie chez les patients ou encore d'évaluer l'effet d'un traitement. D'autre part, en termes de physiopathologie, cette étude permettra de montrer la relation directe entre les lymphocytes T circulants et la présence de lésions cérébrales, et éventuellement de décrire de nouvelles formes de la maladie ; l'objectif étant de trouver un outil de suivi fiable, complémentaire à l'IRM.

De manière pratique, cet essai fait intervenir 7 centres français afin d'inclure le nombre de patients statistiquement requis (63), sur la base des résultats de l'article (Laplaud *et al.*, 2006). Compte tenu de l'hétérogénéité des patients atteints de sclérose en plaques, il est important de prévoir un nombre important de patients (Bielekova et Martin, 2004). C'est uniquement avec un grand nombre d'individus que la stratification de la population de patients sera possible et permettra une meilleure compréhension de la maladie et de ses différents processus pathologiques (Bielekova et Martin, 2004).

TcLandscape et transplantation rénale

Au niveau de l'analyse des données, les indices composites fournis par la méthode des features vont remplacer la kurtosis. Cette amélioration permettra de prendre en compte toutes les subtilités des CDR3 LD. La découverte de formes de CDR3 LD communes entre les différents individus pourra peut-être révélées avec la nouvelle méthode.

Les hypothèses concernant les mécanismes qui conduiraient les cellules T CD8⁺ à jouer un rôle dans l'alloréactivité et la réponse contre le CMV doivent être validées. Pour cela, il est

nécessaire d'étudier les cellules T responsables des expansions clonales des TcLandscapes des classes 3-4. Il est nécessaire d'isoler ces populations cellulaires :

- Les cellules T CD8⁺ sont triées par cytométrie de flux au moyen d'anticorps anti-Vβ spécifiques des CDR3 LD de gènes altérés et accumulés.
- La réactivité au CMV de ces cellules T sera testée par la technique des elispots analysant la production d'IFN γ à 24h. Le réactivité contre d'autres virus sera aussi mesurée (EBV, virus de la grippe, virus de l'hépatite C).
- Afin de tester l'alloréactivité de ces mêmes cellules, la technique des elispots sera aussi employée avec des cellules du donneur ou « proches » du donneur en terme de CMH.

Suite à l'étude des TcLandscapes des différents groupes de patients (patients opérationnellement tolérants, patients avec des signes de rejet chronique, patient avec une fonction stable de leur greffon sous traitement immunosupresseur et des individus sains) différentes hypothèses ont été formulées sur le pouvoir diagnostique et pronostique du TcLandscape. Il est nécessaire de savoir si le TcLandscape permet d'identifier des patients potentiellement tolérant et/ou s'il est capable d'établir un pronostic sur la survenue ou non du rejet à long terme.

L'utilisation de méthodes statistiques « non supervisées » dans l'article en préparation était particulièrement justifiée. En effet, le caractère très imprévisible et inconnu de la tolérance (« the unknown », (Newell et Larsen, 2006)) implique qu'il faut d'abord décrire, comprendre puis prédire. Concernant la description de la tolérance opérationnelle, il est important de valider la signature obtenue dans cette étude avec de nouveaux échantillons. Pour cela, nous avons pris contact avec le consortium américain « Immune Tolerance Network », afin de réaliser des analyses TcLandscape de leur cohorte de 23 patients opérationnellement tolérant. L'étude devrait être réalisée, en aveugle, sur une cohorte de 75 patients contenant les 23 patients opérationnellement tolérant. L'analyse de ce groupe indépendant devrait nous permettre de confirmer la signature de la tolérance opérationnelle présentée dans l'article en préparation. Une autre alternative pour la validation de cette signature est de réaliser des analyses TcLandscapes dans un autre domaine d'application : la greffe de foie. Le

groupe d'Alberto Sanchez-Fueyo à Barcelone, avec lequel nous avons déjà collaboré, nous a envoyé des échantillons de patients opérationnellement tolérants dans la greffe de foie, afin de comparer ces tolérances dans ces deux organes (Martinez-Llordella *et al.*, 2007). Concernant la prédiction de la tolérance, le nombre de sujets opérationnellement tolérants fait aujourd'hui défaut pour la construction d'un modèle prédictif. Compte tenu de l'hétérogénéité qui caractérise les études chez l'Homme, les jeux d'apprentissage et de validation, permettant d'établir et de valider une règle de discrimination, doivent être augmentés en nombre. Grâce à la collaboration avec « l'Immune Tolerance Network » et au recrutement de nouveaux patients, l'accroissement de la cohorte de patients opérationnellement tolérants (et conjointement de celle des patients avec des signes de rejet chronique) permettra de passer à l'étape de prédiction.

Concernant la prédiction du risque de développer un rejet chronique, nous avons émis l'hypothèse que les TcLandscapes de patients ayant une fonction stable, qui ressemblent à ceux des patients en rejet chronique, seraient à fort risque de rejet. Il existe deux manières de valider cette hypothèse :

1. Des patients, identifiés comme étant à fort et faible risque de rejet, sont enrôlés dans une étude prospective visant à montrer que la survenue du rejet chronique, ou une dégradation significative de la fonction du greffon, apparaît chez les patients identifiés comme étant à fort risque de rejet.

Cette étude consiste à attendre l'événement de rejet chez les patients, un événement rare, intervenant à long-terme et un inconvénient majeur pour le patient. Ce type d'étude ne permet pas de valider efficacement le caractère prédictif du TcLandscape (Lachenbruch *et al.*, 2004).

2. L'autre possibilité consiste à proposer une biopsie aux patients, identifiés comme étant à fort et faible (groupe contrôle) risques de rejet.

Cette étude est actuellement en cours de dépôt auprès du Comité Consultatif de Protection des Personnes qui se prêtent à une Recherche Biomédicale de Nantes. Elle permet, grâce à une intervention bénigne, de contrôler l'état du greffon et de valider rapidement les hypothèses soulevées par le TcLandscape.

L'utilisation du TcLandscape en clinique est envisageable ; à l'image du test « ImmuKnow » de Cylex qui, en fonction du taux d'adénosine triphosphate, révèle globalement le risque de rejet ou d'infection (Kowalski *et al.*, 2006). Cependant, la stratégie qui consiste à intégrer le tcLandscape dans un groupe d'autres biomarqueurs est sûrement plus efficace. La création de critères de substitution composites a en effet été envisagée dans le développement de biomarqueurs, en général (Lesko et Atkinson Jr, 2001), et dans le domaine de la Transplantation, en particulier. Comme le soulignent Hariharan *et al.*, afin de baisser le risque qu'un critère de substitution, valable sur une population, soit inadéquat pour un patient précis (faux positif), l'utilisation d'un critère composite permettrait d'accroître ainsi la spécificité générale du critère de substitution (Hariharan *et al.*, 2004). Cette solution a aussi été évoquée par Lachenbruch *et al.* qui proposent d'allier la biopsie à différents marqueurs moléculaires non invasifs et à des critères cliniques, afin de créer un score combiné et pondéré des différents tests (Lachenbruch *et al.*, 2004). Cette stratégie consiste à créer un outil de diagnostic ou de pronostic qui combine des informations issues de multiples variables biologiques. Récemment, la Food and Drug Administration (Agence de la Santé américaine) a formalisé ce type de biomarqueurs composites, nommés In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays (IVDMIA) (FDA, 2007). Le développement de plusieurs bioessais pour l'identification de la tolérance et la prévention du rejet chronique est mené dans notre laboratoire et encourage au développement d'un IVDMIA. Les signatures issues des puces à ADN (Braud *et al.*, 2007; Brouard *et al.*, 2007), mais aussi les caractérisations phénotypiques (Baeten *et al.*, 2006; Louis *et al.*, 2006) ainsi que d'autres indicateurs comme la présence d'anticorps anti CMH (Hourmant *et al.*, 2005; Terasaki et Ozawa, 2005) peuvent être combinés au résultats du TcLandscape pour la prédiction de la tolérance ou du rejet.

Deux études, l'une rétrospective et l'autre prospective ont été engagées sur le concept de IVDMIA :

- Avec un recul clinique de quatre ans, l'étude rétrospective consiste à évaluer le caractère pronostique du biomarqueur composite et de la biopsie à partir d'échantillons de patients prélevés un an après la greffe. Le devenir du patient étant connu sur une période de quatre ans (étude de la biocollection, Magali Giral, ITERT).

- L'étude prospective consiste à évaluer le caractère pronostique du biomarqueur composite analysé sur du sang à trois mois par rapport à un contrôle à un an réalisé par une biopsie.

L'ensemble de ces travaux permettra, nous l'espérons, de proposer de nouveaux biomarqueurs, dans domaine de la transplantation rénale.

Bibliographie

- Akalin E., Murphy B. (2001), Gene polymorphisms and transplantation. *Curr Opin Immunol*, **13**, 5, pp. 572-6.
- Akatsuka Y., Martin E. G., Madonik A., et al. (1999), Rapid screening of T-cell receptor (TCR) variable gene usage by multiplex PCR: application for assessment of clonal composition. *Tissue Antigens*, **53**, 2, pp. 122-34.
- Altman J. D., Moss P. A., Goulder P. J., et al. (1996), Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, **274**, 5284, pp. 94-6.
- Ansari M. J., Sayegh M. H. (2004), Clinical transplantation tolerance: the promise and challenges. *Kidney Int*, **65**, 5, pp. 1560-3.
- Arden B., Clark S. P., Kabelitz D., et al. (1995), Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics*, **42**, 6, pp. 455-500.
- Arons E., Sorbara L., Raffeld M., et al. (2005), Characterization of T-cell repertoire in hairy cell leukemia patients before and after recombinant immunotoxin BL22 therapy. *Cancer Immunol Immunother*, pp. 1-11.
- Arstila T. P. (2006), Estimating diversity, the easy way. *Nat Methods*, **3**, 11, pp. 879-80.
- Arstila T. P., Casrouge A., Baron V., et al. (1999), A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science*, **286**, 5441, pp. 958-61.
- Arstila T. P., Casrouge A., Baron V., et al. (2000), Diversity of human alpha beta T cell receptors. *Science*, **288**, 5469, pp. 1135.
- Ashton-Chess J., Brouard S., Soulillou J. P. (2006), Is clinical tolerance realistic in the next decade? *Transpl Int*, **19**, 7, pp. 539-48.
- Ashton-Chess J., Soulillou J. P., Brouard S. (2007), The use of biomarkers in clinical transplant tolerance. *Trends Transpl.*, **1**, pp. 46-55.
- Atkinson Jr A. J., PhD W. A. C., Mds V. G., et al. (2001), Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Commentary*, **69**, 3, pp.
- Bach J. F. (2006), Induction of immunological tolerance using monoclonal antibodies: applications to organ transplantation and autoimmune disease. *C R Biol*, **329**, 4, pp. 260-2.
- Baeten D., Louis S., Braud C., et al. (2006), Phenotypically and functionally distinct CD8+ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. *J Am Soc Nephrol*, **17**, 1, pp. 294-304.
- Bakshi R., Minagar A., Jaisani Z., et al. (2005), Imaging of multiple sclerosis: role in neurotherapeutics. *NeuroRx*, **2**, 2, pp. 277-303.

Ballet C., Giral M., Ashton-Chess J., et al. (2006), Chronic rejection of human kidney allografts. *Expert Review of Clinical Immunology*, **2**, 3, pp. 393-402.

Ballet C., Roussey-Kesler G., Aubin J. T., et al. (2006), Humoral and Cellular Responses to Influenza Vaccination in Human Recipients Naturally Tolerant to a Kidney Allograft. *Am J Transplant*, **6**, 11, pp. 2796-2801.

Baranzini S. E., Jeong M. C., Butunoi C., et al. (1999), B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *J Immunol*, **163**, 9, pp. 5133-44.

Baron C., McMorrow I., Sachs D. H., et al. (2001), Persistence of dominant T cell clones in accepted solid organ transplants. *J Immunol*, **167**, 8, pp. 4154-60.

Bates W. D., Davies D. R., Welsh K., et al. (1999), An evaluation of the Banff classification of early renal allograft biopsies and correlation with outcome. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **14**, 10, pp. 2364-2369.

Baum P. D., McCune J. M. (2006), Direct measurement of T-cell receptor repertoire diversity with AmpliCot. *Nat Methods*, **3**, 11, pp. 895-901.

Benichou G. (1999), Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci*, **4**, pp. D476-D480.

Benveniste O., Cherin P., Maisonobe T., et al. (2001), Severe perturbations of the blood T cell repertoire in polymyositis, but not dermatomyositis patients. *J Immunol*, **167**, 6, pp. 3521-9.

Berger T., Reindl M. (2007), Multiple sclerosis: Disease biomarkers as indicated by pathophysiology. *J Neurol Sci*, pp.

Bielekova B., Martin R. (2004), Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain*, **127**, Pt 7, pp. 1463-78.

Bluestone J. A., Matthews J. B., Krensky A. M. (2000), The immune tolerance network: the "Holy Grail" comes to the clinic. *J Am Soc Nephrol*, **11**, 11, pp. 2141-6.

Bomberger C., Singh-Jairam M., Rodey G., et al. (1998), Lymphoid reconstitution after autologous PBSC transplantation with FACS-sorted CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood*, **91**, 7, pp. 2588-600.

Bonarius H. P., Baas F., Remmerswaal E. B., et al. (2006), Monitoring the T-cell receptor repertoire at single-clone resolution. *PLoS ONE*, **1**, pp. e55.

Braud C., Baeten D., Giral M., et al. (2007), Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: I. blood gene expression statistical analysis. *J Cell Biochem*, pp.

Brehm M. A., Markees T. G., Daniels K. A., et al. (2003), Direct visualization of cross-reactive effector and memory allo-specific CD8 T cells generated in response to viral infections. *J Immunol*, **170**, 8, pp. 4077-86.

Breit T. M., Wolvers-Tettero I. L., Hahlen K., *et al.* (1991), Limited combinatorial repertoire of gamma delta T-cell receptors expressed by T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia*, **5**, 2, pp. 116-24.

Brex P. A., Ciccarelli O., O'Riordan J. I., *et al.* (2002), A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis. *N Engl J Med*, **346**, 3, pp. 158-64.

Brouard S., Dupont A., Giral M., *et al.* (2005), Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant*, **5**, 2, pp. 330-40.

Brouard S., Mansfield E., Braud C., *et al.* (2007), Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp.

Cabaniols J. P., Fazilleau N., Casrouge A., *et al.* (2001), Most alpha/beta T cell receptor diversity is due to terminal deoxynucleotidyl transferase. *J Exp Med*, **194**, 9, pp. 1385-90.

Calne R. Y. (2004), Prope tolerance: the future of organ transplantation--from the laboratory to the clinic. *Transplantation*, **77**, 6, pp. 930-2.

Casrouge A., Beaudoin E., Dalle S., *et al.* (2000), Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J Immunol*, **164**, 11, pp. 5782-7.

Cesbron-Gautier A., Simon P., Achard L., *et al.* (2004), Luminex technology for HLA typing by PCR-SSO and identification of HLA antibody specificities. *Ann Biol Clin (Paris)*, **62**, 1, pp. 93-8.

Chen X., Hale G. A., Neale G. A., *et al.* (2007), A novel approach for the analysis of T-cell reconstitution by using a T-cell receptor beta-based oligonucleotide microarray in hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol*, **35**, 5, pp. 831-41.

Chien Y., Becker D. M., Lindsten T., *et al.* (1984), A third type of murine T-cell receptor gene. *Nature*, **312**, 5989, pp. 31-35.

Chothia C., Boswell D. R., Lesk A. M. (1988), The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. *Embo J*, **7**, 12, pp. 3745-55.

Cibotti R., Cabaniols J. P., Pannetier C., *et al.* (1994), Public and private V beta T cell receptor repertoires against hen egg white lysozyme (HEL) in nontransgenic versus HEL transgenic mice. *J Exp Med*, **180**, 3, pp. 861-72.

Cochet M., Pannetier C., Regnault A., *et al.* (1992), Molecular detection and in vivo analysis of the specific T cell response to a protein antigen. *Eur J Immunol*, **22**, 10, pp. 2639-47.

Collette A., Bagot S., Ferrandiz M. E., *et al.* (2004), A Profound Alteration of Blood TCRB Repertoire Allows Prediction of Cerebral Malaria. *J Immunol*, **173**, 7, pp. 4568-75.

Collette A., Cazenave P. A., Pied S., *et al.* (2003), New methods and software tools for high throughput CDR3 spectratyping. Application to T lymphocyte repertoire modifications during experimental malaria. *J Immunol Methods*, **278**, 1-2, pp. 105-16.

Collette A., Six A. (2002), ISEApaks: an Excel platform for GeneScan and Immunoscope data retrieval, management and analysis. *Bioinformatics*, **18**, 2, pp. 329-30.

Comabella M., Martin R. (2007), Genomics in multiple sclerosis—Current state and future directions. *Journal of Neuroimmunology*, **187**, 1-2, pp. 1-8.

Cortesini R., Suciu-Foca N. (2004), The concept of "partial" clinical tolerance. *Transpl Immunol*, **13**, 2, pp. 101-4.

Coulie P. G., Karanikas V., Colau D., et al. (2001), A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 18, pp. 10290-5.

Crespo M., Pascual M., Tolkoff-Rubin N., et al. (2001), Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. Incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation*, **71**, 5, pp. 652-658.

Dantal J., Hourmant M., Cantarovich D., et al. (1998), Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet*, **351**, 9103, pp. 623-8.

Davis M. M., Bjorkman P. J. (1988), T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, **334**, 6181, pp. 395-402.

Dechanet J., Merville P., Lim A., et al. (1999), Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest*, **103**, 10, pp. 1437-49.

Delwart E. L., Shpaer E. G., Louwagie J., et al. (1993), Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science*, **262**, 5137, pp. 1257-61.

Demoulin T., Mouthon F., Clayette P., et al. (2003), The same TCR (N)Dbeta(N)Jbeta junctional region is associated with several different vbetta13 subtypes in a multiple sclerosis patient at the onset of the disease. *Neurobiol Dis*, **14**, 3, pp. 470-82.

Dietrich P. Y., Le Gal F. A., Dutoit V., et al. (2003), Prevalent role of TCR alpha-chain in the selection of the preimmune repertoire specific for a human tumor-associated self-antigen. *J Immunol*, **170**, 10, pp. 5103-9.

Donauer J., Rumberger B., Klein M., et al. (2003), Expression profiling on chronically rejected transplant kidneys. *Transplantation*, **76**, 3, pp. 539-47.

Douillard P., Josien R., Pannetier C., et al. (1998), Selection of T cell clones with restricted TCR-CDR3 lengths during in vitro and in vivo alloresponses. *Int Immunol*, **10**, 1, pp. 71-83.

Euvrard S., Kanitakis J., Claudy A. (2003), Skin Cancers after Organ Transplantation. *New England Journal of Medicine*, **348**, 17, pp. 1681-1691.

FDA (2007), Draft Guidance for Industry, Clinical Laboratories, and FDA Staff: In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays. *Biotechnology Law Report*, pp.

Fehr T., Sykes M. (2004), Tolerance induction in clinical transplantation. *Transpl Immunol*, **13**, 2, pp. 117-30.

Fields B. A., Malchiodi E. L., Li H., et al. (1996), Crystal structure of a T-cell receptor beta-chain complexed with a superantigen. *Nature*, **384**, 6605, pp. 188-92.

Filippi M., Paty D. W., Kappos L., et al. (1995), Correlations between changes in disability and T2-weighted brain MRI activity in multiple sclerosis: a follow-up study. *Neurology*, **45**, 2, pp. 255-260.

Fossey S. C., Vnencak-Jones C. L., Olsen N. J., et al. (2007), Identification of Molecular Biomarkers for Multiple Sclerosis. *Journal of Molecular Diagnostics*, **9**, 2, pp. 197.

Fozza C., Nadal E., Longinotti M., et al. (2007), T-cell receptor repertoire usage after allografting differs between CD4+CD25+ regulatory T cells and their CD4+CD25-counterpart. *Haematologica*, **92**, 2, pp. 206-14.

Freedman M. S., Thompson E. J., Deisenhammer F., et al. (2005), Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol*, **62**, 6, pp. 865-70.

Friedman N., Geiger D., Goldszmidt M. (1997), Bayesian Network Classifiers. *Machine Learning*, **29**, 2, pp. 131-163.

Fuschiotti P., Pasqual N., Hierle V., et al. (2007), Analysis of the TCR alpha-chain rearrangement profile in human T lymphocytes. *Mol Immunol*, **44**, 13, pp. 3380-8.

Gagne K., Brouard S., Giral M., et al. (2000), Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J Immunol*, **164**, 3, pp. 1553-63.

Gallagher M., Obeid P., Marche P. N., et al. (2001), Both TCR alpha and TCR delta chain diversity are regulated during thymic ontogeny. *J Immunol*, **167**, 3, pp. 1447-53.

Gallard A., Foucras G., Coureau C., et al. (2002), Tracking T cell clonotypes in complex T lymphocyte populations by real-time quantitative PCR using fluorogenic complementarity-determining region-3-specific probes. *J Immunol Methods*, **270**, 2, pp. 269-80.

Gamadia L. E., Remmerswaal E. B., Surachno S., et al. (2004), Cross-reactivity of cytomegalovirus-specific CD8+ T cells to allo-major histocompatibility complex class I molecules. *Transplantation*, **77**, 12, pp. 1879-85.

Garcia K. C., Degano M., Stanfield R. L., et al. (1996), An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science*, **274**, 5285, pp. 209-19.

Gerstein R. M., Lieber M. R. (1993), Extent to which homology can constrain coding exon junctional diversity in V(D)J recombination. *Nature*, **363**, 6430, pp. 625-7.

Giachino C., Rocci M. P., De Libero G., et al. (1994), An alternative approach to the assessment of gamma delta T-cell clonality in celiac disease intestinal lesions through cDNA heteroduplex analysis of T-cell receptor VJ junctions. *Hum Immunol*, **40**, 4, pp. 303-11.

Gibson T., Medawar P. B. (1943), The fate of skin homografts in man. *J Anat*, **77**, Pt 4, pp. 299-310.4.

Gilfillan S., Dierich A., Lemeur M., et al. (1993), Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science*, **261**, 5125, pp. 1175-8.

Goldrath A. W., Bevan M. J. (1999), Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*, **402**, 6759, pp. 255-62.

Gorochov G., Neumann A. U., Kereveur A., et al. (1998), Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nat Med*, **4**, 2, pp. 215-21.

Gorski J., Yassai M., Zhu X., et al. (1994), Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status. *J Immunol*, **152**, 10, pp. 5109-19.

Gra O. A., Sidorova J. V., Nikitin E. A., et al. (2007), Analysis of T-cell receptor-gamma gene rearrangements using oligonucleotide microchip: a novel approach for the determination of T-cell clonality. *J Mol Diagn*, **9**, 2, pp. 249-57.

Guilherme L., Dulphy N., Douay C., et al. (2000), Molecular evidence for antigen-driven immune responses in cardiac lesions of rheumatic heart disease patients. *Int Immunol*, **12**, 7, pp. 1063-74.

Guillet M., Gagne K., Lair D., et al. (2004), Different patterns of TCR beta chain regulation following allo- and xeno-transplantation. *Xenotransplantation*, **11**, 4, pp. 315-22.

Guillet M., Sebille F., Soullou J. (2001), TCR usage in naive and committed alloreactive cells: implications for the understanding of TCR biases in transplantation. *Curr Opin Immunol*, **13**, 5, pp. 566-71.

Haegert D. G., Cowan T., Murray T. J., et al. (1999), Does a shift in the T-cell receptor repertoire precede the onset of MS? *Neurology*, **53**, 3, pp. 485-90.

Haegert D. G., Galutira D., Murray T. J., et al. (2003), Identical twins discordant for multiple sclerosis have a shift in their T-cell receptor repertoires. *Clin Exp Immunol*, **134**, 3, pp. 532-7.

Hafler D. A., Duby A. D., Lee S. J., et al. (1988), Oligoclonal T lymphocytes in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*, **167**, 4, pp. 1313-22.

Han M., Harrison L., Kehn P., et al. (1999), Invariant or highly conserved TCR alpha are expressed on double-negative (CD3+CD4-CD8-) and CD8+ T cells. *J Immunol*, **163**, 1, pp. 301-11.

Hariharan S., Kasiske B., Matas A., et al. (2004), Surrogate markers for long-term renal allograft survival. *Am J Transplant*, **4**, 7, pp. 1179-83.

Hariharan S., McBride M. A., Cherikh W. S., et al. (2002), Post-transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival. *Kidney International*, **62**, 1, pp. 311-318.

He M., Tomfohr J. K., Devlin B. H., et al. (2005), SpA: web-accessible spectratype analysis: data management, statistical analysis and visualization. *Bioinformatics*, **21**, 18, pp. 3697-9.

Hedrick S. M., Cohen D. I., Nielsen E. A., et al. (1984), Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature*, **308**, 5955, pp. 149-153.

Hernández D., Rufino M., González-Posada J. M., et al. (2007), Surrogate end points for graft failure and mortality in kidney transplantation. *Transplantation Reviews*, **21**, 2, pp. 97-106.

Hirokawa M., Horiuchi T., Kitabayashi A., et al. (2000), Delayed recovery of CDR3 complexity of the T-cell receptor-beta chain in recipients of allogeneic bone marrow transplants who had virus-associated interstitial pneumonia: monitor of T-cell function by CDR3 spectratyping. *J Allergy Clin Immunol*, **106**, 1 Pt 2, pp. S32-9.

Hoffmann S. C., Hale D. A., Kleiner D. E., et al. (2005), Functionally significant renal allograft rejection is defined by transcriptional criteria. *Am J Transplant*, **5**, 3, pp. 573-81.

Horig H., Pullman W. (2004), From bench to clinic and back: Perspective on the 1st IQPC Translational Research conference. *J Transl Med*, **2**, 1, pp. 44.

Hourmant M., Cesbron-Gautier A., Terasaki P. I., et al. (2005), Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*, **16**, 9, pp. 2804-12.

Hricik D. E., Rodriguez V., Riley J., et al. (2003), Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for interferon-gamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*, **3**, 7, pp. 878-84.

Hviid L., Akanmori B. D., Loizon S., et al. (2000), High frequency of circulating gamma delta T cells with dominance of the v(delta)1 subset in a healthy population. *Int Immunol*, **12**, 6, pp. 797-805.

Jones L. A., Chin L. T., Longo D. L., et al. (1990), Peripheral clonal elimination of functional T cells. *Science*, **250**, 4988, pp. 1726-9.

Jones L. A., Chin L. T., Merriam G. R., et al. (1990), Failure of clonal deletion in neonatally thymectomized mice: tolerance is preserved through clonal anergy. *J Exp Med*, **172**, 5, pp. 1277-85.

Joosten S. A., Sijpkens Y. W., van Kooten C., et al. (2005), Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int*, **68**, 1, pp. 1-13.

Junker A., Ivanidze J., Malotka J., et al. (2007), Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain*, **130**, Pt 11, pp. 2789-99.

Karadimitris A., Manavalan J. S., Thaler H. T., *et al.* (2000), Abnormal T-cell repertoire is consistent with immune process underlying the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, **96**, 7, pp. 2613-20.

Kasiske B. L., Gaston R. S., Gourishankar S., *et al.* (2005), Long-term deterioration of kidney allograft function. *Am J Transplant*, **5**, 6, pp. 1405-14.

Kepler T. B., He M., Tomfohr J. K., *et al.* (2005), Statistical analysis of antigen receptor spectratype data. *Bioinformatics*, **21**, 16, pp. 3394-400.

Khoury S. J., Guttmann C. R., Orav E. J., *et al.* (1994), Longitudinal MRI in multiple sclerosis: correlation between disability and lesion burden. *Neurology*, **44**, 11, pp. 2120-4.

Killian M. S., Matud J., Detels R., *et al.* (2002), MaGiK method of T-Cell receptor repertoire analysis. *Clin Diagn Lab Immunol*, **9**, 4, pp. 858-63.

King D. J., Gotch F. M., Larsson-Sciard E. L. (2001), T-cell re-population in HIV-infected children on highly active anti-retroviral therapy (HAART). *Clin Exp Immunol*, **125**, 3, pp. 447-54.

Kirk A. D., Mannon R. B., Swanson S. J., *et al.* (2005), Strategies for minimizing immunosuppression in kidney transplantation. *Transpl Int*, **18**, 1, pp. 2-14.

Kowalski R. J., Post D. R., Mannon R. B., *et al.* (2006), Assessing relative risks of infection and rejection: A meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation*, **82**, 5, pp. 663-668.

Kuo F. C., Hall D., Longtine J. A. (2007), A novel method for interpretation of T-cell receptor gamma gene rearrangement assay by capillary gel electrophoresis based on normal distribution. *J Mol Diagn*, **9**, 1, pp. 12-9.

Kupiec J. J., Sonigo P. (2000). Ni Dieu ni gène: pour une autre théorie de l'hérédité. Ed. du Seuilp.

Kurosawa Y., Tonegawa S. (1982), Organization, structure, and assembly of immunoglobulin heavy chain diversity DNA segments. *J Exp Med*, **155**, 1, pp. 201-18.

Kurtzke J. F. (1983), Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, **33**, 11, pp. 1444-52.

Kyewski B., Klein L. (2006), A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol*, **24**, pp. 571-606.

La Gruta N. L., Driel I. R., Gleeson P. A. (2000), Peripheral T cell expansion in lymphopenic mice results in a restricted T cell repertoire. *Eur J Immunol*, **30**, 12, pp. 3380-6.

Lachenbruch P. A., Rosenberg A. S., Bonvini E., *et al.* (2004), Biomarkers and surrogate endpoints in renal transplantation: present status and considerations for clinical trial design. *Am J Transplant*, **4**, 4, pp. 451-7.

Lakkis F. G., Arakelov A., Konieczny B. T., *et al.* (2000), Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med*, **6**, 6, pp. 686-8.

Lang R., Pfeffer K., Wagner H., *et al.* (1997), A rapid method for semiquantitative analysis of the human V beta-repertoire using TaqManR PCR. *J Immunol Methods*, **203**, 2, pp. 181-92.

Laouini D., Casrouge A., Dalle S., *et al.* (2000), V beta T cell repertoire of CD8+ splenocytes selected on nonpolymorphic MHC class I molecules. *J Immunol*, **165**, 11, pp. 6381-6.

Laplaud D. A., Berthelot L., Miqueu P., *et al.* (2006), 177:151-60Serial blood T cell repertoire alterations in multiple sclerosis patients; correlation with clinical and MRI parameters. *J Neuroimmunol*, **177**, 1-2, pp. 151-60.

Laplaud D. A., Ruiz C., Wiertlewski S., *et al.* (2004), Blood T-cell receptor beta chain transcriptome in multiple sclerosis. Characterization of the T cells with altered CDR3 length distribution. *Brain*, **127**, Pt 5, pp. 981-95.

Lau A., Turnquist H., Tokita D., *et al.* (2006), "Tolerance" assays: the physician's guide to safe weaning of immunosuppression? *Transplantation Reviews*, **20**, 4, pp. 208-221.

Lee J. W., Nordblom G. D., Smith W. C., *et al.* (2002), Validation of bioanalytical assays for novel biomarkers: practical recommendations for clinical investigation of new drug entities. *Biomarkers in Clinical Drug Development*. New York: Marcel Dekker, pp.

Lee S. K., Song C. H., Kim J. B., *et al.* (1998), Enhanced expression of immunoglobulin kappa light chains with unusually long CDR3 regions in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, **25**, 6, pp. 1067-71.

Lefranc M. P. (2003), IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res*, **31**, 1, pp. 307-10.

Lehmensiek V., Sussmuth S. D., Tauscher G., *et al.* (2007), Cerebrospinal fluid proteome profile in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, **13**, 7, pp. 840.

Lesko L. J., Atkinson Jr A. J. (2001), Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: Criteria, validation, strategies. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **41**, pp. 347-366.

Li Y., Koshiba T., Yoshizawa A., *et al.* (2004), Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant*, **4**, 12, pp. 2118-25.

Lieber M. R., Hesse J. E., Mizuuchi K., *et al.* (1988), Lymphoid V(D)J recombination: nucleotide insertion at signal joints as well as coding joints. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 22, pp. 8588-92.

Lim A., Baron V., Ferradini L., *et al.* (2002), Combination of MHC-peptide multimer-based T cell sorting with the Immunoscope permits sensitive ex vivo quantitation and follow-up of human CD8+ T cell immune responses. *J Immunol Methods*, **261**, 1-2, pp. 177-94.

Littman B. H., Di Mario L., Plebani M., et al. (2007), What's next in translational medicine? *Clin Sci (Lond)*, **112**, 4, pp. 217-27.

Liu D., Callahan J. P., Dau P. C. (1995), Intrafamily fragment analysis of the T cell receptor beta chain CDR3 region. *J Immunol Methods*, **187**, 1, pp. 139-50.

Loh E. Y., Elliott J. F., Cwirla S., et al. (1989), Polymerase chain reaction with single-sided specificity: analysis of T cell receptor delta chain. *Science*, **243**, 4888, pp. 217-220.

Long S. A., Khalili J., Ashe J., et al. (2006), Standardized analysis for the quantification of Vbeta CDR3 T-cell receptor diversity. *J Immunol Methods*, **317**, 1-2, pp. 100-13.

Louis S., Braudeau C., Giral M., et al. (2006), Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*, **81**, 3, pp. 398-407.

MacIsaac C., Curtis N., Cade J., et al. (2003), Rapid analysis of the Vbeta repertoire of CD4 and CD8 T lymphocytes in whole blood. *J Immunol Methods*, **283**, 1-2, pp. 9-15.

Mancini S. J., Candeias S. M., Di Santo J. P., et al. (2001), TCRA gene rearrangement in immature thymocytes in absence of CD3, pre-TCR, and TCR signaling. *J Immunol*, **167**, 8, pp. 4485-93.

Manfras B. J., Weidenbach H., Beckh K. H., et al. (2004), Oligoclonal CD8+ T-cell expansion in patients with chronic hepatitis C is associated with liver pathology and poor response to interferon-alpha therapy. *J Clin Immunol*, **24**, 3, pp. 258-71.

Mankoff S. P., Brander C., Ferrone S., et al. (2005), Lost in Translation: Obstacles to Translational Medicine. *feedback*, pp.

Marche P. N., Six A., Gahery H., et al. (1993), T cell receptor V alpha gene segment with alternate splicing in the junctional region. *J Immunol*, **151**, 10, pp. 5319-27.

Marincola F. M. (2003), Translational Medicine: A two-way road. *J Transl Med*, **1**, 1, pp. 1.

Marsden P. A. (2003), Predicting outcomes after renal transplantation--new tools and old tools. *N Engl J Med*, **349**, 2, pp. 182-4.

Martinez-Llordella M., Puig-Pey I., Orlando G., et al. (2007), Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant*, **7**, 2, pp. 309-19.

Mason D. (1998), A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today*, **19**, 9, pp. 395-404.

Matsumoto Y., Yoon W. K., Jee Y., et al. (2003), Complementarity-determining region 3 spectratyping analysis of the TCR repertoire in multiple sclerosis. *J Immunol*, **170**, 9, pp. 4846-53.

Matsutani T., Ohashi Y., Yoshioka T., et al. (2003), Skew in T-cell receptor usage and clonal T-cell expansion in patients with chronic rejection of transplanted kidneys. *Transplantation*, **75**, 3, pp. 398-407.

Mazariegos G. V., Zahorchak A. F., Reyes J., et al. (2003), Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients. *Am J Transplant*, **3**, 6, pp. 689-96.

McDonald W. I., Compston A., Edan G., et al. (2001), Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, **50**, 1, pp. 121-7.

McHeyzer-Williams M. G., Davis M. M. (1995), Antigen-specific development of primary and memory T cells in vivo. *Science*, **268**, 5207, pp. 106-11.

Miqueu P., Guillet M., Degauque N., et al. (2007), Statistical analysis of CDR3 length distributions for the assessment of T and B cell repertoire biases. *Mol Immunol*, **44**, 6, pp. 1057-1064.

Miqueu P., Guillet M., Dore J. C., et al. (2006), Discrimination of kidney transplant recipients presenting operational tolerance or chronic rejection based on recognition of T cell receptor CDR3 length distribution patterns. *Am J Transplant*, **6**, s2, pp. 403.

Mosley R. L., Koker M. M., Miller R. A. (1998), Idiosyncratic alterations of TCR size distributions affecting both CD4 and CD8 T cell subsets in aging mice. *Cell Immunol*, **189**, 1, pp. 10-8.

Moss P., Khan N. (2004), CD8(+) T-cell immunity to cytomegalovirus. *Hum Immunol*, **65**, 5, pp. 456-64.

Muraro P. A., Cassiani-Ingoni R., Chung K., et al. (2006), Clonotypic analysis of cerebrospinal fluid T cells during disease exacerbation and remission in a patient with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, **171**, 1-2, pp. 177-83.

Muraro P. A., Douek D. C., Packer A., et al. (2005), Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J Exp Med*, **201**, 5, pp. 805-16.

Musette P., Bequet D., Delarbre C., et al. (1996), Expansion of a recurrent V beta 5.3+ T-cell population in newly diagnosed and untreated HLA-DR2 multiple sclerosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 22, pp. 12461-6.

Musette P., Galelli A., Truffa-Bachi P., et al. (1996), The J beta segment of the T cell receptor contributes to the V beta-specific T cell expansion caused by staphylococcal enterotoxin B and *Urtica dioica* superantigens. *Eur J Immunol*, **26**, 3, pp. 618-22.

Nankivell B. J., Borrows R. J., Fung C. L., et al. (2003), The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*, **349**, 24, pp. 2326-33.

Nankivell B. J., Chapman J. R. (2006), Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation*, **81**, 5, pp. 643-54.

Natali A., Valcavi P., Medici M. C., et al. (1997), Cytomegalovirus infection in an Italian population: antibody prevalence, virus excretion and maternal transmission. *New Microbiol*, **20**, 2, pp. 123-33.

Naumov Y. N., Naumova E. N., Clute S. C., et al. (2006), Complex T cell memory repertoires participate in recall responses at extremes of antigenic load. *J Immunol*, **177**, 3, pp. 2006-14.

Naumov Y. N., Naumova E. N., Gorski J. (1996), CD4+ and CD8+ circulating alpha/beta T-cell repertoires are equally complex and are characterized by different levels of steady-state TCR expression. *Hum Immunol*, **48**, 1-2, pp. 52-62.

Needleman S. B., Wunsch C. D. (1970), A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol*, **48**, 3, pp. 443-53.

Newell K. A., Larsen C. P. (2006), Tolerance assays: measuring the unknown. *Transplantation*, **81**, 11, pp. 1503-9.

Nikolich-Zugich J., Slifka M. K., Messaoudi I. (2004), The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol*, **4**, 2, pp. 123-32.

Nishio J., Suzuki M., Nanki T., et al. (2004), Development of TCRB CDR3 length repertoire of human T lymphocytes. *Int Immunol*, **16**, 3, pp. 423-31.

Obata F., Yoshida K., Ikeda Y., et al. (2004), Clonality analysis of T cells mediating acute and chronic rejection in kidney allografts. *Transplant Immunology*, **13**, 3, pp. 233-237.

Oksenberg J. R., Stuart S., Begovich A. B., et al. (1990), Limited heterogeneity of rearranged T-cell receptor V alpha transcripts in brains of multiple sclerosis patients. *Nature*, **345**, 6273, pp. 344-6.

Orosz C. (2003), Graft Rejection: Mechanisms. *Encyclopedia of Life Sciences*, pp.

Orsini E., Alyea E. P., Schlossman R., et al. (2000), Changes in T cell receptor repertoire associated with graft-versus-tumor effect and graft-versus-host disease in patients with relapsed multiple myeloma after donor lymphocyte infusion. *Bone Marrow Transplant*, **25**, 6, pp. 623-32.

Osada R., Funkhouser T., Chazelle B., et al. (2002), Shape distributions. *ACM Transactions on Graphics*, **21**, 4, pp. 807-832.

Pannetier C., Cochet M., Darche S., et al. (1993), The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9, pp. 4319-23.

Pannetier C., Even J., Kourilsky P. (1995), T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today*, **16**, 4, pp. 176-81.

Pascual M., Theruvath T., Kawai T., et al. (2002), Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med*, **346**, 8, pp. 580-90.

Pasqual N., Gallagher M., Aude-Garcia C., et al. (2002), Quantitative and qualitative changes in V-J alpha rearrangements during mouse thymocytes differentiation: implication for a limited T cell receptor alpha chain repertoire. *J Exp Med*, **196**, 9, pp. 1163-73.

Patel R., Terasaki P. I. (1969), Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*, **280**, 14, pp. 735-9.

Pearson K. (1905), Das Fehlergesetz und seine Verallgemeinerungen durch Fechner und Pearson. *Biometrika*, **4**, pp. 169-212.

Peggs K. S., Verfuerth S., D'Sa S., et al. (2003), Assessing diversity: immune reconstitution and T-cell receptor BV spectratype analysis following stem cell transplantation. *Br J Haematol*, **120**, 1, pp. 154-65.

Pilch H., Hohn H., Freitag K., et al. (2002), Improved assessment of T-cell receptor (TCR) VB repertoire in clinical specimens: combination of TCR-CDR3 spectratyping with flow cytometry-based TCR VB frequency analysis. *Clin Diagn Lab Immunol*, **9**, 2, pp. 257-66.

Polman C. H., Reingold S. C., Edan G., et al. (2005), Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*, **58**, 6, pp. 840-6.

Port F. K., Merion R. M., Finley M. P., et al. (2007), Trends in organ donation and transplantation in the United States, 1996-2005. *Am J Transplant*, **7**, 5 Pt 2, pp. 1319-26.

Reding R., Gras J., Truong D. Q., et al. (2006), The immunological monitoring of alloreactive responses in liver transplant recipients: a review. *Liver Transpl*, **12**, 3, pp. 373-83.

Reinke P., Prosch S., Kern F., et al. (1999), Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl Infect Dis*, **1**, 3, pp. 157-64.

Reiser J. B., Darnault C., Gregoire C., et al. (2003), CDR3 loop flexibility contributes to the degeneracy of TCR recognition. *Nat Immunol*, **4**, 3, pp. 241-7.

Reiser J. B., Gregoire C., Darnault C., et al. (2002), A T cell receptor CDR3beta loop undergoes conformational changes of unprecedented magnitude upon binding to a peptide/MHC class I complex. *Immunity*, **16**, 3, pp. 345-54.

Rifle G., Mousson C., Martin L., et al. (2005), Donor-specific antibodies in allograft rejection: clinical and experimental data. *Transplantation*, **79**, 3 Suppl, pp. S14-8.

Risitano A. M., Kook H., Zeng W., et al. (2002), Oligoclonal and polyclonal CD4 and CD8 lymphocytes in aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria measured by V beta CDR3 spectratyping and flow cytometry. *Blood*, **100**, 1, pp. 178-83.

Robbins P. F., Dudley M. E., Wunderlich J., et al. (2004), Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy. *J Immunol*, **173**, 12, pp. 7125-30.

Roussey-Kesler G., Giral M., Moreau A., et al. (2006), Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant*, **6**, 4, pp. 736-46.

Rowen L., Koop B. F., Hood L. (1996), The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science*, **272**, 5269, pp. 1755-62.

Rubin R. H. (2001), Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplant Infectious Disease*, **3**, s 2, pp. 1-5.

Rubner Y., Tomasi C., Guibas L. (2000), The Earth Mover's Distance as a Metric for Image Retrieval. *International Journal of Computer Vision*, **40**, 2, pp. 99–121.

Rudick R. A., Lee J. C., Simon J., et al. (2006), Significance of T 2 lesions in multiple sclerosis: A 13-year longitudinal study. *Ann Neurol*, **60**, pp. 236–242.

Sarwal M., Chua M. S., Kambham N., et al. (2003), Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med*, **349**, 2, pp. 125-38.

Sarzotti M., Patel D. D., Li X., et al. (2003), T cell repertoire development in humans with SCID after nonablative allogeneic marrow transplantation. *J Immunol*, **170**, 5, pp. 2711-8.

Sayegh M. H., Carpenter C. B. (2004), Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises. *N Engl J Med*, **351**, 26, pp. 2761-6.

Scherer A., Krause A., Walker J. R., et al. (2003), Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies. *Transplantation*, **75**, 8, pp. 1323-30.

Sebille F., Gagne K., Guillet M., et al. (2001), Direct recognition of foreign MHC determinants by naive T cells mobilizes specific Vbeta families without skewing of the complementarity-determining region 3 length distribution. *J Immunol*, **167**, 6, pp. 3082-8.

Six A. (1991), Identification of aT cell receptor beta chain variable region, V beta 20, that is differentially expressed in various strains of mice. *Journal of Experimental Medicine*, **174**, 5, pp. 1263-1266.

Soiffer R. J., Alyea E. P., Hochberg E., et al. (2002), Randomized trial of CD8+ T-cell depletion in the prevention of graft-versus-host disease associated with donor lymphocyte infusion. *Biol Blood Marrow Transplant*, **8**, 11, pp. 625-32.

Solez K., Colvin R. B., Racusen L. C., et al. (2007), Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant*, **7**, 3, pp. 518-26.

Speiser D. E., Baumgaertner P., Barbey C., et al. (2006), A novel approach to characterize clonality and differentiation of human melanoma-specific T cell responses: spontaneous priming and efficient boosting by vaccination. *J Immunol*, **177**, 2, pp. 1338-48.

Starr T. K., Jameson S. C., Hogquist K. A. (2003), Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*, **21**, pp. 139-76.

Stiller C. R., Sinclair N. R., Abrahams S., et al. (1975), Lymphocyte-dependent antibody and renal graft rejection. *Lancet*, **1**, 7913, pp. 953-4.

Talvensaari K., Clave E., Douay C., et al. (2002), A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood*, **99**, 4, pp. 1458-64.

Terasaki P. I., Ozawa M. (2005), Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial. *Transplantation*, **80**, 9, pp. 1194-7.

Tonegawa S. (1983), Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, **302**, 5909, pp. 575-81.

Torgerson W. S. (1952), Multidimensional Scaling: I Theory and Method. *Psychometrika*, **17**, pp. 401-419.

Toyonaga B., Mak T. W. (1987), Genes of the T-cell antigen receptor in normal and malignant T cells. *Annu Rev Immunol*, **5**, pp. 585-620.

Trusheim M. R., Berndt E. R., Douglas F. L. (2007), Stratified medicine: strategic and economic implications of combining drugs and clinical biomarkers. *Nat Rev Drug Discov*, **6**, 4, pp. 287-93.

Tsutsumi Y., Tanaka J., Miura Y., et al. (2004), Molecular analysis of T-cell repertoire in patients with graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma*, **45**, 3, pp. 481-8.

Tully G., Kortsik C., Hohn H., et al. (2005), Highly focused T cell responses in latent human pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol*, **174**, 4, pp. 2174-84.

Turner S. J., Doherty P. C., McCluskey J., et al. (2006), Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat Rev Immunol*, **6**, 12, pp. 883-94.

Utz U., Biddison W. E., McFarland H. F., et al. (1993), Skewed T-cell receptor repertoire in genetically identical twins correlates with multiple sclerosis. *Nature*, **364**, 6434, pp. 243-7.

van Dongen J. J., Langerak A. W., Bruggemann M., et al. (2003), Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, **17**, 12, pp. 2257-317.

VanBuskirk A. M., Burlingham W. J., Jankowska-Gan E., et al. (2000), Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest*, **106**, 1, pp. 145-55.

Vella J. P., Spadafora-Ferreira M., Murphy B., et al. (1997), Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation*, **64**, 6, pp. 795-800.

Wack A., Cossarizza A., Heltai S., et al. (1998), Age-related modifications of the human alphabeta T cell repertoire due to different clonal expansions in the CD4+ and CD8+ subsets. *Int Immunol*, **10**, 9, pp. 1281-8.

Wagner J. A. (2007), Strategic Approach to Fit-for-Purpose Biomarkers in Drug Development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, pp.

Waksman B. H., Reynolds W. E. (1984), Multiple sclerosis as a disease of immune regulation. *Proc Soc Exp Biol Med*, **175**, 3, pp. 282-94.

Walker L. S., Abbas A. K. (2002), The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol*, **2**, 1, pp. 11-9.

Wolfe R. A., Ashby V. B., Milford E. L., *et al.* (1999), Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med*, **341**, 23, pp. 1725-30.

Wood K. J., Sakaguchi S. (2003), Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol*, **3**, 3, pp. 199-210.

Wu C. J., Chillemi A., Alyea E. P., *et al.* (2000), Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. *Blood*, **95**, 1, pp. 352-9.

Yassai M., Ammon K., Goverman J., *et al.* (2002), A molecular marker for thymocyte-positive selection: selection of CD4 single-positive thymocytes with shorter TCRB CDR3 during T cell development. *J Immunol*, **168**, 8, pp. 3801-7.

Yassai M., Gorski J. (2000), Thymocyte maturation: selection for in-frame TCR alpha-chain rearrangement is followed by selection for shorter TCR beta-chain complementarity-determining region 3. *J Immunol*, **165**, 7, pp. 3706-12.

Yawalkar N., Ferenczi K., Jones D. A., *et al.* (2003), Profound loss of T-cell receptor repertoire complexity in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*, **102**, 12, pp. 4059-66.

Young F. (1985), Multidimensional Scaling. *Encyclopedia of Statistical Sciences*, **5**, pp.

Young G., Householder A. S. (1938), Discussion of a Set of Points in Terms of their Mutual Distances. *Psychometrika*, **3**, pp. 19-22.

Annexes

Annexe 1 : Organisation génique des loci codant pour les chaînes α et β du TCR.

Annexe 2 : Correspondance des nomenclatures de la base IMGT (Lefranc, 2003) et de celle établie par Arden (Arden *et al.*, 1995) pour les gènes V codant pour la chaîne β du TCR.

Annexe 3 : Correspondance entre les familles $V\beta$ analysées par la technologie Tclandscape et les gènes V de la chaîne β du TCR dans la nomenclature établie par Arden (Arden *et al.*, 1995).

Autres articles – Collaborations :

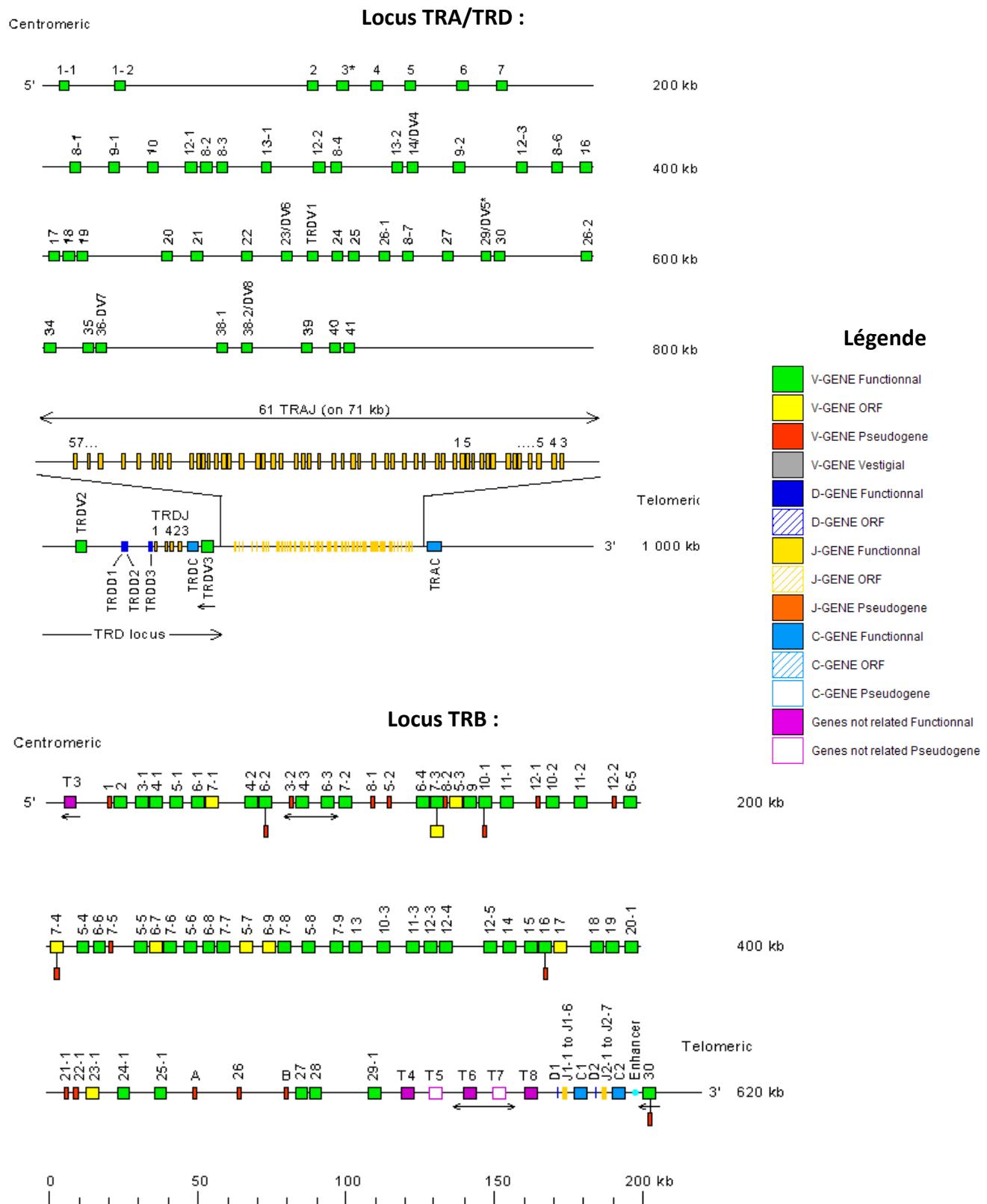
Lair, D., N. Degauque, *et al.* (2007). "Functional compartmentalization following induction of long-term graft survival with pregraft donor-specific transfusion." Am J Transplant **7**(3): 538-49.

Ballet, C., G. Roussey-Kesler, *et al.* (2006). "Humoral and Cellular Responses to Influenza Vaccination in Human Recipients Naturally Tolerant to a Kidney Allograft." Am J Transplant **6**(11): 2796-2801.

Herve, C., L. Le Berre, *et al.* (2006). "Blood T-cell repertoire in idiopathic nephrotic syndrome recurrence following kidney transplantation." Am J Transplant **6**(9): 2144-51.

Annexe 1 : Organisation génique des loci codant pour les chaînes α (TRA) et β (TRB) du TCR chez l'homme.

(Représentations issues de <http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/LocusGenes/#B>)



Annexe 2 : Correspondance des nomenclatures de la base IMGT (Lefranc, 2003) et de celle établie par Arden (Arden *et al.*, 1995) pour les gènes V codant pour la chaîne β du TCR chez l'Homme (pour les autres chaines et espèces voir :

<http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/LocusGenes/#J>).

Nom de gène IMGT (Lefranc, 2003)	Nom de gène (Arden <i>et al.</i> 1995)	Nom de gène IMGT (Lefranc, 2003)	Nom de gène (Arden <i>et al.</i> 1995)
TRBV30	20S1	TRBV7-6	6S3
TRBV29-1	4S1	TRBV6-7	13S8
TRBV28	3S1	TRBV5-5	5S3
TRBV27	14S1	TRBV7-5	6S9
TRBVB	34S1	TRBV6-6	13S6
TRBV26	28S1	TRBV5-4	5S6
TRBVA	33S1	TRBV7-4	6S8
TRBV25-1	11S1	TRBV6-5	13S1
TRBV24-1	15S1	TRBV12-2	8S5
TRBV23-1	19S1	TRBV11-2	21S3
TRBV22	29S1	TRBV10-2	12S3
TRBV21-1	10S1	TRBV12-1	8S4
TRBV20-1	2S1	TRBV11-1	21S1
TRBV19	17S1	TRBV10-1	12S2
TRBV18	18S1	TRBV9	1S1
TRBV17	26S1	TRBV5-3	5S5
TRBV16	25S1	TRBV8-2	32S1
TRBV15	24S1	TRBV7-3	6S1
TRBV14	16S1	TRBV6-4	13S5
TRBV12-5	8S3	TRBV5-2	31S1
TRBV12-4	8S2	TRBV8-1	30S1
TRBV12-3	8S1	TRBV7-2	6S5
TRBV11-3	21S2	TRBV6-3	13S2b
TRBV10-3	12S1	TRBV4-3	7S2
TRBV13	23S1	TRBV3-2	9S2
TRBV7-9	6S4	TRBV6-2	13S2a
TRBV5-8	5S4	TRBV4-2	7S3
TRBV7-8	6S2	TRBV7-1	6S7
TRBV6-9	13S4	TRBV6-1	13S3
TRBV5-7	5S7	TRBV5-1	5S1
TRBV7-7	6S6	TRBV4-1	7S1
TRBV6-8	13S7	TRBV3-1	9S1
TRBV5-6	5S2	TRBV2	22S1
		TRBV1	27S1

Annexe 3 : Correspondance entre les familles V β analysées par la technologie TcLandscape et les gènes V de la chaîne β du TCR chez l'Homme dans la nomenclature établie par Arden (Arden *et al.*, 1995).

Familles V β analysées par TcLandscape	Gènes V β correspondants (Arden <i>et al.</i> , 1995)
V β 1	1S1
V β 2	2S1
V β 3	3S1
V β 4	4S1
V β 5.1	5S1
V β 5.2	5S2, 5S3, 5S4, 5S6
V β 6.1	6S1, 6S2, 6S3, 6S6, 6S8
V β 6.4	6S4
V β 6.5	6S5
V β 7	7S1, 7S2, 7S3
V β 8	8S1, 8S2, 8S3
V β 9	9S1
V β 11	11S1
V β 12.1	12S1
V β 12.2	12S2, 12S3
V β 13.1	13S1, 13S2, 13S3, 13S6, 13S9
V β 13.5	13S5
V β 14	14S1
V β 15	15S1
V β 16	16S1
V β 17	17S1
V β 18	18S1
V β 21	21S1, 21S2, 21S3
V β 22	22S1
V β 23	23S1
V β 24	24S1

Functional Compartmentalization Following Induction of Long-Term Graft Survival with Pregraft Donor-Specific Transfusion

D. Lair^{a,†}, N. Degauque^{a,†}, P. Miqueu^b,
V. Jovanovic^a, M. Guillet^b, E. Mérieau^a,
A. Moreau^c, J.-P. Soulillou^{a,*†} and S. Brouard^{a,†}

^a INSERM, U643, Nantes F-44000, France

^b Tcland S.A, CHU-HÔTEL DIEU, 30 bd. Jean Monnet,
44093 Nantes Cedex 01, France

^c CHU Nantes, Laboratoire d'Anatomopathologie, Nantes
F-44000, France

*Correspondence author: Jean-Paul Soulillou,
Jean-Paul.Soulillou@univ-nantes.fr

Long-term survival is achieved in rat recipients by pregraft donor-specific blood transfusion. We characterized the immune compartments in long-term survivors and analyzed them for capacity to transfer tolerance and protect against chronic rejection. Splenocytes and spleen T cells from treated recipients transferred long-term graft survival to 100% of secondary recipients. In contrast, blood transferred graft survival to only 50% of recipients whereas blood T cells had no effect. An unaltered TCR repertoire, an increase in suppressive CD4⁺CD25⁺ T cells, a decrease in antidonor T-cell proliferative response and normal perforin-granzyme levels were the hallmarks of the spleen T cells. Blood T cells were characterized by a strongly altered CD8⁺ repertoire, normal CD4⁺CD25⁺ T cell number with unchanged antidonor T-cell proliferative response, an activated T-cell phenotype and an increase in perforin-granzyme levels. However, following the transfer of blood or spleen cells into secondary recipients, all grafts displayed chronic rejection. These findings provide evidence that distinct compartments play critical roles in DST recipients. Regulatory cells do not accumulate in blood, which appears to be a reservoir for cytotoxic T cells. Spleen T cells, which display a regulatory-like profile and transfer graft survival, are not able to prevent chronic rejection.

Key words: Compartment, DST, TCR repertoire, tolerance, transplantation

Abbreviations: LEW.1A, Lewis 1A; LEW.1W, Lewis 1W; BN, Brown Norway; TCR, T-cell receptor; PCR, polymerase chain reaction; PBS, phosphate buffered saline; DST, donor-specific transfusion; FCS, fetal calf serum; I.V., intravenously; PBMC, peripheral

blood mononuclear cells; CDR3-LD, complementary determining region 3 length distribution; MLR, mixed leukocyte reaction; Gy, Gray; APC, antigen presenting cells.

Received 17 March 2006, revised 23 October 2006 and accepted for publication 8 November 2006

Introduction

A major goal in transplantation is to achieve an immunological state of allo-antigen donor-specific tolerance in the absence of chronic immunosuppression (1). Although this has been achieved in a number of animal models (2–4), it remains difficult to reproduce in large animals (5,6) and in the clinic (7,8). However, understanding the precise cellular and molecular mechanisms of induction and maintenance of immune tolerance to allografts in adult organisms is of paramount importance for the conception of clinical protocols. It is now known that, in addition to clonal anergy, active suppression may largely contribute to graft survival (9). Thus, CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory activities, the most extensively studied population to date, have been shown to play an important regulatory role in several animal models of autoimmune diseases (10) and transplantation (11). CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory activities *in vitro* have also been found to be present in decreased numbers in the peripheral blood of patients suffering from chronic rejection (12–14). Nevertheless, although several studies have defined the cellular mechanisms by which regulation may develop (9,11,12,15–17), few studies have analyzed their anatomic compartmental distribution and where the ‘tolerization’ phenomenon takes place (18,19).

The efficiency of donor-specific blood transfusion to induce tolerance is well recognized (8,20,21), and several studies have shown the key role of CD4⁺CD25⁺ in this model (2,4,19,22). We used this model to characterize the different immune compartments of long-term allograft survivors and to analyze the capacity of these compartments to transfer tolerance and/or to protect against chronic rejection. We report strongly contrasting properties between spleen, graft and blood cells, suggesting that whereas the spleen may be a reservoir for regulatory T cells, the clonally expanded blood CD8⁺ T cells are potentially cytotoxic T cells. These data strongly suggest that although blood may

†Authors similarly contributed as first and senior investigators.

Functional Compartmentalization of Regulatory Cells

be useful for the identification of new diagnostic tests for tolerance, it may not be informative for the identification of new genes or molecules involved in the mechanisms of tolerance that form the basis for novel therapeutic approaches.

Materials and Methods

Animals

Eight-week-old male, 250 g congenic LEW.1W (RT1^u) and LEW.1A (RT1^a) rats were purchased from Janvier (Savigny/Orge, France). All animals were maintained under standard conditions according to European and Institutional Guidelines.

Model of DST-induced long-term survival of heart allografts

LEW.1A rat recipients were transfused I.V. with 1 mL of blood from a LEW.1V donor 14 and 7 days before transplantation. Heterotopic LEW.1W cardiac transplantation was performed as previously described (23). Graft function was evaluated daily by abdominal palpation and rejection was defined as the day of cessation of heart beating and confirmed by laparotomy.

Purification of T cells and subsets

Spleen cells were recovered from DST-treated recipients and rejecting recipients 100 days after transplantation. Cells were isolated by passing the spleen through a stainless steel mesh. Erythrocytes were depleted by osmotic shock. Mononuclear cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in sterile RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY). T cells were purified from spleen cells using Rat T-cell enrichment columns (R&D Systems, Lille, France). Purity was checked by flow-cytometry and was typically $\geq 94\%$. CD4⁺ or CD8⁺ cells were enriched by negative selection with purified anti-CD8 mAbs or anti-CD4 mAbs, respectively, followed by incubation with Pan Mouse IgG magnetic Dynabeads[®] (Dynal, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Negative selection of CD25⁻ T cells was performed using the Ox39 mAb followed by incubation with Pan Mouse IgG Dynabeads[®] (purity $> 95\%$). Graft infiltrating cells were recovered from DST-treated recipients 100 days after transplantation. The heart graft was washed with PBS-SVF-EDTA, cut into pieces, perfused with Collagenase D for 20 min at 37°C and passed through a stainless steel mesh. The cells were collected, washed twice with PBS-SVF-EDTA, resuspended and filtered. The cell suspension was then deposited onto a Ficoll[®] layer (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) (4 mL) and were washed twice. Blood from DST-treated recipients was collected in EDTA tubes by cardiac puncture. PBMC were separated on a Ficoll[®] layer (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and T cells were purified using the same protocol as described above. Non-T cells were purified from PBMC: mononuclear cells were isolated as described above and T cells depleted by negative selection with a purified anti-TCR $\alpha\beta$ mAb (R7.3) and superparamagnetic beads (Dynal, Oslo, Norway).

Adoptive cell transfer

Spleen cells, spleen T cells, PBMC, blood T cells and graft infiltrating cells from DST-treated recipients, naive LEW.1A rats and rejecting recipients were injected I.V. on the day of transplantation into a subirradiated (4.5 Gy whole body irradiation) LEW.1A secondary naive recipient 3 days before transplantation.

Flow cytometry analysis

Cells from DST-treated recipients, naive rats and rejecting recipients were incubated for 30 min at room temperature with FITC-conjugated W3/25 mAb (anti-CD4) (Serotec Laboratories, Oxford, UK) and the biotinylated antibodies R7-3 (anti-TCR $\alpha\beta$) and OX39 (anti-CD25 α chain) (Bioatlantic, Nantes, France), and were subsequently revealed by Streptavidine-PE (Im-

munotech, Beckman Coulter, Marseille, France). Cells were washed twice in PBS and two-color staining analyzed by a FACSCalibur using Cellquest Pro[®] software (BD Biosciences, Mountain View, CA). The same protocol was used for complete phenotyping of cells from DST-treated recipients, naive rats and rejecting recipients. The FITC-conjugated antibody R7-3 (anti-TCR $\alpha\beta$) (Bioatlantic, Nantes, France) and the following biotinylated antibodies were used: OX34 (anti-CD2), W3/25 (anti-CD4), OX19 (anti-CD5), OX8 (anti-CD8), JJ319 (anti-CD28), OX33 (anti-CD45RA), OX22 (anti-CD45RC), OX85 (anti-CD62L), OX26 (anti-CD71), OX7 (anti-CD90), OX40 (anti-CD134), OX2 (anti-CD200), OX6 (anti-RT1B class II), OX17 (anti-RT1D class II) and OX62 (anti-integrin αE) (Bioatlantic, Nantes, France), and revealed by Streptavidine-PE.

Mixed leukocyte reactions and inhibition assays

Irradiated (35 Gy) antigen-presenting cell-enriched cell populations from donor-type LEW.1W or third-party BN (RT1.^b) rats served as stimulator cells. One hundred thousand purified responder T cells from the spleen and blood of DST-treated recipients, naive rats and 2×10^4 irradiated stimulatory cells were plated in 96-well round-bottom plates in triplicate in 200 μ L of RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 5×10^{-5} M 2-ME, 1 mM sodium pyruvate (Life Technologies), 1% non-essential amino acids, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 10% heat-inactivated FCS (Life Technologies) and for blood cell culture, L-NMMA (N-methyl L-arginine, Sigma-Aldrich) an iNOS inhibitory was added (2.5%). Cultures were incubated at 37°C, in 5% CO₂, for 5 days and pulsed for the final 8 h with 0.5 μ Ci of [³H]TdR (Amersham, Les Ulis, France). The cells were then recovered on glass fiber filters and [³H]TdR incorporation was measured using standard scintillation procedures (Packard Institute, Meriden, CT). For inhibition assessment, increasing numbers of CD25⁺ T lymphocytes purified from naive LEW.1A rats or DST-treated recipients were added to the MLR using naive CD25⁻ T cells as responder cells. Cultures were pulsed with [³H]TdR for the final 12 h of culture. For the inhibition assay, the results were expressed as specific count per minute [c.p.m. MLR – (c.p.m. DC alone + c.p.m. added cells alone + c.p.m. CD25⁻ alone)].

Histology analysis

Tissue sections (heart grafts) were embedded in paraffin and colored with hematoxylin phloxin safran (HPS). The following quantitative criteria were analyzed: mononuclear cell interstitial inflammation (0: no interstitial parenchyma inflammation, 1: 1–5%, 2: 5–25%, 3: 25–50%, 4: >50%), interstitial fibrosis (0: interstitial fibrosis in up to 5% of the graft area, 1: mild 6–25%, 2: moderate 26–50%, 3: severe >50%), vascular narrowing (0: no vascular changes, 1: vascular narrowing of up to 25% of the luminal area, 2: 26–50%, 3: severe vascular changes above 50%), vasculitis (0: no vascular lesions, 1: mild endothelitis, 2: inflammatory endarteritis, 3: fibrous endarteritis) and percentage of pathological arterial sections per heart.

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was isolated by the Trizol reagent procedure (Invitrogen). Two micrograms RNA were reverse transcribed using a cDNA synthesis kit (Roche, Indianapolis, IN) and diluted to a final volume of 100 μ L.

TCR repertoire analysis

Complementary determining region 3 length distribution (CDR3-LD) alteration was analyzed using Immunoscope[®] software (24). Global CDR3-LD alterations were measured according to Gorochov et al. (25). The profiles obtained from 11 naive rats were used as controls. V β /HPRT transcript ratios were measured by real-time PCR (26). Data were displayed as a bidimensional TopView or as a tridimensional TcLandscape[®] (27,28) where the x-axis displays the 21 V β families, the z-axis shows the V β transcript/HPRT transcript ratios and the y-axis gives the 13 possible CDR3 lengths per V β family. Percentages of alterations were represented as a color code, ranging from deep blue (values -30%) to dark red (30%) in the integrated landscapes

(27,28). MatLab® 5.3 software (The MathWorks Inc, Natick; Maryland) was used to compute and display the data.

Cytokine transcript analysis

Transcript analysis was performed using real-time quantitative PCR for HPRT, C β , IL-2, IFN- γ , IL-13, TGF- β 1, IL-10 and TNF- α . A constant amount of cDNA was amplified in 25 μ L of 10X SYBR® Green PCR Core Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA). Amplifications were performed in an ABI Prism 7900-Perkin Elmer Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) as described elsewhere (16). The exact cDNA copy number was deduced from the comparison of measured fluorescence with the standard curve and standardized against the level of HPRT transcripts. Primer sequences are available upon request.

Results were expressed as the intrasample ratio of cytokine to HPRT mRNA copy number. Perforin-1 and granzyme quantification was performed using labeled TaqMan® Gene Expression Assays (granzyme B: assay ID Rn00821752'g1 and perforin-1: Rn00569095'm1, Applied Biosystems).

Statistical analyses

Different statistical approaches were used to compare the CDR3-LD alterations in the blood, spleen and graft of DST-treated recipients, naive rats and rejecting recipients. A box-and-whisker plot representation was used to more easily visualize the global differences between the groups. The Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's post hoc test was performed to compare perturbations between two or three groups, respectively. Statistical significance was considered for $p < 0.05$. Graft survival was analyzed using the Kaplan-Meier method, p-values were considered as significant when <0.05 . The Mann-Whitney test was performed to compare transcript accumulation, p-values were considered significant when <0.05 . Analyses were performed using the STATGRAPHICS PLUS 5.1 software (Rockville, Maryland, Manugistics Inc.).

Results

Numerous reports have shown that regulatory T cells differentiate rapidly in the spleen, graft (19) and lymph node (19,29) after allotransplantation and in long-term recipients (>100 days) (30) following various maneuvers aimed at inducing tolerance. The regulatory mechanisms described have also been reported to be dependant on the strain combinations used (20,31,32). In this study, we investigated the possibility of identifying the regulatory T-cell population in the different compartments from DST-treated recipients through a combined investigation of the T-cell TCR V β repertoire, phenotype and function.

Compartmentalization of TCR usage in the blood and spleen of DST-treated recipients

At day 100 posttransplantation, the spleen, blood and graft TCR V β repertoires of DST-treated recipients were compared to those of naive and untransfused LEW.1A control rats that had rejected a LEW.1W heart graft 100 days previously (6.4 ± 1.7 days after transplantation; referred to as rejecting recipients in the manuscript).

The spleens of DST-treated recipients displayed a roughly Gaussian TCR repertoire usage ($14.6 \pm 3.4\%$ alteration) with low V β /HPRT ratios (13.5 ± 10.6) (Figure 1A). These

patterns were not statistically different from those of naive rats ($7.3 \pm 1.5\%$ alteration with low V β /HPRT ratios) (*data not shown*). We have recently described that both CD25 $^+$ and CD25 $^-$ regulatory T cells can be found 100 days after transplantation in this model, and that CD25 $^-$ T cells displaying *in vitro* suppressive activity are able to prolong graft survival in a donor-antigen-specific manner when transferred to a secondary, untreated host (Degauque et al., submitted). We thus studied the T-cell repertoire of purified CD25 $^+$ and CD25 $^-$ T cells. Both spleen CD25 $^+$ and CD25 $^-$ T cells from DST-treated recipients and naive rats exhibited a Gaussian CDR3-LD usage (Figure 1B).

The graft from DST-treated recipients displayed a slightly altered TCR repertoire usage ($21.2 \pm 4.3\%$ alteration) with very low V β /HPRT ratios (1 ± 1.2), probably due to the low number of infiltrating T cells within the graft (Figure 2A).

In contrast, blood T cells from DST-treated recipients displayed a highly altered CDR3-LD profile ($27.8 \pm 8\%$ alteration; Figure 3A) compared to naive rats (*data not shown*) and to rejecting recipients ($15.2 \pm 3\%$) (Figure 3B), with high V β /HPRT ratios (35.9 ± 23.7). Such a profile depicted a highly restricted repertoire and clonal selection. To better characterize the subpopulation that had an oligoclonal repertoire, blood CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells were isolated from DST-treated recipients and analyzed separately. Blood CD4 $^+$ T cells displayed an essentially resting repertoire (Figure 3C; $14.6 \pm 3.2\%$ alteration) with most clonal selections concerning blood CD8 $^+$ T cells (Figure 3D; $22.9 \pm 2\%$ alteration) (Figure 3E; $p < 0.05$).

To analyze the presence of the same V β clones in different animals but also in the different compartments within the same recipient, the graft, blood and spleen were taken from four rats 100 days after transplantation (Figure 2B). We have previously shown that, in a similar strain combination, the induction of tolerance following DST is associated with a public V β 18J β 2.7 monoclonal expansion within the graft infiltrating CD8 $^+$ T cells (33). Here, day 100 post-transplantation, this particular clone was only observed in the blood of one of the four animals and was only observed in half of the graft of the recipients. CDR3 lengths of altered V β families (V β 5, 6, 8.2, 11 and 14) identified in the blood were next compared between DST-treated recipients. As shown in Figure 4, although recurrent blood V β and CDR3 length alterations were found in the DST-treated recipients, no public alteration was reproducibly found in all the animals tested.

Finally, the box-and-whisker plot method was used to globally compare the TCR V β repertoire of the blood T cells purified from DST-treated recipients, naive animals and rejecting recipients. This method is helpful for the handling of large data sets. The data in Figure 5 confirm that the TCR V β repertoires in the blood T cells of DST-treated recipients were globally more altered than those of naive or rejecting recipients ($p < 0.01$).

Functional Compartmentalization of Regulatory Cells

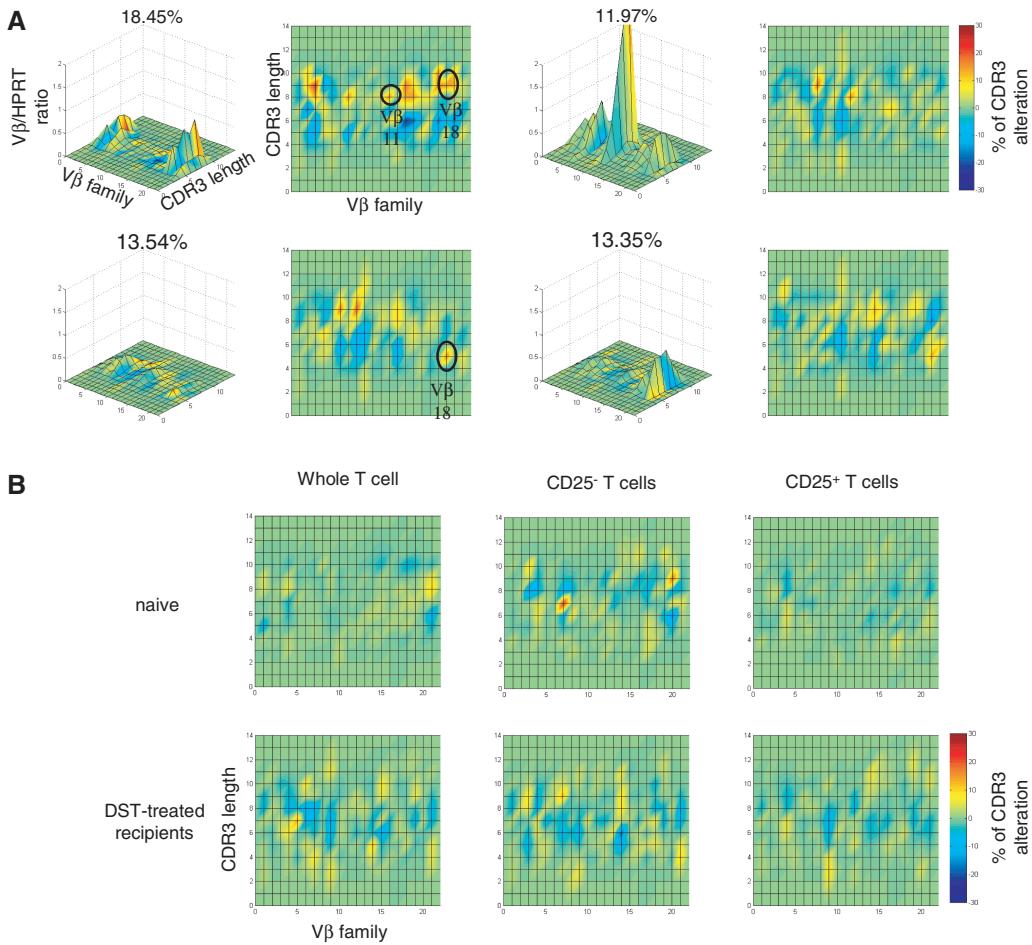


Figure 1: TCR repertoire in different spleen cell subsets of DST-treated recipients. (A) TCR repertoire analysis in spleens ($n = 4$) of DST-treated recipients (left-hand panel: T-cellscapes; right-hand panel: TopViews). The percentages indicate the global variation of CDR3-LD compared to naive animals (average of 11 CDR3-LD naive profiles). Circles indicate recurrent V β families. (B) TCR repertoire analysis of T cells, CD25 $^+$ T cells and CD25 $^-$ T cells from the spleens of DST-treated recipients and naive rats ($n = 3$).

Altogether, these data showed that DST-treated recipients displayed a highly altered and heterogeneous blood CD8 $^+$ TCR repertoire but a Gaussian spleen TCR repertoire suggesting a compartmentalization of TCR repertoire usage. These data also showed that transplantation performed in inbred rat strains differing only in their MHC led to private TCR repertoire usage.

Differential capacity of spleen, graft and blood T and non-T cells to transfer long-term survival

Without any treatment, 80% of subirradiated untreated LEW.1A recipients rejected their grafts (Figure 6). Adoptive transfer of 100×10^6 splenocytes from DST-treated recipients indefinitely prolonged graft survival in all subirradiated untreated LEW.1A recipients (Figure 6). Identical results were obtained when purified spleen T cells (30×10^6 , $n = 6$) from DST-treated recipients were transferred to secondary recipients (Figure 6). In contrast, $20-40 \times 10^6$ PBMC from DST-treated recipients induced long-term

graft survival in only 50% of secondary recipients (Figure 6). Purified blood T cells (20×10^6 , $n = 4$) had no effect (Figure 6). In contrast, the adoptive transfer of 20×10^6 blood non-T cells ($n = 10$) from DST-treated recipients induced an indefinite graft survival in 40% of secondary subirradiated LEW.1A recipients. The adoptive transfer of 5×10^6 graft infiltrating cells ($n = 2$) from DST-treated recipients did not transfer long-term graft survival to secondary subirradiated LEW.1A recipients (*data not shown*).

As a control, transfer of 100×10^6 splenocytes, 40×10^6 purified spleen T cells and 20×10^6 blood non-T cells from rejecting recipients ($n = 3$) or naive LEW.1A rats ($n = 3$) had no significant effect (12 ± 1 days and 13 ± 2 days, respectively) on graft survival prolongation. Altogether, these data showed that long-term graft survival may be induced in 100% of subirradiated secondary graft recipients by splenocytes and spleen T cells and in 50% of animals by PBMC from DST-treated recipients only. Blood T cells had

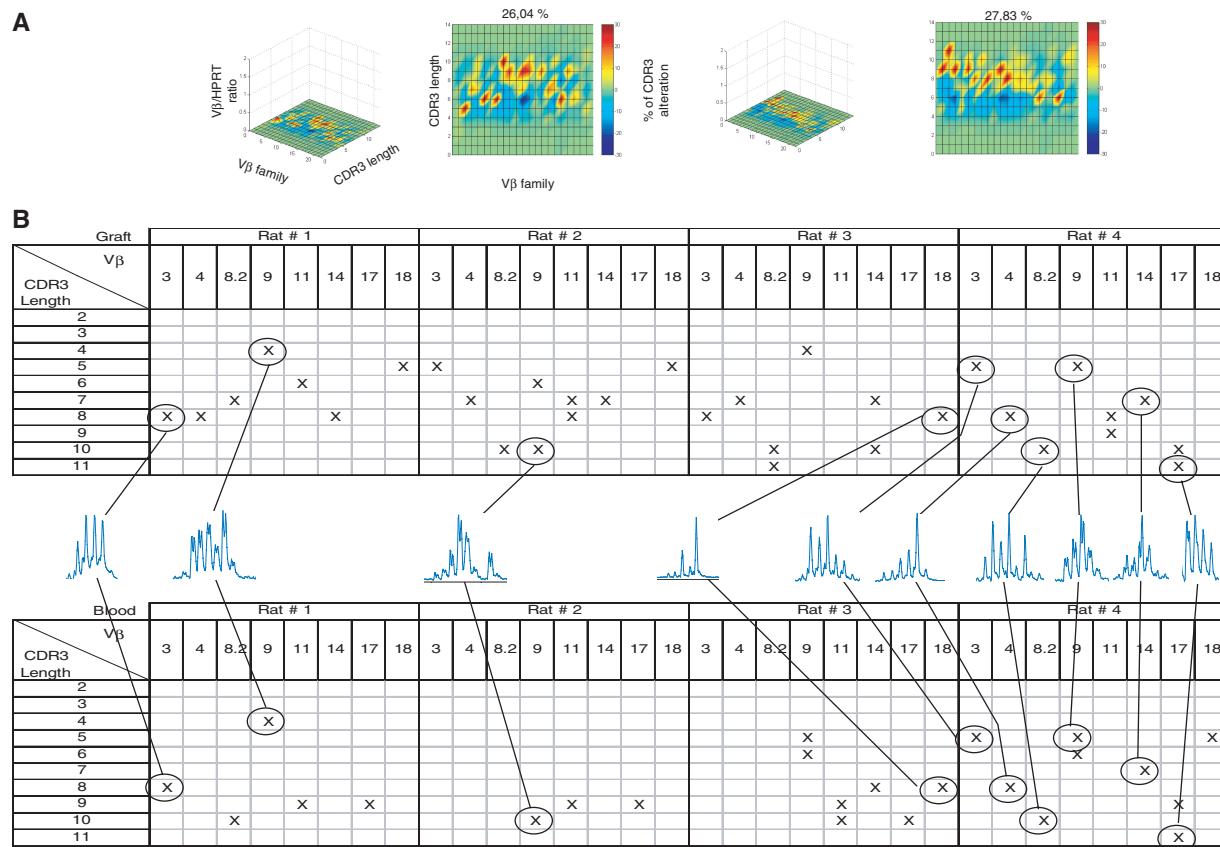


Figure 2: TCR repertoire analysis of the graft infiltrating cells and blood of the same DST-treated recipients. (A) TCR repertoire analysis of the graft infiltrating cells of DST-treated recipients ($n = 2$; left-hand panel: T-cell landscapes; right-hand panel: TopViews). The percentages indicate the global variation of CDR3-LD compared to naive animals (average of 11 CDR3-LD naive profiles). (B) Recurrent V β and CDR3 length distributions within the blood and graft from same DST treated recipients ($n = 4$).

no effect, suggesting that the blood T cells with an oligoclonal repertoire were not selected regulatory T cells.

The long-term surviving grafts of secondary recipients display signs of chronic rejection

DST is known to result in a complex state where histological lesions of chronic graft rejection coexist with mechanisms controlling acute host antidonor immune responses (34). Thus, the possible occurrence of chronic graft rejection lesions was also analyzed in the secondary recipients that survived 100 days after splenocyte or PBMC cell transfer from DST-treated recipients (Figure 7). All long-term surviving grafts from secondary recipients that had received blood or spleen cells displayed histological lesions of chronic rejection (Figure 7A and B) with inflammatory vasculitis and interstitial fibrosis (Figure 7C).

Spleen T cells from DST-treated recipients proliferate poorly against donor-antigen cells whereas blood T cells proliferate similarly to naive T cells.

In the DST-treated recipients, regulatory T cells differentiated in different compartments, as assessed by their

various capacities to transfer long-term survival to secondary recipients. To investigate the regulatory mechanisms taking place, we compared the alloreactive response of T cells from DST-treated recipients taking into account their origin (blood or spleen). When cultured against donor APC, purified spleen T cells from DST-treated recipients proliferated significantly less ($p < 0.05$) than those from naive rats (Figure 8A). In contrast, no difference was observed when purified blood T cells from DST-treated recipients or naive LEW.1A rats were cultured with naive donor APC (Figure 8A).

DST-treated recipients displayed increased numbers of spleen CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells and normal numbers of blood CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells.

An increase in the percentage of regulatory CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells has been described in various tolerance-related models (2). We performed an exhaustive cell phenotype analysis in the spleen and blood of DST-treated recipients compared to naive and rejecting recipients (Figure 8B). A significant increase in CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells was observed in the spleen of DST-treated recipients ($10.8 \pm 2.8\%$) as

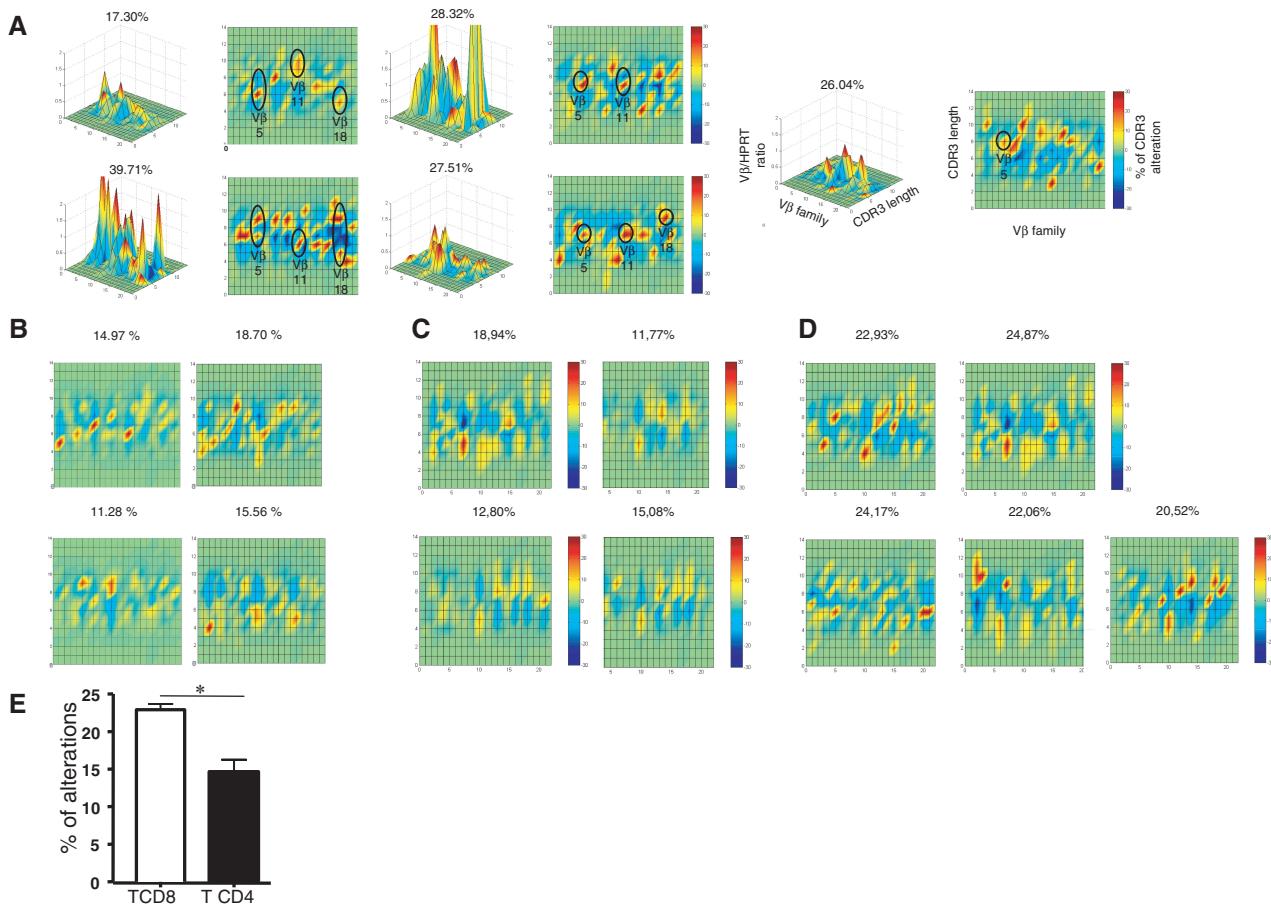


Figure 3: TCR repertoire in the PBMC of DST-treated recipients and rejecting recipients and in CD4⁺ and CD8⁺ T cells of DST-treated recipients. (A) TCR repertoire analysis in the blood of DST-treated recipients ($n = 5$; left-hand panel: T-cellscapes; right-hand panel: TopViews). The percentages indicate the global variation of CDR3-LD compared to naive animals (average of 11 CDR3-LD naive profiles). Circles indicate recurrent Vβ families. (B) TCR repertoire analysis in the blood (TopViews) of rejecting recipients ($n = 4$). (C) CD4⁺ ($n = 4$) and (D) CD8⁺ ($n = 5$) T-cell TCR repertoire analysis TopViews in the blood of DST-treated recipients. The percentages indicate the global variation of CDR3-LD compared to naive animals (average of 11 CDR3-LD naive profiles). (E) Percentage of alteration in CD8⁺ and CD4⁺ T cells in the blood of DST-treated recipients.

compared to naive rats ($5.3 \pm 0.8\%$, $p < 0.05$) and rejecting recipients ($6.5 \pm 3.6\%$). In contrast, no such difference was observed in the blood of DST-treated recipients where, if anything, there was a tendency toward decreased CD4⁺CD25⁺ T cell numbers ($3.9 \pm 1\%$ vs. $6.3 \pm 1.2\%$ in naive rats and $10.5 \pm 3.8\%$ in rejecting recipients (Figure 8B). No difference was observed for any of the other markers tested (see Materials and Methods) in the spleen or the blood from the different groups (*data not shown*).

CD4⁺CD25⁺ spleen T cells from DST-treated recipients exhibit inhibitory properties similar to CD4⁺CD25⁺ spleen T cells from naive animals.

Because DST-treated recipients exhibit an increased percentage of CD4⁺CD25⁺ spleen T cells, we assessed whether their ability to inhibit proliferation of naive CD25⁻ T cells was also increased. Proliferation of naive CD25⁻

T cells against LEW.1W APCs was tested with or without CD4⁺CD25⁺ spleen T cells from either DST-treated recipients or naive rats. CD4⁺CD25⁺ spleen T cells from both DST-treated recipients and naive rats significantly and dose-dependently inhibited the alloreactive response of naive CD25⁻ T cells in the coculture system (Figure 8C). Thus, DST-treated recipients exhibited an increased number of CD4⁺CD25⁺ spleen regulatory T cells with intact suppressive function on a cell per cell basis.

The blood T cells of DST-treated recipients display an activated phenotype

The C β , IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-13, TGF- β 1 and TNF- α transcript levels were compared in the spleen ($n = 3$), blood ($n = 5$) and graft ($n = 4$) of DST-treated recipients (Figure 9A) using quantitative RT-PCR. The blood of DST-treated recipients showed consistently higher levels of C β , IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-13, TGF- β 1 and TNF- α cytokines than splenocytes

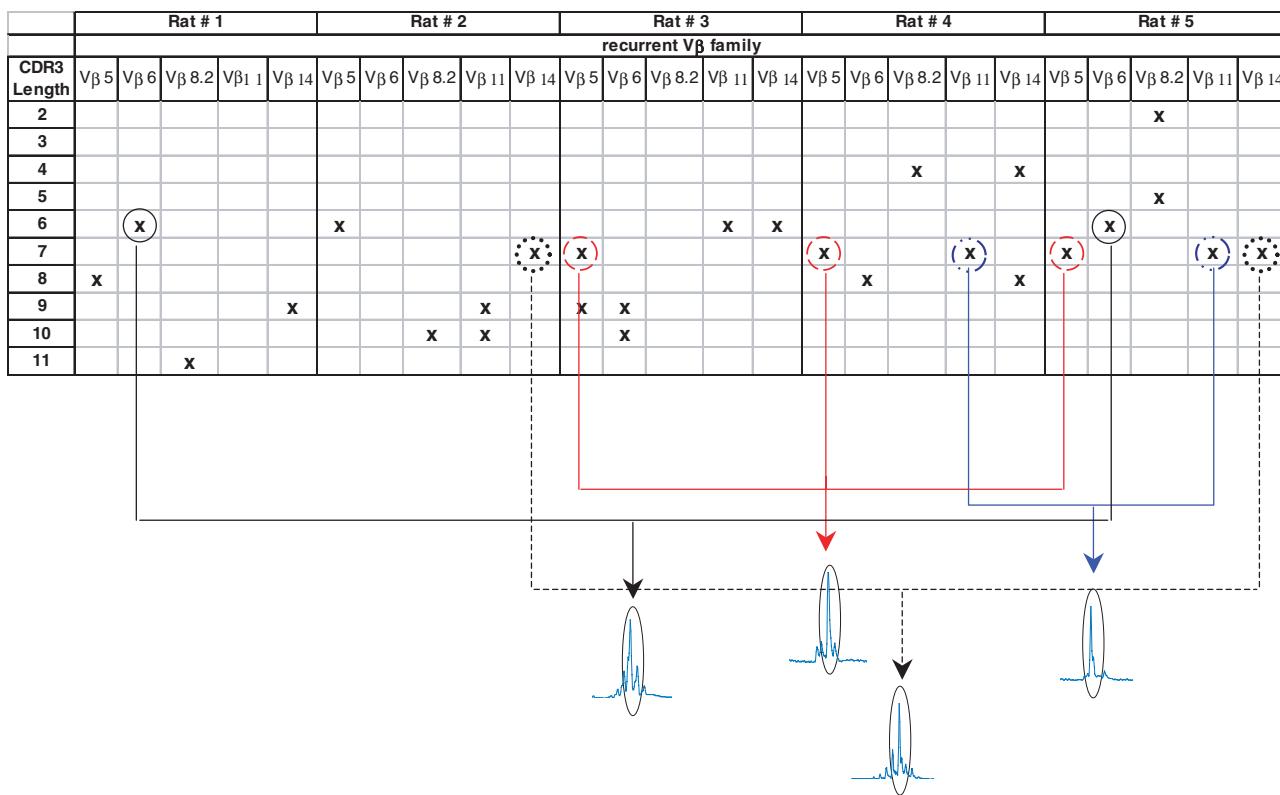


Figure 4: Recurrent V β and CDR3 length alterations in the blood of DST-treated recipients.

and grafts, although statistical significance was reached only for IFN- γ ($p < 0.05$) (Figure 9A). This suggests an active phenotype of blood cells from DST-treated recipients. Moreover, low transcript levels of perforin and granzyme were observed in the spleen and the graft from DST-treated recipients 100 days after transplantation whereas the blood accumulated significantly higher levels of cytotoxic transcripts ($p < 0.05$; Figure 9A and B).

Altogether, these data showed that spleen T cells in DST-treated recipients were characterized by a Gaussian TCR V β repertoire, were hyporesponsive to donor APC, displayed suppressive activity *in vitro* and were able to transfer long-term survival to secondary recipients. In contrast, blood T cells displayed a highly oligoclonal T cell repertoire, retained their alloreactivity both *in vitro* and *in vivo*, had an activated-cytotoxic (perforin +, granzyme +) phenotype and were unable to transfer long-term survival.

Discussion

Tolerance in transplantation is associated with inactivation of the recipient's immune response to donor antigens, while retaining normal responsiveness to other unrelated antigens (35). In humans, the beneficial effect of DST on allograft survival was recognized several decades

ago (8,20,21) and DST has become a classical model to induce tolerance or long-term graft acceptance in both experimental rodent models and humans (36–38). Nevertheless, the immunological mechanisms of the 'DST effect' are only poorly understood, although it is clear that leukocyte-depleted blood transfusions are ineffective (39). The mechanisms underlying the beneficial effects of DST may include clonal deletion (40), anergy (15), generation of suppressive/regulatory cells (2,9,37), regulation of cytokine production (34,41,42), microchimerism (43,44) or a combination thereof (32). The presence of donor-committed cytotoxic T lymphocyte infiltration in allografts early after DST does not favor a major role for clonal deletion of alloreactive cells (4,41,45–47). Moreover, once established, DST-induced tolerance can be perpetuated by adoptive transfer of regulatory cells into secondary naive recipients (2,4). This phenomenon, which is linked to the 'education' of the naive recipient's immune cells and can be transferred over multiple generations to secondary recipients (2,4), is referred to as 'infectious tolerance' (48–50) and implicates the presence and role of regulatory/suppressive cells.

There is now a large body of evidence showing that, whereas CD8 $^{+}$ T cells may play a role (17,51–53), CD4 $^{+}$ T cells are the major regulatory population involved in the DST effect (2,4,22). Nevertheless, their mode of action, their compartmentalization and the extent to which they

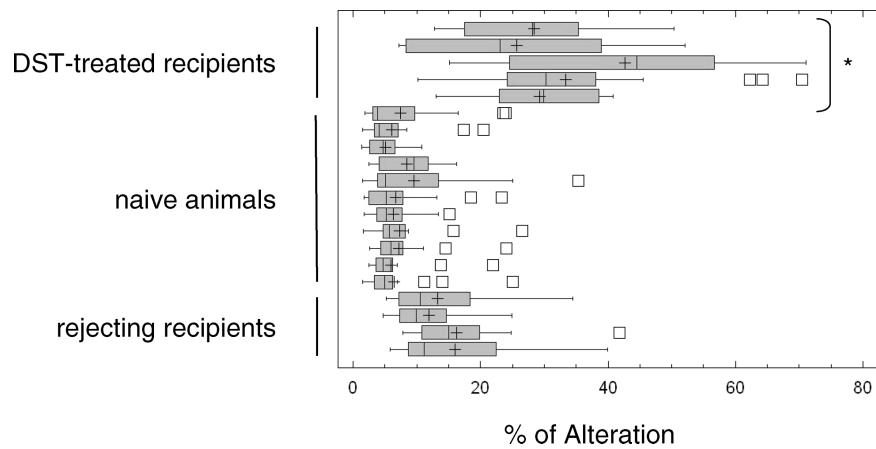


Figure 5: Synthetic representation of the percentages of V β family alterations in the blood T cells of DST-treated recipients, naive recipients and rejecting recipients represented per individual by the box-and-whisker plot method. The median of the data is represented by a vertical line. The two whiskers represent the lower and the upper quartiles. Points beyond the whiskers are considered as outliers (squares). The mean is indicated by a cross.

efficiently inhibit effectors or cytotoxic cells, thereby preventing chronic rejection, remains obscure (34,54). Moreover, it has been clearly shown that some genes found in the blood of renal transplant patients may serve as biomarkers and may not be found in the graft (55).

The presence of regulatory cells in the different immune compartments of DST-treated recipients was reported by several studies showing that tolerance can be transferred with splenocytes, lymph nodes, graft infiltrating cells or even blood (4,22,56–59). In this study, we showed that both spleen cells and peripheral blood mononuclear cells from DST-treated recipients were able to transfer long-term graft survival to 100% and 50% of naive host recipients, respectively. We also showed that the nature of the regulatory cells differs between the two

compartments. Whereas T cells purified from the spleen were able to transfer long-term survival, purified blood T cells failed to do so and long-term graft survival was reached only after transfer of blood non-T cells. Moreover, T cells varied in their phenotypic and functional characteristics between these two compartments: blood T cells had an activated phenotype with increased perforin/granzyme transcript levels and a preserved proliferative response to donor antigens. These cells also exhibited a highly altered TCR repertoire, which is neither related to the DST priming (*data not shown*) nor consecutive to previous acute rejection episodes. T cells from splenocytes, on the other hand, displayed an increased proportion of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells with suppressive properties *in vitro*, a decreased proliferative response to donor antigen and an unaltered TCR repertoire.

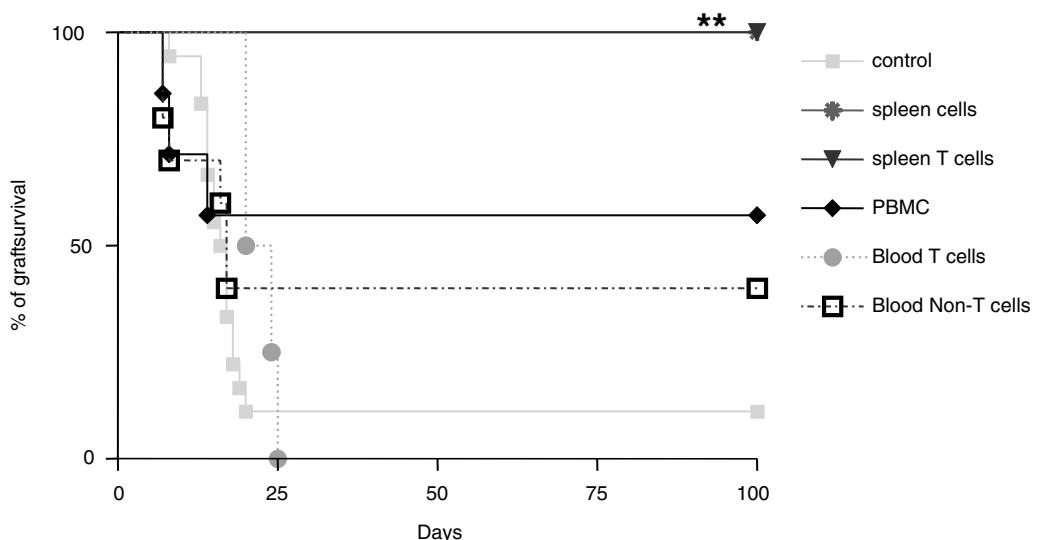


Figure 6: Graft survival after cell transfers into naive secondary LEW.1W recipients. Spleen (total and purified T) cells, blood (total, purified T and non T) cells from DST treated recipients 100 days after transplantation were transferred to secondary irradiated rat recipients. As a control, transfer of 100×10^6 splenocytes or 40×10^6 purified spleen T cells from rejecting recipients ($n = 3$) or naive LEW.1A rats ($n = 3$) had no significant effect (12 ± 1 , 13 ± 2 days, respectively) on graft survival prolongation.

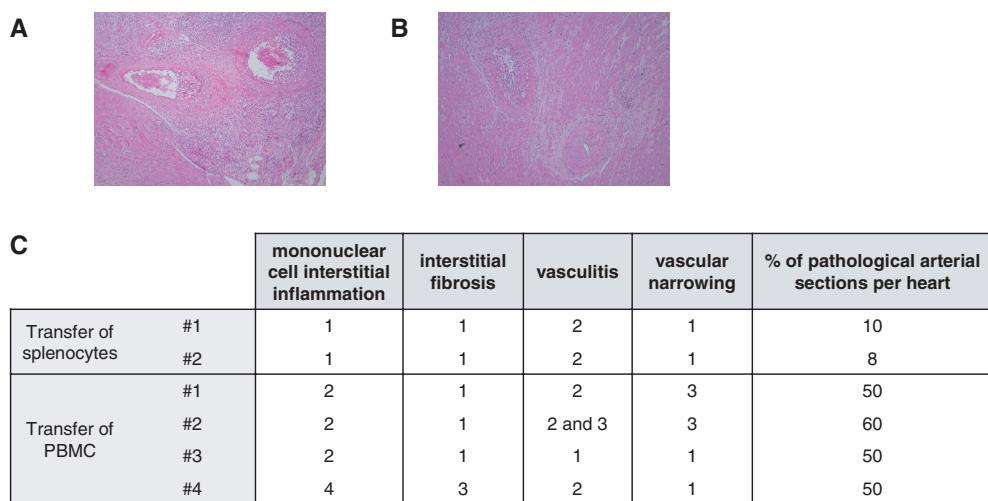


Figure 7: Histological analysis of grafts from secondary rat recipients after spleen cell transfer (A) and PBMC transfer (B) from DST-treated recipients (C). The table shows Banff scores for mononuclear cell interstitial inflammation, interstitial fibrosis, vasculitis, vascular narrowing and percentage of pathological arterial sections per heart.

Although the contribution of regulatory T cells to the transfer and maintenance of long-term graft acceptance in this model is well established (4,60), the manner in which regulatory T cells control effector mechanisms and the degree to which they protect against (or contribute to) chronic

rejection is unclear. We showed that spleen T cells, which displayed a regulatory-like profile and transferred long-term graft survival to secondary recipients, were unable to prevent the onset of chronic rejection. Several other studies have shown that histological signs of chronic rejection

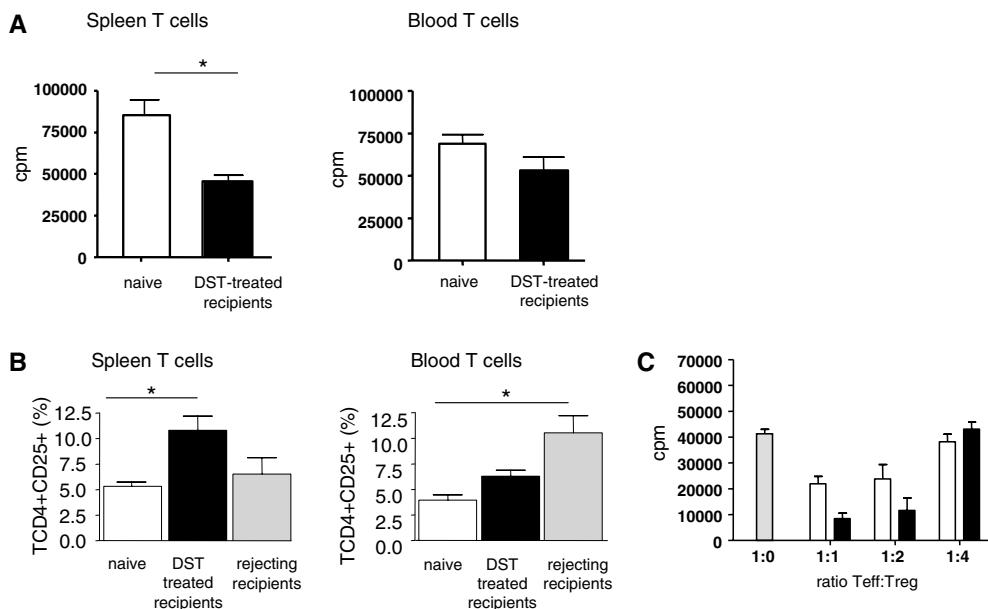


Figure 8: (A) Proliferative response of spleen T cells and blood T cells from DST-treated recipients or naive LEW.1A rats against LEW.1W APC. (The results of one experiment representative of four are shown.) (B) Percentage of CD4+CD25+ T cells in the spleen and blood of naive LEW.1A rats, DST-treated recipients and untreated recipients recovered on day 100 post-transplantation. Results are representative of four independent experiments and bars represent mean \pm SEM. Statistical significance was assessed using the Mann-Whitney test. (C) No increase in suppressive function of the spleen CD4+CD25+ T cells from DST-treated recipients: various ratios of spleen CD4+CD25+ T cells from DST-treated recipients (black bar) or naive (white bar) LEW.1A rats, were added to naive CD25- T cells from LEW.1W rats in MLRs. Bars represent mean \pm SEM and the results are representative of four independent experiments.

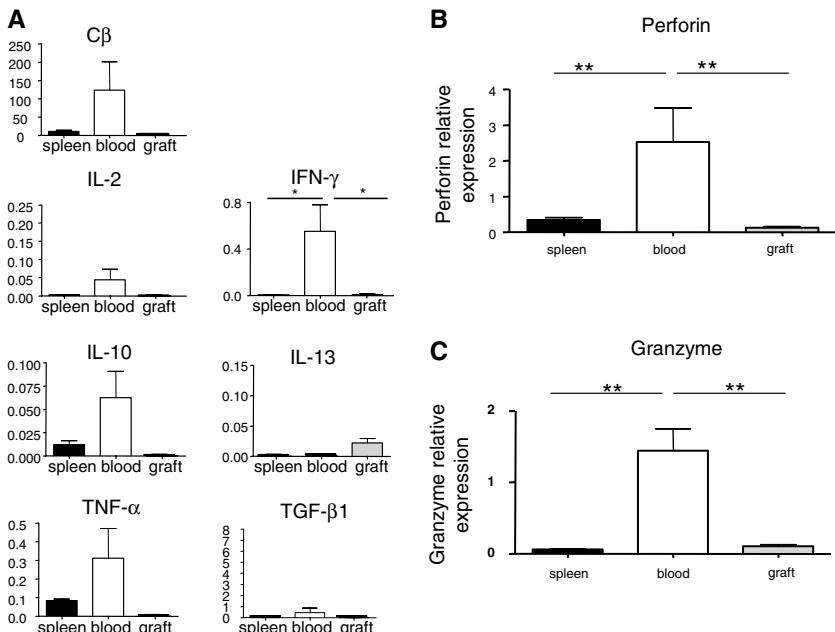


Figure 9: (A) Cytokine transcript accumulation in the spleen ($n = 5$), blood ($n = 5$) and graft ($n = 4$) of DST-treated recipients. Bars represent mean \pm SEM. Statistical significance was assessed using the Mann–Whitney test. (B) Perforin and (C) granzyme transcript levels in the blood, spleen and graft of DST-treated recipients. Bars represent mean \pm SEM. Statistical significance was assessed using the Mann–Whitney test.

develop in apparently tolerant animals, in models of both heart (34,42) and kidney (61) transplantation, whereas chronic rejection was absent in syngeneic grafts (34). In the present study, both DST-induced tolerant recipients and secondary recipients displayed severe signs of chronic rejection. This observation suggests that the potentially regulatory T cells are not sufficient to protect the graft from chronic rejection. However, we cannot exclude the possibility that regulatory T cells able to inhibit acute rejection (as shown by the effect of DST itself or by the transfer of cells from DST-treated recipients) can also contribute to chronic rejection. Indeed, tolerance has been shown to be an ‘active’ phenomenon associated with cytotoxic cells directed against donor cells (62) and has also been shown to develop in the context of a Th2 polarization, which has itself been associated with the development of chronic rejection lesions in functioning grafts (34,42). In our model, no Th1/Th2 deviation was observed in DST-treated recipients thus suggesting that the potentially regulatory T cells are probably incapable of protecting the graft from chronic rejection following DST induction.

Altogether, we showed that DST treatment results in the differentiation of regulatory cells in spleen T cells and in the non-T cell compartment in the blood, since blood T cells did not transfer graft survival prolongation to secondary recipients. These data suggest that blood is not a reservoir for regulatory T cells and that the selected clonal expansions within the TCR V β repertoire (particularly CD8 T cells) represent potentially cytotoxic T cells rather than regulatory T cells.

Interestingly, the V β 18 clonotype previously found in the grafts of DST recipients as early as day 5

post-transplantation (33) was found in the graft and blood of 2/4 and 1/4 DST-treated recipients at day 100 post-transplantation in this study. However, these data do not contradict those from our previous studies (33) since in the previous studies only grafts were analyzed and the analyses were performed during the induction phase of tolerance at day 5 post-transplantation. The present analysis was performed at day 100 post-transplantation, that is, during the maintenance phase of tolerance. The fact that these two processes (induction and maintenance) may result in different patterns is likely due to the different mechanism involved, for instance direct or indirect pathways. However, one must keep in mind that the recipients displayed different and individual TCR repertoires despite being inbred over multiple generations and despite the donors and recipients differing only in MHC class I and II molecules. The effect of environmental factors on this phenomenon remains questionable since all donors and recipients were confined in EOPS pathogen-free conditions. The fact that TCR biases remained mainly private suggests that a similar determinant can be recognized by different types of clones which have been selected over time. This is consistent with several lines of data showing that a variety of peptides can interact with the same TCR, and that different TCRs can interact with the same peptide (63–65). These data also suggest that the blood, the main compartment analyzed in the clinic in the search for new biomarkers, may provide a poor representation of the true immunological mechanisms involved in tolerance induction and maintenance. As suggested in previous studies, the presence of certain bio-markers identified as ‘potential tolerance markers’ may also be a consequence of activation status (66) and may even be specific to the compartment studied (55). Finally, these data question the pertinence of studying

tolerance mechanisms in rodent models as a means to identify new molecules in the blood and to apply them to the clinic.

Acknowledgments

The authors thank Claire Usal, Bernard Martinet, Helga Smit for technical assistance in microsurgery, Sigrid Parois and Frederique Moizant for technical assistance and Dr. J. Ashton-chess for help in the editing of the manuscript. This work was partially supported by a ROTRF grant (# 559688078) and the 'Fondation Progréffe'.

References

- Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Activity acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; 172: 603–606.
- Bushell A, Karim M, Kingsley CI, Wood KJ. Pretransplant blood transfusion without additional immunotherapy generates CD25+CD4+ regulatory T cells: A potential explanation for the blood-transfusion effect. *Transplantation* 2003; 76: 449–455.
- Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Souillou JP, Cuturi MC. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am J Transplant* 2002; 2: 745–757.
- Kataoka M, Margenthaler JA, Ku G, Flye MW. Development of infectious tolerance after donor-specific transfusion and rat heart transplantation. *J Immunol* 2003; 171: 204–211.
- Haanstra KG, Ringers J, Sick EA et al. Prevention of kidney allograft rejection using anti-CD40 and anti-CD86 in primates. *Transplantation* 2003; 75: 637–643.
- Jonker M, Ringers J, Kuhn EM, Hart B, Foulkes R. Treatment with anti-MHC-class-II antibody postpones kidney allograft rejection in primates but increases the risk of CMV activation. *Am J Transplant* 2004; 4: 1756–1761.
- Baeten D, Louis S, Braud C et al. Phenotypically and functionally distinct CD8+ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 294–304.
- Flye MW, Burton K, Mohanakumar T et al. Donor-specific transfusions have long-term beneficial effects for human renal allografts. *Transplantation* 1995; 60: 1395–1401.
- Suciuc-Foca N, Manavalan JS, Cortesini R. Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells. *Transpl Immunol* 2003; 11: 235–244.
- Choileain NN, Redmond HP. Regulatory T-cells and autoimmunity. *J Surg Res* 2006; 130: 124–135.
- Bushell A, Jones E, Gallimore A, Wood K. The generation of CD25+ CD4+ regulatory T cells that prevent allograft rejection does not compromise immunity to a viral pathogen. *J Immunol* 2005; 174: 3290–3297.
- Jonuleit H, Adema G, Schmitt E. Immune regulation by regulatory T cells: Implications for transplantation. *Transpl Immunol* 2003; 11: 267–276.
- Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001; 193: 1303–1310.
- Louis S, Braudeau C, Giral M et al. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006; 81: 398–407.
- Dallman MJ, Shiho O, Page TH, Wood KJ, Morris PJ. Peripheral tolerance to alloantigen results from altered regulation of the interleukin 2 pathway. *J Exp Med* 1991; 173: 79–87.
- Gagne K, Brouard S, Guillet M, Cuturi MC, Souillou JP. TGF-beta1 and donor dendritic cells are common key components in donor-specific blood transfusion and anticlass II heart graft enhancement, whereas tolerance induction also required inflammatory cytokines down-regulation. *Eur J Immunol* 2001; 31: 3111–3120.
- Ystrakis E, Dejean AS, Bernard I et al. Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* 2004; 104: 3294–3301.
- Ochando JC, Yopp AC, Yang Y et al. Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 174: 6993–7005.
- Kitade H, Kawai M, Rutgeerts O et al. Early presence of regulatory cells in transplanted rats rendered tolerant by donor-specific blood transfusion. *J Immunol* 2005; 175: 4963–4970.
- Souillou JP, Blandin F, Gunther E, Lemoine V. Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation* 1984; 38: 63–67.
- van Rood JJ, Claas FH. The influence of allogeneic cells on the human T and B cell repertoire. *Science* 1990; 248: 1388–1393.
- Onodera K, Chandraker A, Volk HD et al. Role of regulatory T cells in the 'infectious' tolerance pathway in transplant recipients. *Transplant Proc* 1998; 30: 13–15.
- Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969; 57: 225–229.
- Pannetier C, Even J, Kourilsky P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today* 1995; 16: 176–181.
- Gorochov G, Neumann AU, Kereveur A et al. Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nat Med* 1998; 4: 215–221.
- Gagne K, Brouard S, Giral M et al. Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J Immunol* 2000; 164: 1553–1563.
- Guillet M, Brouard S, Gagne K et al. Different qualitative and quantitative regulation of V beta TCR transcripts during early acute allograft rejection and tolerance induction. *J Immunol* 2002; 168: 5088–5095.
- Sebille F, Gagne K, Guillet M et al. Direct recognition of foreign MHC determinants by naïve T cells mobilizes specific Vbeta families without skewing of the complementarity-determining region 3 length distribution. *J Immunol* 2001; 167: 3082–3088.
- Hultkrantz S, Ostman S, Telemo E. Induction of antigen-specific regulatory T cells in the liver-draining celiac lymph node following oral antigen administration. *Immunology* 2005; 116: 362–372.
- Cavinato RA, Casiraghi F, Azzollini N et al. Pretransplant donor peripheral blood mononuclear cells infusion induces transplantation tolerance by generating regulatory T cells. *Transplantation* 2005; 79: 1034–1039.
- Roy-Chaudhury P, Nickerson PW, Manfrro RC et al. CTLA4Ig attenuates accelerated rejection (presensitization) in the mouse islet allograft model. *Transplantation* 1997; 64: 172–175.
- Yang CP, Shittu E, McManus B, Wood PJ, Bell EB. Contrasting outcomes of donor-specific blood transfusion: Effectiveness against cell-mediated but not antibody-mediated rejection. *Transplantation* 1998; 66: 639–645.
- Douillard P, Pannetier C, Josien R et al. Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-Vbeta rearrangement in heart allografts. *J Immunol* 1996; 157: 1250–1260.

Functional Compartmentalization of Regulatory Cells

34. Koshiba T, Kitade H, Van Damme B et al. Regulatory cell-mediated tolerance does not protect against chronic rejection. *Transplantation* 2003; 76: 588–596.
35. Margenthaler JA, Kataoka M, Flye MW. Donor-specific antigen transfusion-mediated skin-graft tolerance results from the peripheral deletion of donor-reactive CD8+ T cells. *Transplantation* 2003; 75: 2119–2127.
36. Soulillou JP. Donor-specific transfusion-induced tolerance: Mechanisms revisited. *Transplant Proc* 1998; 30: 2438–2440.
37. Quigley RL, Wood KJ, Morris PJ. Transfusion induces blood donor-specific suppressor cells. *J Immunol* 1989; 142: 463–470.
38. Johnson CP, Munda R, Alexander JW, Balakrishnan K, Blanton M. The effect of donor-specific transfusions on rat heart allograft survival. *Transplantation* 1984; 38: 575–578.
39. Persijn GG, Cohen B, Lansbergen Q, van Rood JJ. Retrospective and prospective studies on the effect of blood transfusions in renal transplantation in the Netherlands. *Transplantation* 1979; 28: 396–401.
40. Terasaki PI. The beneficial transfusion effect on kidney graft survival attributed to clonal deletion. *Transplantation* 1984; 37: 119–125.
41. Yang L, Du Temple B, Khan Q, Zhang L. Mechanisms of long-term donor-specific allograft survival induced by pretransplant infusion of lymphocytes. *Blood* 1998; 91: 324–330.
42. Pirenne J, Kitade H, Kawai M et al. Regulatory cells, TH1/TH2 unbalance, and antibody-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion. *Transplantation* 2005; 79(3 Suppl): S25–S27.
43. Wood KJ. Passenger leukocytes and microchimerism: what role in tolerance induction? *Transplantation* 2003; 75(9 Suppl): 17S–20S.
44. Seung E, Mordes JP, Rossini AA, Greiner DL. Hematopoietic chimerism and central tolerance created by peripheral-tolerance induction without myeloablative conditioning. *J Clin Invest* 2003; 112: 795–808.
45. Dallman MJ, Wood KJ, Morris PJ. Specific cytotoxic T cells are found in the nonrejected kidneys of blood-transfused rats. *J Exp Med* 1987; 165: 566–571.
46. Bugeon L, Cuturi MC, Hallet MM, Paineau J, Chabannes D, Soulillou JP. Peripheral tolerance of an allograft in adult rats—characterization by low interleukin-2 and interferon-gamma mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft. *Transplantation* 1992; 54: 219–225.
47. Chevalier S, Lacroix H, Moreau JF, Soulillou JP. Blood transfusion plus allograft—but not blood transfusion alone—induce IL 2-producing suppressor cells in Lew-1A recipients of LEW-1W heart allograft. *Transplant Proc* 1987; 19(1 Pt 1): 544–546.
48. Qin S, Cobbold SP, Pope H et al. ‘Infectious’ transplantation tolerance. *Science* 1993; 259: 974–977.
49. Cobbold S, Waldmann H. Infectious tolerance. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 518–524.
50. Kupiec-Weglinski JW, Onodera K, Volk HD. The ‘infectious’ tolerance pathway in organ allograft recipients. *Transplant Proc* 1998; 30: 1595–1597.
51. Douillard P, Vignes C, Josien R et al. Reassessment of the role of CD8+ T cells in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion. *Eur J Immunol* 1999; 29: 1919–1924.
52. Kosiewicz MM, Alard P, Liang S, Clark SL. Mechanisms of tolerance induced by transforming growth factor-beta-treated antigen-presenting cells: CD8 regulatory T cells inhibit the effector phase of the immune response in primed mice through a mechanism involving Fas ligand. *Int Immunol* 2004; 16: 697–706.
53. Stock P, Kallinich T, Akbari O et al. CD8(+) T cells regulate immune responses in a murine model of allergen-induced sensitization and airway inflammation. *Eur J Immunol* 2004; 34: 1817–1827.
54. Graca L, Thompson S, Lin CY, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(−) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol* 2002; 168: 5558–5565.
55. Scherer A, Krause A, Walker JR, Korn A, Niese D, Raulf F. Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies. *Transplantation* 2003; 75: 1323–1330.
56. Graca L, Honey K, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Cutting edge: Anti-CD154 therapeutic antibodies induce infectious transplantation tolerance. *J Immunol* 2000; 165: 4783–4786.
57. Zhai Y, Li J, Hammer M, Busuttil RW, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW. Evidence of T cell clonality in the infectious tolerance pathway: Implications toward identification of regulatory T cells. *Transplantation* 2001; 71: 1701–1708.
58. Beketas H, Schrem H, Lehner F et al. Blood transfers infectious immunologic tolerance in MHC-incompatible heart transplantation in rats. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 614–617.
59. Quezada SA, Fuller B, Jarvinen LZ et al. Mechanisms of donor-specific transfusion tolerance: preemptive induction of clonal T-cell exhaustion via indirect presentation. *Blood* 2003; 102: 1920–1926.
60. Takayashiki T, Asakura H, Ku G, Kataoka M, Flye MW. Infectious tolerance develops after intrathymic alloantigen-induced acceptance of rat heart allografts can be adoptively transferred. *Surgery* 2005; 138: 254–260.
61. Jablonski P, Baxter K, Howden BO et al. A reproducible model of chronic rejection in rat renal allografts. *Aust N Z J Surg* 1995; 65: 114–119.
62. Bugeon L, Cuturi MC, Paineau J, Anegón I, Soulillou JP. Similar levels of granzyme A and perforin mRNA expression in rejected and tolerated heart allografts in donor-specific tolerance in rats. *Transplantation* 1993; 56: 405–408.
63. Naumov YN, Hogan KT, Naumova EN, Pagel JT, Gorski J. A class I MHC-restricted recall response to a viral peptide is highly polyclonal despite stringent CDR3 selection: Implications for establishing memory T cell repertoires in ‘real-world’ conditions. *J Immunol* 1998; 160: 2842–2852.
64. Melchior B, Nerriere-Daguin V, Degauque N et al. Compartmentalization of TCR repertoire alteration during rejection of an intrabrain xenograft. *Exp Neurol* 2005; 192: 373–383.
65. Mason D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today* 1998; 19: 395–404.
66. Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM et al. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 2005; 66: 13–20.

Brief Communication

Humoral and Cellular Responses to Influenza Vaccination in Human Recipients Naturally Tolerant to a Kidney Allograft

C. Ballet^{a,†}, G. Roussey-Kesler^{a,†}, J.-T. Aubin^b,
S. Brouard^a, M. Giral^a, P. Miqueu^a, S. Louis^a,
S. van der Werf^b and J.-P. Souillou^{a,*}

^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.), Unité 643: 'Immunointervention dans les Allo et xenotransplantations' and Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T.), CHU-HÔTEL DIEU, 30 Bd Jean Monnet, 44035 Nantes Cedex 01, France

^bCentre National de Référence du Virus Influenzae (Région-Nord), Unité de Génétique Moléculaire des Virus Respiratoires URA 196 CNRS, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, France

*Corresponding author: Jean-Paul Souillou,
jean-paul.souillou@univ-nantes.fr

Rare kidney allograft recipients enjoy unaltered graft function years after interruption of their immunosuppressive treatment. To assess the extent to which this state of 'operational tolerance' (TOL) is specific to the graft and not the result of a global immunodeficiency, we analyzed the response of such patients following influenza vaccination. Hemagglutination inhibition titers and frequency of IFN γ -secreting T cells were measured before 1 and 3 months after vaccination. The proportion of healthy volunteers (HV) responding to vaccine was significantly higher than that of immunosuppressed (IS) patients. Three 'TOL' patients presented a humoral response similar to that of HV, whereas the two others had a poor response, like the IS recipients. Although the small number of patients does not allow for definitive conclusions to be made, these data suggest that the status of tolerance may be heterogeneous, with some patients with a global immunodeficiency and others with an adapted response to vaccination.

Key words: Influenza vaccination, kidney transplantation, operational tolerance

Received 5 May 2006, revised 29 June 2006 and accepted for publication 17 July 2006

Introduction

Organ transplantation represents the treatment of choice for terminal organ deficiencies. Nevertheless, prevention of rejection requires nonspecific immunosuppression, which increases the risk of infectious and tumoral diseases (1) and only poorly influences chronic rejection, the main cause of graft loss. Thus, a major goal in transplantation would be to achieve (or recognize) a state of tolerance specific to the graft in an immunocompetent host, in the absence of immunosuppressive drugs.

Although most patients who discontinue immunosuppressive drugs reject their grafts within the weeks following treatment withdrawal (2), a few patients maintain an acceptable and stable renal function years after immunosuppressive treatment interruption (2–4). Although the mechanisms responsible for this state of 'TOL' are poorly understood, some of these patients may harbor regulatory T cells (3).

Although the findings of a detailed clinical analysis of these immunosuppressive drug-free 'TOL' patients do not suggest these patients to be at increased risk of opportunistic infections or to be nonspecifically immunosuppressed (IS) (4), the extent to which these patients are able to respond to antigens different from those of their 'tolerated' graft is not yet known. The aim of this prospective study was therefore to determine whether these 'TOL' kidney recipients developed an immune response to influenza vaccination, or if they were immunoincompetent despite being free of all immunosuppressive treatment. To this end, the response of these patients to influenza vaccination was prospectively compared to that of age-matched kidney transplant recipients with stable and good graft function under conventional immunotherapy as well as healthy volunteers (HV). Since 'TOL' kidney recipients are very rare, only a small number of patients were eligible to participate in this study, thus limiting the statistical value of the results. We show here that the humoral response of the 'TOL' recipients to influenza vaccination is heterogeneous. Three patients out of five presented a response that did not differ from those of HV, suggesting specific regulation to graft antigens, whereas two patients out of five had a weak immune response, as observed in IS recipients.

†Ballet and Roussey-Kesler have participated equally in this work.

Table 1: Clinical and biological parameters of the “operationally tolerant” (TOL) and immunosuppressed (IS) recipients

Case	Birth date	Cause of renal insufficiency	Graft date	IS treatment (before IS withdrawal for TOL)	Tolerance duration since IS withdrawal in 2005 (years)	Creatininemia at test time ($\mu\text{mol/l}$)
TOL 1	26/12/1945	Undermined glomerulopathy	14/03/1987	CsA + AZA + CS	5	88
TOL 2	05/04/1978	Obstructive uropathy	05/07/1991	CsA + AZA + CS	6	118
TOL 3	29/01/1929	Interstitial nephropathy	02/01/1993	CsA + AZA + CS	11	96
TOL 4	15/09/1966	Drug toxicity	06/11/1998	CsA + AZA + CS	5	115
TOL 5	04/09/1931	Membranoproliferative glomerulonephritis	13/02/1973	AZA + CS	20	130
IS 1	04/03/1935	Lupus nephritis	07/01/1997	CsA + MMF	None	122
IS 2	25/03/1970	Interstitial nephropathy	24/08/1995	CsA + MMF	None	97
IS 3	11/05/1949	Polycystic kidney disease	20/01/1996	CsA + MMF	None	117
IS 4	21/05/1972	Focal segmental glomerulosclerosis	16/06/1998	Tacrolimus + MMF	None	101
IS 5	26/11/1940	Interstitial nephropathy	11/10/1997	Tacrolimus + MMF	None	116
IS 6	20/10/1939	Undermined	05/01/2001	Tacrolimus + MMF	None	92
IS 7	11/06/1964	Undermined	27/06/2002	Tacrolimus + MMF	None	118
IS 8	14/10/1941	IgA nephropathy	14/07/2002	Tacrolimus + MMF	None	103
IS 9	02/07/1954	Polycystic kidney disease	01/05/2002	Tacrolimus + MMF	None	81

IS: Immunosuppression, CsA: Ciclosporine, MMF: Mycophenolate Mofetil, PTLD: Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder, TOL: “Operationally tolerant” patients, IS: Immunosuppressed kidney recipients.

Patients, Materials and Methods

Patients

Five ‘TOL’ patients free of any immunosuppressive drug treatment, six IS kidney recipients and nine HV were recruited for the study during the 2003–2004 influenza vaccination campaign. The following year, four TOL patients, nine IS recipients and 15 HV were enrolled for the same protocol. Most of the patients participated in both studies (four TOL, six IS and six HV). The study was approved by the University Hospital Ethical Committee and the local Committee for the Protection of Patients for Biomedical Research. All patients signed a written informed consent before inclusion.

‘TOL’ kidney recipients were defined as patients displaying a stable renal function, with serum creatinine and proteinuria below 150 $\mu\text{mol/L}$ and 1 g/24 h, respectively, in whom all immunosuppressive treatments had been stopped for more than 2 years. One patient had stopped immunosuppressive treatment after developing malignancies (posttransplantation lymphoproliferative disorder). The other ‘TOL’ patients stopped their treatment on their own accord. None of the ‘TOL’ patients had presented notable infections for at least 1 year prior to the study, and none received any treatment known to interfere with immune competence. The main clinical characteristics of these patients are indicated in Table 1. Age-matched kidney transplant recipients, all treated with a similar conventional immunosuppressive drug regimen to limit any potential variations (a calcineurin inhibitor: cyclosporine or tacrolimus, and mycophenolate mofetil [MMF]), were used as controls. None of the latter patients were treated with azathioprine or corticosteroids. All had received their transplants at least 1 year previously and all presented similar levels of serum creatinine at the time of testing (Table 1). An additional control group consisted of age-matched HV. Eight out of nine IS recipients had been vaccinated before the study (the vaccination history of one of the nine patients was unknown) and only 11 out of 18 HV had ever been vaccinated (it could not be determined whether 3 of these 18 individuals had been previously vaccinated). All tolerant patients had been previously vaccinated.

Influenza vaccine

A commercially available subunit virion influenza vaccine (Influvac[®], Solvay Pharma, Netherlands) was used for immunization. This trivalent vaccine contained purified hemagglutinin (HA) and neuraminidase of the influenza strains: A/Moscow/10/99 (H3N2)-like, A/New Caledonia/20/99 (H1N1)-like and B/Hong Kong/30/01-like strains for the 2003/2004 season, and A/Wyoming/3/2003 (H3N2)-like, A/New Caledonia/20/99 (H1N1)-like and B/Jiangsu/10/2003-like for the 2004/2005 season. The concentration of HA for each component was 15 μg per single dose (0.5 mL). A single dose of influenza vaccine was administered to each participant during the autumn season, before the beginning of the influenza season. Blood samples were obtained before (M0), 1 (M1) and 3 months (M3) after immunization.

Antibody titers

The titer of serum antibody to each strain of influenza virus was measured by a standard hemagglutination inhibition (HI) assay, using the same strains as those used in the vaccines. Pre and postvaccination sera were tested simultaneously. HI titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution of serum that inhibited the agglutination of guinea pig red blood cells by a standardized amount of viral antigen. Converted HI titers were also calculated (HI titer divided by 10 and transformed to binary logarithms) (5). The difference between converted HI titers before 1 month (M1–M0) and 3 months (M3–M0) after vaccination was calculated for each individual in each group toward each strain. A difference in converted HI titers equal to or greater than two units before and after vaccination (which corresponds to a 4-fold increase in HI titers) indicates a positive humoral response (5). The response rate (percentage of individuals in each group presenting a positive humoral response after vaccination) for at least two strains of the vaccine 1 or 3 months after vaccination was analyzed.

Measurement of IFN γ -secreting T-cell frequency

The frequency of specific responder cells was determined by means of an IFN γ ELISPOT Assay. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

were isolated from EDTA-treated venous blood by standard ficoll isolation and resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Sigma, L'Isle D'abeau Chesne, France), 1 mM sodium pyruvate (Sigma), 2 mM L-Glutamine (Sigma), 100 U/mL penicillin (Sigma), 100 µg/mL streptomycin (Sigma) and 0.1 mM nonessential aminoacids (Sigma), at a final concentration of $2 \cdot 10^6$ PBMC/mL. Fresh PBMC were then seeded in duplicate or triplicate in 96-well multitestplates coated with an anti-IFN γ primary antibody (AID, Strasberg, Germany) at a concentration of $2 \cdot 10^5$ cells per well (100 µL) and stimulated with influenza vaccine (0.45 µg HA/mL). PHA added at 30 µg/mL and a pool of cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV) and Influenza peptides (kindly provided by Dr Guillet J-G., Institut Cochin, France) added at a concentration of 10 µg/mL, were used as positive controls. Negative controls consisted of PBMC cultured alone. Plates were then incubated 24 h at 37°C in the presence of 5% CO₂. After washing, detecting biotinylated anti-IFN γ antibody (AID) was added and the plates incubated for 2.5 h at room temperature, after which time streptavidin-horse radish peroxidase (AID) was added for a further 2 h. The spots were developed using aminoethyl carbazolate in acetate buffer with H₂O₂. Counting of spot-forming cells was performed with the AID-ELISPOT reader system (AID). The frequency of IFN γ -secreting cells was calculated per million of cells.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Software. Intergroup comparisons were made using a nonparametric Kruskal-Wallis test. Response rates in each group were compared with a Fischer test; $p \leq 0.05$ was considered as significant (*).

Results

Whereas conventionally IS kidney recipients presented a reduced humoral response to influenza vaccination, the response of 'TOL' patients was heterogeneous

There were no significant differences in HI titers before vaccination between the three groups of subjects in both

parts of the study. The mean difference between converted HI titers was significantly higher in HV than in IS recipients for two of the three strains (A/Moscow and A/New Caledonia) at both 1 and 3 months postvaccination in the 2003/2004 campaign, and for one of the three strains (A/Wyoming) 1 month following vaccination in the 2004/2005 study (Figure 1; data at 3 months not shown). No significant difference was observed between 'TOL' and the two other groups for either campaign.

However, the low number of these extremely rare patients limit the relevance of statistical comparisons and an individual per individual analysis is likely more pertinent. Most of the HV presented a positive humoral response at 1 month to 2 or 3 viral strains (seven out nine in 2003/2004 and 9 out 15 in 2004/2005) (Figure 2). In contrast, only one IS recipient displayed such a response. Three 'TOL' patients presented a positive humoral response to two or three viral strains, as observed in HV (Note that Figure 2 mentioned 2/4 and 2/5 and not three, because one patient responded in 2003/2004, one patient in 2004/2005 and one patient in both campaigns). Two 'TOL' patients did not present such a response: one of them participated at both part of the vaccination study and never presented a positive humoral response to any strain. The second patient only participated at the 2003/2004 campaign and had a positive response to only one strain. Interestingly, the two last patients were the oldest (73- and 74-year-old whereas the three others were between 25- and 58-year-old). There were no differences in terms of leukocytes counts, creatininemia or gammaglobulins levels (data not shown). Taken together, these data showed that IS patients had a weaker humoral response to the vaccine than HV. 'TOL' patients presented a more heterogeneous response to vaccination: three patients out

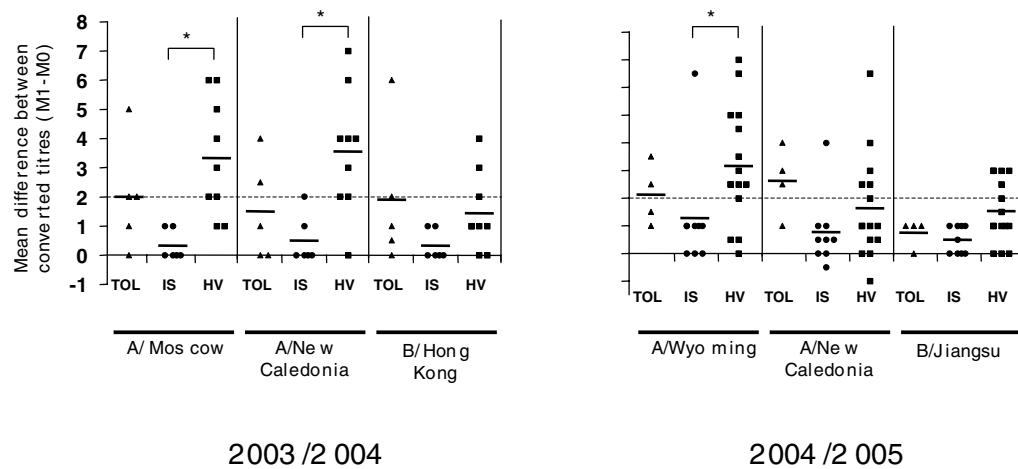


Figure 1: Mean difference in converted HI titers before and 1 month after vaccination for each strain of vaccine. HI titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution showing HI, divided by 10 and transformed to binary logarithms (converted titers). The mean differences between the converted titers observed at 1 month (M1) and the converted titers observed before vaccination (M0) are shown. A difference of two units indicates a positive humoral response (dotted line). The mean converted titer increase in HV (■) was significantly higher (* $p \leq 0.05$) than that of IS recipients (●) for two strains in the 2003/2004 season and one strain in the 2004/2005 season. 'TOL' recipients (▲) did not significantly differ from the other groups.

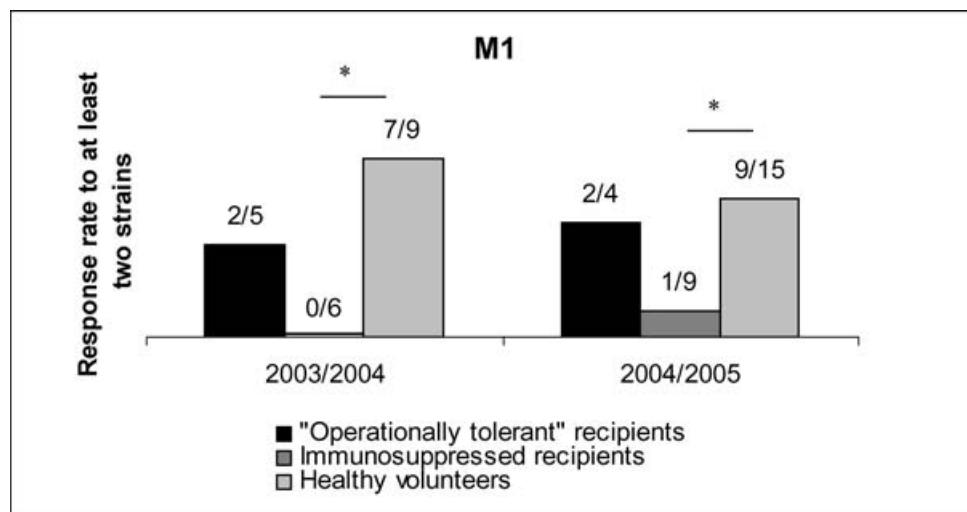


Figure 2: Response rate to at least two strains 1 month after vaccination. Proportion of individuals in each group presenting a positive humoral response (difference in converted titers before and after vaccination equal to or greater than two units) for at least two strains 1 month after vaccination (actual numbers indicated above). The percentage of individuals in the HV group presenting a positive humoral response was significantly higher (* $p < 0.05$) than that observed in the IS recipient group. Three 'TOL' patients presented a positive humoral response to two or three viral strains, as observed in HV, but only two are mentioned on the figure because one patient responded in 2003/2004, one patient in 2004/2005 and one patient in both campaigns.

of five had a response similar to that of HV (response to at least two strains) whereas the two others had a humoral response to vaccination similar to that of IS recipients (no response or response to only one strain).

The cellular response did not differ between the three groups

To assess whether a difference in the cellular response to the vaccine could be observed between the three groups, the mean increase in frequency of IFN γ -secreting T cells was determined after a 24-h *in vitro* stimulation with the vaccine 1 and 3 months following vaccination. Figure 3A shows an example of the ELISPOT assay results after stimulation of PBMC with vaccine before (M0) or after vaccination (M1 or M3) for a given individual. There was an increase in frequency of IFN γ -secreting cells after vaccination but no statistically significant differences were observed between the three groups (Figure 3B).

Discussion

Rare kidney recipients enjoy a good and stable graft function after cessation of immunosuppressive treatment and are thus considered as 'TOL'. To assess whether this state was related to a global immunodeficiency or specific to the graft, we evaluated for the first time the ability of such patients to respond to influenza vaccination and compared their response to that of kidney recipients under immunosuppressive treatment or HV. Because elderly individuals can present an impaired response to influenza vaccination

(6,7), our control subjects were age matched with the 'TOL' patients.

Several techniques have been reported to measure humoral and cellular responses following influenza vaccination. The humoral response is generally assessed by HI or ELISA assays (5,6,8). For the cellular response, proliferative production by PBMC after an *in vitro* stimulation (with the vaccine or purified proteins) and the frequency of specific T cells determined by flow cytometry analysis using tetramers have been reported (8–10). We chose to evaluate humoral and cellular responses to influenza vaccination by measuring specific antibodies in the serum and the frequency of peripheral T cells producing IFN γ in response to the vaccine. These analyses were performed before 1 and 3 months after vaccination because specific antibodies are mostly acquired more than 10 days after vaccination (11) and because most of the studies reported in the literature that have been conducted 4–6 weeks and 3 months after vaccination have shown that the vaccine specific antibodies were maintained at these time points (12,13). On the other hand, the cellular response probably precedes the humoral response as shown by CFSE/tetramer staining 10 days after vaccination (8). However, analyzing the IFN γ ELISPOT response earlier than 1 month postvaccination was not possible because the majority of the 'TOL' subjects refused to give consent for repeated blood samples and we took the option to focus on the humoral response.

We reported that the percentage of IS recipients with a positive humoral response for at least two strains of the vaccine was significantly lower than that of HV. These results

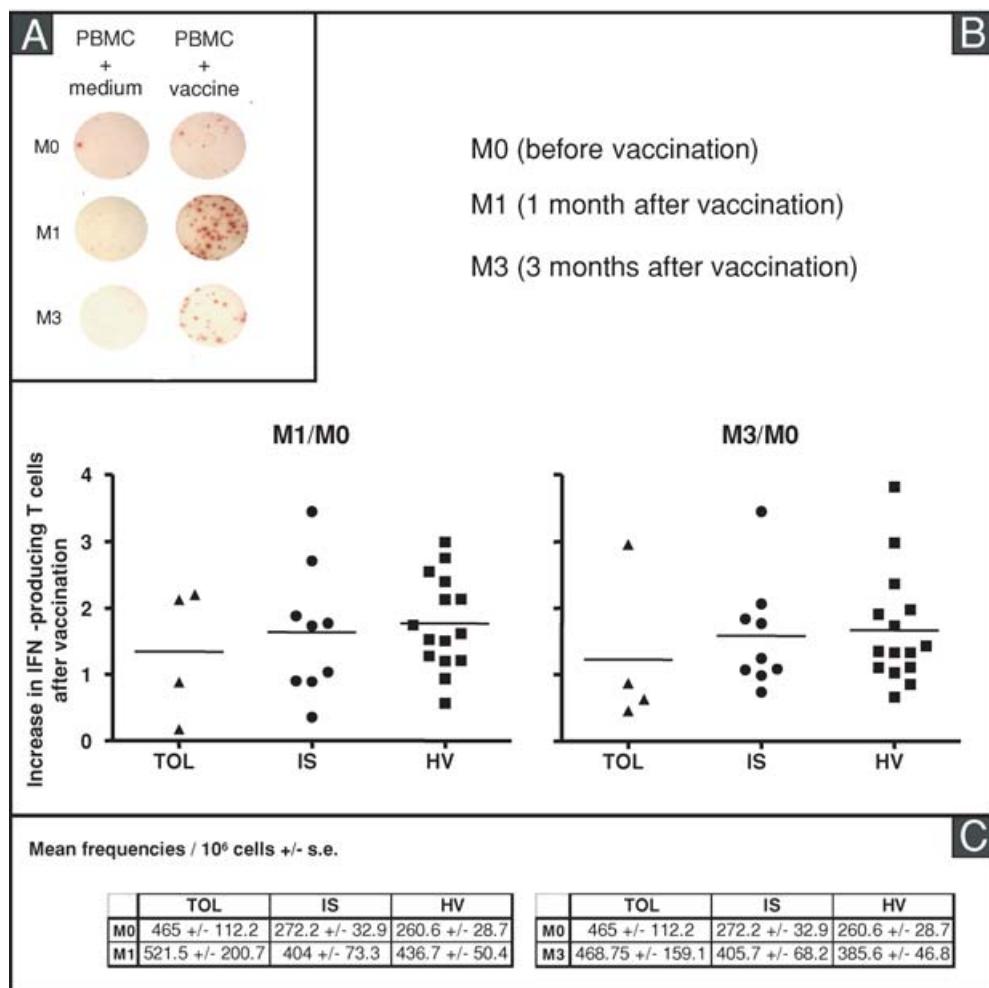


Figure 3: Frequency of IFN γ -secreting T cells determined by ELISPOT assay after a 24-h *in vitro* stimulation with the vaccine. PBMC were stimulated for 24 h with the vaccine as described in the Materials and Methods. (A) Example of spots observed with the IFN γ -ELISPOT assay following *in vitro* stimulation with the vaccine of PBMC collected before 1 or 3 months after vaccination. (B) The fold increase over baseline of the frequency of specific IFN γ -secreting T cells after vaccination is shown. No significant difference was found between the groups of 'TOL' patients (\blacktriangle), IS patients (\bullet) and HV (\blacksquare) at either time point. Corresponding actual ELISPOT mean values \pm SE error are indicated in C.

were expected because previous studies have shown that transplant patients had an impaired humoral response to influenza vaccination (13–15). In our study, the immunosuppressive drugs likely influenced the efficacy of vaccination as described in cyclosporine (16) or MMF (15,17) treated patients who present a weaker humoral response. In contrast, the response of 'TOL' patients to vaccination did not homogeneously differ from that of HV or IS patients. The lack of significance between these groups may be linked to the small number of 'TOL' patients in the cohort studied, and an analysis patient per patient might be more pertinent here. Interestingly, three 'TOL' patients out of five tested presented a humoral response closer to that of HV, with a positive antibodies response to two or three viral strains contained in the vaccine. In contrast, two 'TOL' patients had a positive humoral response only to one or none

of the viral strains, as most of the IS recipients. The 'TOL' patients with a response to influenza vaccination similar to that of HV were the youngest (25–58-year old) whereas the two patients with a poor or absent humoral response were older (73- and 74-year old) and age has been shown to have an impact on the humoral response, as observed in previous studies in HV (6,18,19). In the same manner, the age of these patients may also impact their ability to mount an immune response toward their graft and thus play a role in these patients being 'TOL'. However, in such a small group of patients, it is difficult to assess that age has any influence.

We next measured the cellular response to vaccination. Although we noted an increase in the frequency of IFN γ -secreting cells after vaccination, this increase did not

significantly differ among the three groups. Our data suggest that IS patients may present a dissociated response to vaccination, with a relatively conserved cellular response but an impaired humoral response. The dissociation has already been observed in elderly subjects (7) some of whom present an intact cellular response but a deficient humoral response or in children after hemopoietic stem cell transplantation who present an increase of cellular response only after vaccination (20). Impaired humoral and conserved cellular response have been also reported in patients treated by MMF which predominantly affects the humoral response (17). However, in absence of early time point samples, our study cannot differentiate between a conserved cellular response or a different kinetic of response in IS recipients. One can also hypothesize that the cellular response observed with the Elispot assay may encompass the reactivity towards common influenza epitopes to various strains, hiding to some extent the specific response to the vaccine.

Taken together, this study shows that IS patients have a poor humoral response following influenza vaccination, significantly weaker than that of HV, with a more conserved cellular response. Interestingly, our data also show that some of the 'TOL' patients present humoral and cellular responses that do not differ from those of the HV. These observations are also in agreement with the fact that the 'TOL' patients did not present abnormal increase in infectious diseases after immunosuppression withdrawal (4). However, the results also revealed that the response to vaccination of 'TOL' patients was heterogeneous, and that some 'TOL' patients presented only a poor humoral response, as observed in IS recipients despite the absence of immunosuppressive medication. Taken together, these data suggest that the state of 'TOL', which is rarely observed following renal transplantation, may in some cases be associated with an adapted immune response, but in others may be related to a certain degree of global immunodeficiency, despite these patients were free of unusual rate (or type) of infectious disease.

Acknowledgments

The authors thank Dr. J. Ashton-Chess for editing the manuscript and the technical staff of the CNR du virus influenzae (Region-Nord) for excellent assistance.

References

- Dantal J, Souillou JP. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med* 2005; 352: 1371–1373.
- Zoller KM, Cho SI, Cohen JJ, Harrington JT. Cessation of immunosuppressive therapy after successful transplantation: A national survey. *Kidney Int* 1980; 18: 110–114.
- VanBuskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska-Gan E et al. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest* 2000; 106: 145–155.
- Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A et al. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 736–746.
- Beyer WE, Palache AM, Luchters G, Nauta J, Osterhaus AD. Sero-protection rate, mean fold increase, seroconversion rate: Which parameter adequately expresses seroresponse to influenza vaccination? *Virus Res* 2004; 103: 125–132.
- Powers DC, Belshe RB. Effect of age on cytotoxic T lymphocyte memory as well as serum and local antibody responses elicited by inactivated influenza virus vaccine. *J Infect Dis* 1993; 167: 584–592.
- Bernstein E, Kaye D, Abrutyn E, Gross P, Dorfman M, Murasko DM. Immune response to influenza vaccination in a large healthy elderly population. *Vaccine* 1999; 17: 82–94.
- Danke NA, Kwok WW. HLA class II-restricted CD4+ T cell responses directed against influenza viral antigens postinfluenza vaccination. *J Immunol* 2003; 171: 3163–3169.
- Mazzone PJ, Mossad SB, Mawhorter SD, Mehta AC, Mauer JR. Cell-mediated immune response to influenza vaccination in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 1175–1181.
- Briggs WA, Rozek RJ, Migdal SD et al. Influenza vaccination in kidney transplant recipients: Cellular and humoral immune responses. *Ann Intern Med* 1980; 92: 471–477.
- Lambkin R, Oxford JS, Biao L, Al-Jabri A, Fleming D. Rapid antibody response to influenza vaccination in 'at risk' groups. *Vaccine* 2000; 18: 2307–2311.
- McElhaney JE, Upshaw CM, Hooton JW, Lechelt KE, Meneilly GS. Responses to influenza vaccination in different T-cell subsets: A comparison of healthy young and older adults. *Vaccine* 1998; 16: 1742–1747.
- Mazzone PJ, Mossad SB, Mawhorter SD, Mehta AC, Schilz RJ, Mauer JR. The humoral immune response to influenza vaccination in lung transplant patients. *Eur Respir J* 2001; 18: 971–976.
- Blumberg EA, Albano C, Pruitt T et al. The immunogenicity of influenza virus vaccine in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 295–302.
- Sanchez-Fructuoso AI, Prats D, Naranjo P, et al. Influenza virus immunization effectiveness in kidney transplant patients subjected to two different triple-drug therapy immunosuppression protocols: Mycophenolate versus azathioprine. *Transplantation* 2000; 69: 436–439.
- Versluis DJ, Beyer WE, Masurel N, Wenting GJ, Weimar W. Impairment of the immune response to influenza vaccination in renal transplant recipients by cyclosporine, but not azathioprine. *Transplantation* 1986; 42: 376–379.
- Smith KG, Isbel NM, Catton MG, Leydon JA, Becker GJ, Walker RG. Suppression of the humoral immune response by mycophenolate mofetil. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 160–164.
- Goronzy JJ, Fulbright JW, Crowson CS, Poland GA, O'Fallon WM, Weyand CM. Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals. *J Virol* 2001; 75: 12182–12187.
- Murasko DM, Bernstein ED, Gardner EM et al. Role of humoral and cell-mediated immunity in protection from influenza disease after immunization of healthy elderly. *Exp Gerontol* 2002; 37: 427–439.
- Haining WN, Evans JW, Seth NP et al. Measuring T cell immunity to influenza vaccination in children after haemopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2004; 127: 322–325.

Blood T-Cell Repertoire in Idiopathic Nephrotic Syndrome Recurrence Following Kidney Transplantation

C. Hervé^a, L. Le Berre^a, P. Miqueu^a,
N. Degauque^a, C. Ruiz^b, S. Brouard^a, M. Guillet^a,
J. P. Soulillou^{a,*} and J. Dantal^a

^aInstitut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) and Nantes University, Unité Mixte 643: Immuno-intervention dans les Allo et

Xénotransplantations, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT) CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex, France

^bTcLand, CHU Hotel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex, France

*Corresponding author: Jean Paul Soulillou,
Jean-Paul.Soulillou@univ-nantes.fr

Corticosteroid resistant idiopathic nephrotic syndrome (CR-INS) is a glomerulopathy that recurs after kidney transplantation in 30–50% of patients, suggesting the involvement of systemic albuminuric factors, probably produced by activated T cells. We investigated peripheral T-cell selection and expansion before and after transplantation to identify and characterize T-lymphocyte patterns potentially associated with INS recurrence. We used a combined qualitative and quantitative assessment of V β mRNA alterations at the level of the complementary determining region 3-length distribution (CDR3-LD) of the T-cell receptor (TCR). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were collected from 18 CR-INS patients (8 with recurrence and 10 without recurrence) on the day of transplantation as well as at 1 month, 1 year and 5 years after transplantation, and V β transcriptomes were analyzed. Our data show that blood T cells from patients with INS recurrence display a TCR repertoire that is stable in time and has a similar level of CDR3-LD alterations as the T-cell repertoire of control patients, both before and after transplantation. These results suggest that the process of INS recurrence does not involve TCR activation or specific clonal expansion of T cells. However, these results do not exclude a role for T cells in the production of an albuminuric factor.

Key words: Kidney transplantation, Nephrotic syndrome, recurrence, T cell clones, TcLandscape

Received 15 December 2005, revised 11 April 2006 and accepted for publication 26 April 2006

Introduction

Idiopathic nephrotic syndrome (INS) is characterized by massive albuminuria and can be subdivided, based on renal biopsy findings, into minimal change nephrotic syndrome (MCNS) and focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). The incidence of idiopathic FSGS is progressively increasing and FSGS now constitutes the most frequent diagnosis in native adult kidneys, accounting for 35–50% of cases of adult nephrotic syndrome (1). The large heterogeneity of the disease is illustrated by the various responses to treatment observed in INS patients: some respond to corticosteroids (2,3) whereas others show steroid-resistance (4) but benefit from treatment with cyclosporine or cyclophosphamide (4–6). Such drug resistant patients eventually develop end-stage renal failure (ESRF), requiring renal replacement therapy. Unfortunately, however, the disease recurs in 20–50% of patients (7,8). The onset of proteinuria appears within 1 month after transplantation, with a median time of 14 days in children. The early histological lesion is MCNS that can progress to FSGS within a few months or years. Risk factors reported to be associated with a high incidence of recurrence include age at diagnosis, rapid decline in renal function and presence of diffuse mesangial proliferative lesions in the native kidney. Thus following renal transplantation, the early recurrence in certain patients identifies them as an informative group in whom active glomerulonephritis exists, even if some of them are on dialysis or under immunosuppressive therapy.

Major advances in understanding the pathophysiology of INS have come from the identification of genetic alterations among the key proteins of the slit diaphragm (9,10). However, these podocytopathic forms of INS are minor and genetic abnormalities can only account for a small percentage of patients presenting a corticosteroid resistant INS (CR-INS). The predominant form of INS is an ‘immuno-logic’ form where the role of a circulating factor or factors, whose production seems to follow T-cell dysfunction, has been suggested for more than three decades (11). Most of experimental studies have focused on the role of T lymphocytes in the progression of corticosteroid-sensitive INS (12) and have tried to make a link between these cells and the putative circulating factor. Using a subtractive cDNA library screening technique on peripheral blood mononuclear cells

(PBMC), Sahali et al. showed a down regulation of the IL12-R β 2 mRNA subunit and an upregulation of c-maf during relapse compared with MCNS patients in remission (13). These results suggested that activated T cells of MCNS patients were driven toward a Th2 phenotype. This hypothesis was strengthened by studies of the *in vitro* production of cytokines by PBMC from patients with INS showing elevated expression of IL-13 (14) and IL-4 mRNA (15,16). Abnormal activities of transcription factors have also been reported in MCNS: high levels of nuclear factor kB (NF- κ B) DNA-binding activity and an upregulation of Tc-mip were found in CD4+ T cells from untreated MCNS patients during relapse (17,18). These data point toward an activation of T cells in MCNS. While the presence of a Th2 profile and immune abnormalities is now recognized in INS patients, the signal that leads to such activation remains unknown. The association of INS with viral infections (19) and allergic responses (20) could suggest that, at least in some instances, antigen-driven responses are involved in the induction phase of the disease.

Whereas a role for T cells is strongly suggested in corticosteroid-sensitive INS patients, little is known about immune system involvement in the CR form. The presence of plasmatic factors, especially in INS that recurs after transplantation, has been proposed (21) but the origin and the nature of such factors are still uncharacterized. The fact that MCNS can evolve into FSGS lesions in native kidneys and also in kidney grafts suggests that these two histological forms of glomerulonephritis share identical pathophysiological mechanisms. The involvement of T cells in such glomerulonephritis was investigated by Frank et al. through the analysis of the genetic polymorphism of the variable region of the T-cell receptor (TCR) β -chain. These authors showed that CD8-positive T cells of patients with FSGS lesions were clonally expanded in long-lasting active disease (22).

In this study, we used a qualitative and quantitative approach of V β transcriptome analysis in PBMC to estimate the magnitude of any potential skewing of the T-cell repertoire before and after transplantation in INS recurrence so as to better characterize the involvement of T lymphocytes in this phenomenon. PBMC from 8 patients in whom INS recurred after transplantation ('recurrent' patients; R) and 10 patients in whom INS did not recur ('nonrecurrent' patients; NR) were analyzed before and after transplantation. Five patients with chronic renal failure of nonrelated to CR-INS origin under dialysis served as controls. Our data show that 'recurrent' patients displayed a stable repertoire and lower global CDR3-LD alterations than control patients both before and after transplantation, thus providing no evidence of T-cell clonal selection. Nevertheless, our results do not exclude a role for T lymphocytes in INS recurrence, but do, however, tend to go against the concept of an antigen-driven clonal response in these patients.

Patients, Materials and Methods

Patients

Eighteen patients suffering from native biopsy-proven INS who had undergone kidney transplantation in our institution were included in this study. All these patients presented a nephrotic syndrome at the time of diagnosis and were resistant to steroid therapy with a subsequent evolution to ESRF. After transplantation, eight patients presented a recurrence of nephrotic syndrome. For seven out of eight patients, the recurrence was immediate with a selective proteinuria above 3 g/day within the first week posttransplantation (or recovery of renal function) and an early kidney graft biopsy showing only a minimal change glomerulonephritis with an extensive foot cell process fusion at microscopic examination. For one patient, the recurrence was diagnosed 3 months posttransplantation with selective proteinuria between 1 and 2 g/day and the presence of MCNS lesions in the kidney graft biopsy. The other 10 patients corresponded to nonrecurrent INS patients as their proteinuria remained below 0.5 g/day 1 month after transplantation and thereafter. The main clinical parameters for each group are represented in Table 1. No differences were found between the two groups concerning gender distribution, number of transplants, HLA matching, panel reactive antibodies, type of induction or maintenance immunosuppressive therapy and duration of delayed graft function. Blood samples were recovered at the same time before and after transplantation, when patients displayed similar serum creatinine levels and immunosuppressive therapies. Nevertheless, some differences were observed between the two groups due to the clinical specificities of the patients presenting INS recurrence. By definition, proteinuria observed after transplantation was significantly higher in the group of INS recurrent patients compared to 'nonrecurrent' patients (4.1 ± 3.9 (median 2.71 g/day) vs. 0.34 ± 0.21 g/day, $p < 0.01$). In addition, as patients with INS recurrence presented a more severe initial disease (Table 2), immunosuppressive therapies were more aggressive (5/8 vs. 1/10 treated by CsA) and the progression to ESRF was faster than nonrecurrent patients. Finally, recurrent patients were significantly younger at the time of transplantation (29.4 ± 17.1 vs. 45 ± 8.3 years, $p < 0.02$).

All of the patients with INS recurrence after kidney transplantation were treated by plasmapheresis (Table 2). Despite this treatment, long-term follow-up revealed graft failure due to INS recurrence in five of eight patients within a median time of 29.6 months (range 7–73 months). The remaining three patients presented a good renal function with a partial remission of INS at 41, 48 and 122 months after transplantation. A control group of five patients under dialysis without INS-related ESRF were included for comparison of pretransplant values. All patients gave informed consent to this study according to French legislative guidelines.

Blood samples, RNA extraction and cDNA synthesis

Thirty milliliter of blood was collected by venopuncture. PBMC were recovered after a Ficoll gradient (Eurobio, Les Ulis, France). After washing, 2×10^7 cells were frozen in Trizol® reagent (Invitrogen™, Life Technologies, CA, USA) for RNA extraction according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration for each sample was determined by optical density measurement, and RNA quality was checked by running samples on a 1% agarose gel. Two 2 μ g of RNA were reverse transcribed using an Invitrogen cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) and diluted to a final volume of 100 μ L.

PCR amplification and elongation reactions for analysis of CDR3 length

cDNA was amplified by PCR using a C β primer and one of the 26 specific primers. The amplifications were performed in a 9600 Perkin-Elmer thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as previously described (23). Briefly, each amplification product was used for an elongation

Table 1: Main clinical characteristics of the CR-INS patients

	CR-INS patients with recurrence N = 8	CR-INS patients without recurrence N = 10	p-Value
Gender	5F/3M	5F/5M	ns
Age at the onset of dialysis (years)	27.4 ± 27.2	42.8 ± 8.5	ns
Duration of dialysis (months)	24.5 ± 23	34.7 ± 24.3	ns
Number of patients with positive PRA	3	4	ns
Age at transplantation (years)	29.4 ± 17.1 (from 8 to 63)	45 ± 8.3 (from 19 to 58)	0.02
HLA-ABDr incompatibilities	2.5 ± 1.6	2.1 ± 1.3	ns
Induction therapy for transplantation	ATG: 2 Anti-IL2 Mabs: 5 No induction:1	ATG: 2 Anti-IL2 Mabs: 7 No induction:1	ns
DGF duration (days)	9.4 ± 11.3	6.5 ± 5.8	ns
Maintenance therapy	CsA/FK506: 6/2 MMF/AZA/CS: 7/1/8	CsA/FK506: 7/3 MMF/AZA/CS: 9/1/7	ns
Serum creatinine (μmol/L)	152 ± 58	142 ± 48	ns
Proteinuria (g/day)	4.1 ± 3.9	0.34 ± 0.21	0.01

CS = corticosteroids; MMF = mycophenolate mofetil; AZA = azathioprin; ATG = antithymocyte-globulin; CNI = calcineurin inhibitors.

Table 2: Individual follow-up of CR-INS patients

Patients	Initial lesions	Period of evolution (months)	Diagnostic of recurrence (after Tx)	Day of serum recovery (after Tx)	Plasmapheresis (PE)				Follow-up
					Day of first PE	Prot. before (g/day)	Prot. nadir (g/day)	Chronic treatment	
R1	MCNS	111	Day 1	1 month	9	6.5	1.2	n = 20 every 4 days	41 m, Func, PR
R2	MCNS/ DMP	38	Day 1	1 year	12	3.0	0.7	n = 64 every 13 days	29 m, Fail, recurrence
R3	FSGS	49	Day 102	5 years	687	4.0	2.0	n = 9 every 29 days	122 m, Func, PR
R4	MCNS	36	Day 1	1 month	8	7.3	1.4	n = 83 every 5 days	48 m, Func, PR
R5	MCNS	46	Day 1	1 month	3	20.0	3.0	n = 31 every 6 days	7 m, Fail, recurrence
R6	MCNS	114	Day 1	1 month	11	6.0	0.9	n = 50 every 9 days	26 m, Fail, recurrence
R7	FSGS	62	Day 1	1 month	4	6.4	0.5	n = 63 every 3 days	13 m, Fail, recurrence
R8	MCNS/ DMP	102	Day 5	5 years	76	6.5	1.3	n = 38 every 21 days	73 m, Fail, recurrence
NR1	MCNS	344		1 month					31 m, Func
NR2	FSGS	206		1 year					81 m, Func
NR3	FSGS	177		5 years					128 m, Func
NR4	FSGS	300		1 month					72 m, Func
NR5	FSGS	28		1 month					38 m, Func
NR6	FSGS	134		1 month					29 m, Func
NR7	MCNS	149		1 month					39 m, Func
NR8	FSGS	133		1 month					36 m, Func
NR9	FSGS	140		1 month					24 m, Func
NR10	FSGS	177		1 month					46 m, Func

Time period of evolution is the time between diagnosis of initial disease and ESRF. Recurrence after transplantation was diagnosed by a persistent proteinuria above 3 g/day in all but one patient. In patient R3, INS recurrence was diagnosed by an albuminuria above 1 g/day, which was maintained below 3 g/day by Lisinopril until the start of PE. PE was introduced for all recurrent patients and induced a decrease of proteinuria in all patients (proteinuria before PE treatment and at the maximum effect observed after 3–10 PE sessions). Nevertheless, proteinuria returned to pre-PE values leading to the introduction of chronic PE therapy.

DMP = diffuse mesangial proliferation; Func = functional; PR = partial remission; Fail = renal failure; m = months; PE = plasmapheresis; Tx = transplantation.

reaction using a dye-labeled C β primer, then heat-denatured, loaded onto a 6% acrylamide-8M urea gel and electrophoresed for 5 h using an Applied Biosystems 373A DNA sequencer (Perkin-Elmer®).

TCR repertoire analysis

Diversity and T-cell selection were assessed by analysis of TCR (β chain) usage biases. In an immunologically quiescent state, the length distribution of

the TCR β chain complementary determining region 3 (CDR3) hypervariable region is Gaussian. Alteration of this Gaussian distribution is the hallmark of an activation phenomenon and proliferation.

Analysis of CDR3-LD was performed using Immunoscope® software (24). The percentage of CDR3-LD alteration for each V β family and a global percentage of CDR3-LD alteration for each individual or group were calculated

as described (25). The percentage of alteration was defined as the difference between the frequency of each CDR3 length in the distribution profile and the control distribution, calculated from the 13 age- and gender-matched healthy individuals. The global CDR3-LD alteration is represented as a topview TcLandscape® enabling an easy appraisal of the 'qualitative' measurement of the CDR3-LD bias. Only CDR3 lengths with an alteration above 30% were taken into account. The level of V β RNA was measured by real-time quantitative PCR and expressed as a ratio of a nonregulated or minimally regulated gene, HPRT. The primers used were especially designed for quantitative PCR as previously described (23). The data were displayed as a three-dimensional TcLandscape® (26,27). Percentages of CDR3-LD alterations are represented as a color code, from deep blue (~50%) to dark red (+50%). The X-axis displays the 26 human V β families, the Y-axis gives the V β /HPRT ratios and the Z-axis gives the CDR3 lengths. The color code for the tridimensional TcLandscape® is the same as that used for the corresponding topview.

Statistical analysis

Global CDR3-LD alterations were analyzed before transplantation using a nonparametric Kruskal-Wallis test (three groups) and after transplantation using a Mann-Whitney test (two groups). Qualitative (percentage of alteration) and quantitative (V β /HPRT ratio) values were analyzed separately for each V β family using SPSS software. The mean values for the different groups were first compared using a Welch test, and when appropriate, a T3 Dunnett *post hoc* test was performed. In each case, a conventional p-value of <0.05 was used to indicate significance.

Results

Longitudinal analysis of the V β transcriptome in CR-INS patients

CDR3-LD alterations in CR-INS patients were analyzed on the day of transplantation and at different time points after transplantation (1 month, 1 year, 5 years). The V β transcriptome profile of three representative patients presenting INS recurrence and three 'nonrecurrent' patients are shown in Figure 1. A Gaussian pattern is represented in green on the landscape, whereas red points indicate CDR3-LD alteration. V β /HPRT transcripts values are plotted on the y-axis.

For both groups (with or without recurrence), CDR3-LD analysis performed before and after transplantation revealed patterns roughly stable in time, in terms of both CDR3-LD alterations and V β /HPRT transcript ratios. However, over the 6-year interval, the global CDR3-LD alterations decreased from 25% to 16.6% in 'nonrecurrent' patient (NR3), whereas they remained unchanged for the 'recurrent' patients over the same period. As illustrated in the topviews (Figure 1), some V β alterations with the same CDR3 length persisted longitudinally in the same patient: Recurrent patients R1, R2 and R3 displayed CDR3-LD alterations of the V β 23, V β 13.5 and V β 13.1 families, respectively, that were stable in time. Similarly, patients without recurrence displayed stable CDR3-LD alterations of the V β 21 and V β 23 (NR1) and V β 17 and V β 23 (NR2) families. Finally, persistent V β alterations differed between individuals, indicating that each patient develops an individual pattern of T-cell predominance.

The blood T cells of 'recurrent' patients do not display more global CDR3-LD alterations than those of controls before or after transplantation

The peripheral T-cell V β transcriptomes of 'recurrent' and 'nonrecurrent' patients were compared before and after transplantation (Figure 2). Patients under dialysis served as controls. Calculation of the average percentage of global CDR3-LD alterations (all V β families), represented in Figure 3, revealed only a borderline difference among 'recurrent' patients, 'nonrecurrent' patients and control patients under dialysis before transplantation (17.6 ± 1.2% vs. 22.9 ± 1.1% and 21.2 ± 0.7%, p < 0.05 and ns, respectively). The same difference was observed after transplantation (18.3 ± 0.9% vs. 24.7 ± 2.6%, p < 0.05), suggesting no clonal T selection associated with INS recurrence. To better document the differences found between the global percentages of alteration, the distribution of the CDR3-LD alterations was investigated according to a grading scale in the three groups, before and after transplantation (Table 3). Patients without recurrence and hemodialyzed controls displayed more CDR3-LD alterations above 30% than patients with INS recurrence, before (21.92% and 19.23% vs. 10.68%) and after transplantation (29.71% vs. 9.13%).

As the results of the global CDR3-LD alteration analysis indicated few V β CDR3-LD alterations in patients with recurrence, the percentage of alteration for each of the 26 V β families in each patient was determined and statistically compared. No significant differences were observed between CR-INS patients and controls before transplantation and no V β family could discriminate and/or predict patients with or without INS recurrence.

V β /HPRT transcript ratios

As an indirect estimate of possible abnormal clonal selection, the levels of V β mRNA assessed by the V β /HPRT transcript ratio were compared between the groups for the 26 V β families. The main difference was found in the V β 3 family. Before transplantation, 60% of 'nonrecurrent' patients and 100% of controls accumulated V β 3 transcripts whereas 80% of patients with recurrence displayed a flat TcLandscape (Figure 4). This observation was also made after transplantation.

Despite V β 3 accumulations being observed in two of the eight patients with recurrence, they were less frequent and smaller than in patients without recurrence and controls. No differences were found for the other V β /HPRT transcripts.

Discussion

The role of T cells in the initial stages of INS has been suggested for more than four decades but evidence for a direct involvement of these cells is still lacking. Most studies of INS relapse have reported the presence of T cells in the

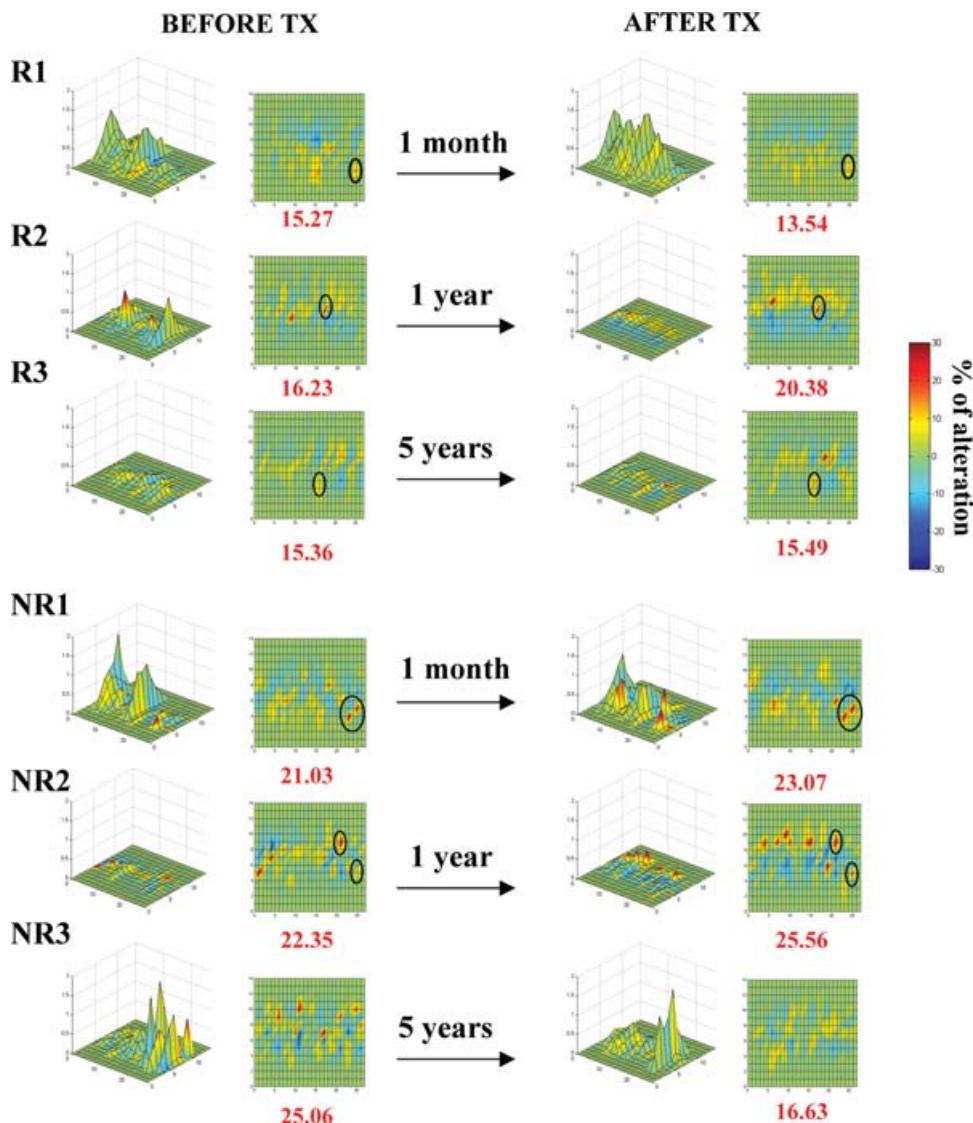


Figure 1: Alterations of the CDR3-LD before and after transplantation for the same patient. TcLandscape and topview illustrations of PBMC from three representative 'recurrent' patients (R) and three 'non-recurrent' patients (NR), the day of transplantation and 1 month, 1 year and 6 years after transplantation. The global CDR3-LD alteration is indicated below each topview. CDR3 length alterations >25% appear in red. A black circle indicates the persistent altered families before and after transplantation showing CDR3-LD alterations that are stable in time.

periphery with an activated phenotype. Moreover, when comparing corticosteroid-sensitive patients during relapse to those in remission, an expansion of CD4+CD25+ T-cell population has been reported (28), as well as an increase in IL13 mRNA production (14) and an activation of the transcription factor NF- κ B pathway (18). In addition, Franck et al. described clonal expansions of CD8+ T cells in corticoresistant patients, evoking the occurrence of antigenic stimulation and/or the presence of memory clones (22). All these observations suggest an activation via the TCR signaling pathway during the active stage of the disease.

Our aim was to better characterize the possible involvement of T lymphocytes by studying the T-cell repertoire in a selected group of idiopathic nephrotic patients through a qualitative and quantitative analysis of the V β transcriptome. To this end, patients with an immediate recurrence of INS after kidney transplantation were selected for the

study. Such patients present a unique opportunity to analyze the role of T cells in a homogeneous form of nephrotic syndrome. The rapidity of INS recurrence (29) is suggestive of two hypotheses: the first is that these patients present a persistently active disease during dialysis and the second is that recurrence could be the result of a reactivation of T-cell memory clones by alloreactivity or stimulation by viral or unknown antigens. The latter hypothesis is also sustained by a higher rate of acute rejection in patients with INS recurrence (30). Our study clearly shows that, even during immediate recurrence after kidney transplantation, the blood T cells of CR-INS patients show no increase in CDR3-LD alterations compared to pretransplantation. At 1 month after transplantation, their peripheral T cells display even less CDR3-LD alterations than those from patients without recurrence. The absence of alteration of TCR usage in such overtly proteinuric patients is in contradiction with the idea of a direct role for clonal T-cell activation during this process.

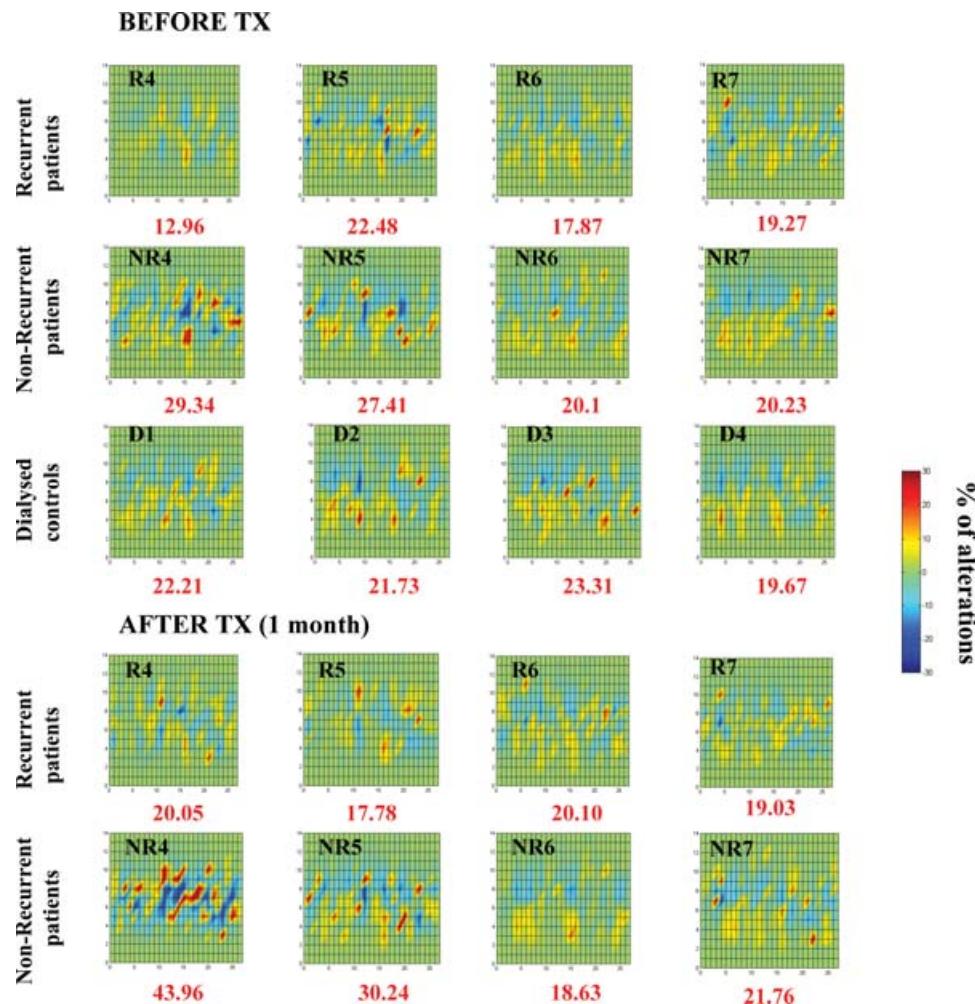


Figure 2: Topview representation of the T-cell V β transcriptome in the blood of each group of patients. Four out of eight 'recurrent' patients; 4/10 'nonrecurrent' patients and 4/5 patients under dialysis that served as controls are represented before and after transplantation. The global CDR3-LD alteration is indicated below each Topview. CDR3 length alterations >25% appear in red. The X-axis represents the 26 V β families and the Y-axis gives the CDR3 length.

These results obtained in a very selected population (i.e. patients with immediate INS recurrence), are in contrast to those of a study of a less selective population of childhood nephrotic syndrome patients with frequent INS relapses where a persistent expansion of CD8+ T cells with an individual pattern of T-cell predominance was found (22). The results of the latter study argue for an antigen-specific stimulation with the expansion of specific and resistant clones in CR patients. It is well known that some viral infections or allergens can in some instances be associated with onset or recurrence of INS, although healthy patients also display some persistent alterations of their T-cell repertoire (Guillet et al., accepted) and such a control population was not included in this study. In our selected population, we detected only minor statistical differences between the T-cell landscapes of 'recurrent' and 'nonrecurrent' patients before and after transplantation, as well as with patients under dialysis as a result of different renal diseases. Finally, when alterations were detected, they were patient-restricted, persisted for a long time regardless of the patient group, and were not directly related to the persistence of nephrotic syndrome.

Surprisingly, the alloreactivity and/or the immunosuppressive therapy had only a marginal impact on the T-cell repertoire of these patients. Several types of immunosuppressive regimen were administered in our small cohort of transplant patients and none of the patients had presented acute rejection. In addition, recurrent patients who subsequently lost their graft did not present any evidence of allograft nephropathy or chronic rejection. These observations reinforce the results obtained following analysis of the V β transcriptome of cells infiltrating rejected allografts with chronic dysfunction, where only one-third of patients presented a skewed repertoire, supporting the hypothesis that the major cause of graft loss is not immunological (or TCR-mediated) (23).

It is well known that INS will recur in around 30% of adult INS patients following their first kidney transplantation. The mechanisms responsible for this recurrence are not yet defined but as for the initial disease, T cells have been suspected to be the source of a permeability factor. Our results do not exclude a role for T lymphocytes in INS recurrence but discredit an antigen-driven response,

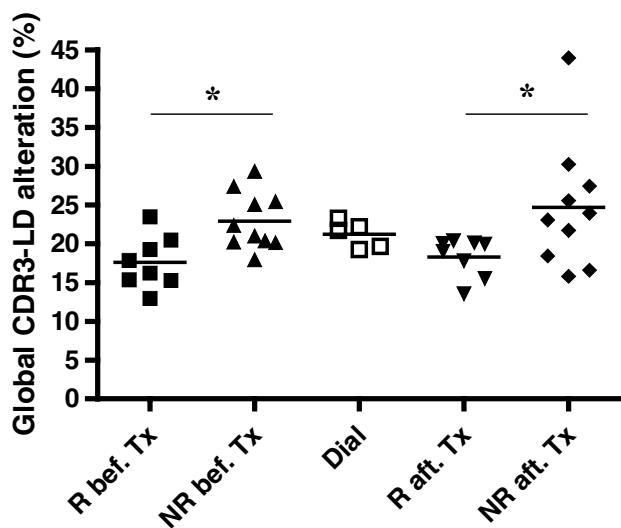


Figure 3: Patients presenting recurrence displayed fewer CDR3-LD alterations than controls before and after transplantation. Values of global CDR3-LD alteration for each patient are indicated. The mean value for each group is indicated by a bar. * $p < 0.05$.

a super-antigenic activation or a reactivation through allorecognition. Major recent advances concerning the abnormalities of T cells have been made by studies performed in minimal change glomerulonephritis (31). The immune dysfunctions observed in MCNS were described mainly in CD4+ T cells and include a down regulation of the IL12R β 2 subunit that is selectively expressed by Th1 cells (13), an increased production of Th2 cytokines (14)

Table 3: Distribution of the CDR3-LD alterations between the groups according to a grading scale of 10–20, 20–30, 30–40, 40–50 and $\geq 50\%$ alteration

% Alteration	[10–20]	[20–30]	[30–40]	[40–50]	≥ 50
R before Tx	43.59	23.93	6.84	2.56	1.28
NR before Tx	37.31	32.69	11.54	6.92	3.46
Dial	47.69	30.77	12.31	5.38	1.54
R after Tx	41.83	29.81	5.29	2.40	1.44
NR after Tx	32.52	29.37	15.38	6.99	7.34

and a strong induction of c-maf, which promotes Th2 and attenuates Th1 differentiation (32). Recently, T-cell dysfunction associated with abnormal mRNA splicing was evoked in MCNS patients, highlighting the possibility that independent intrinsic TCR abnormalities could be involved in INS (33). Studies to test these hypotheses are now ongoing in patients with recurrence of INS after kidney transplantation.

Overall, our data suggest that patients presenting INS recurrence display a stable repertoire and fewer CDR3-LD alterations than the control population, suggesting a limited T-cell clonal selection throughout the disease. These results suggest that INS recurrence after renal transplantation does not involve TCR activation or specific clonal expansion of T cells.

Acknowledgments

This work was supported in part by the 'Fondation Progreffe'. We thank J. Ashton-Chess for her help in editing the manuscript.

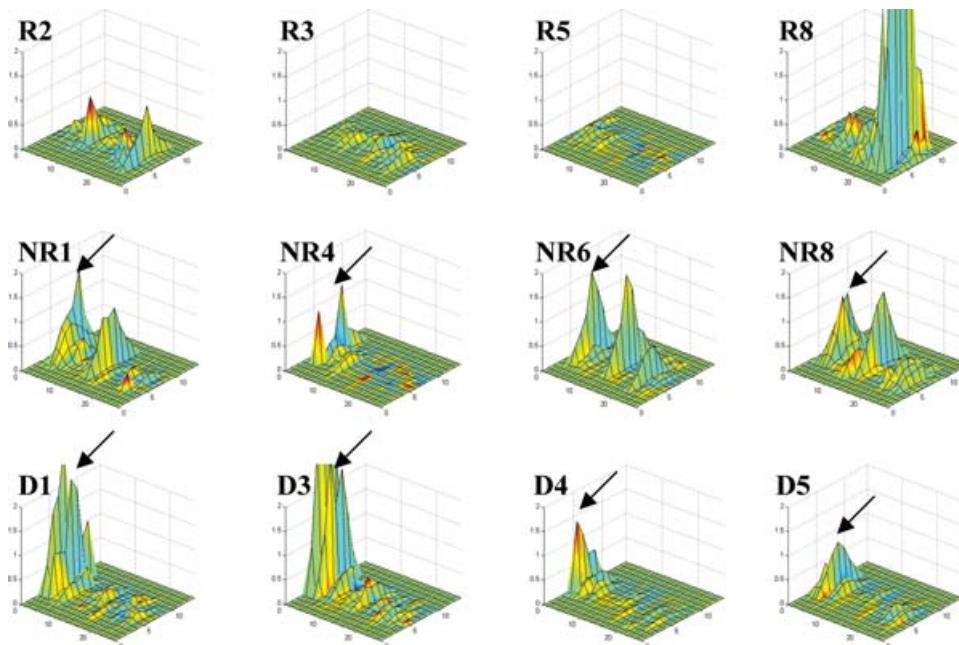


Figure 4: V β 3 accumulation is mainly found in patients under dialysis rather than in patients presenting recurrence. Representation of the T-cell V β transcriptome for four representative patients in each group before transplantation. The open arrow indicates an abundance of the V β 3 family.

References

1. Haas M, Meehan SM, Garrison TG, Spargo BH. Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: A comparison of renal biopsy findings from 1976–1979 and 1995–1997. *Am J Kidney Dis* 1997; 30: 621–631.
2. Banfi G, Moriggi M, Sabadini E et al. The impact of prolonged immunosuppression on the outcome of idiopathic focal-segmental glomerulosclerosis with nephrotic syndrome in adults. A collaborative retrospective study. *Clin Nephrol* 1991; 36: 53–59.
3. Rydel JJ, Korbet SM, Borok RZ, Schwartz MM. Focal segmental glomerular sclerosis in adults: Presentation, course, and response to treatment. *Am J Kidney Dis* 1995; 25: 534–542.
4. Schulman SL, Kaiser BA, Polinsky MS et al. Predicting the response to cytotoxic therapy for childhood nephrotic syndrome: Superiority of response to corticosteroid therapy over histopathologic patterns. *J Pediatr* 1988; 113: 996–1001.
5. Ponticelli C, Passerini P. Conventional treatment of idiopathic nephrotic syndrome and membranous nephropathy in adults. *Clin Nephrol* 1991; 35(Suppl 1): S16–S21.
6. Lieberman KV, Tejani A. A randomized double-blind placebo-controlled trial of cyclosporine in steroid-resistant idiopathic focal segmental glomerulosclerosis in children. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 56–63.
7. Dantal J, Baatard R, Hourmant M et al. Recurrent nephrotic syndrome following renal transplantation in patients with focal glomerulosclerosis. A one-center study of plasma exchange effects. *Transplantation* 1991; 52: 827–831.
8. Tejani A, Stablein DH. Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis posttransplantation: A special report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2(12 Suppl): S258–S263.
9. Niaudet P. Genetic forms of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2004; 19: 1313–1318.
10. Reiser J, Polu KR, Moller CC et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* 2005; 37: 739–744.
11. Shalhoub RJ. Pathogenesis of lipid nephrosis: A disorder of T-cell function. *Lancet* 1974; 2: 556–560.
12. van den Berg JG, Weening JJ. Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107: 125–136.
13. Sahali D, Pawlak A, Valanciute A et al. A novel approach to investigation of the pathogenesis of active minimal-change nephrotic syndrome using subtracted cDNA library screening. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1238–1247.
14. Yap HK, Cheung W, Murugasu B et al. Th1 and Th2 cytokine mRNA profiles in childhood nephrotic syndrome: Evidence for increased IL-13 mRNA expression in relapse. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 529–537.
15. Neuhaus TJ, Wadhwa M, Callard R, Barratt TM. Increased IL-2, IL-4 and interferon-gamma (IFN-gamma) in steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol* 1995; 100: 475–479.
16. Cho BS, Yoon SR, Jang JY et al. Up-regulation of interleukin-4 and CD23/Fc epsilon RII in minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 1999; 13: 199–204.
17. Grimbert P, Valanciute A, Audard V et al. Truncation of C-mip (Tc-mip), a new proximal signaling protein, induces c-maf Th2 transcription factor and cytoskeleton reorganization. *J Exp Med* 2003; 198: 797–807.
18. Valanciute A, le Gouvello S, Solhonne B et al. NF-kappa B p65 antagonizes IL-4 induction by c-maf in minimal change nephrotic syndrome. *J Immunol* 2004; 172: 688–698.
19. Tanawattanacharoen S, Falk RJ, Jennette JC, Kopp JB. Parvovirus B19 DNA in kidney tissue of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 2000; 35: 1166–1174.
20. Wittig HJ, Goldman AS. Nephrotic syndrome associated with inhaled allergens. *Lancet* 1970; 1: 542–543.
21. Savin VJ, Sharma R, Sharma M et al. Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 878–883.
22. Frank C, Herrmann M, Fernandez S et al. Dominant T cells in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney Int* 2000; 57: 510–517.
23. Gagne K, Brouard S, Giral M et al. Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J Immunol* 2000; 164: 1553–1563.
24. Pannetier C, Even J, Kourilsky P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today* 1995; 16: 176–181.
25. Gorochov G, Neumann AU, Kereveur A et al. Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nat Med* 1998; 4: 215–221.
26. Sebille F, Gagne K, Guillet M et al. Direct recognition of foreign MHC determinants by naive T cells mobilizes specific Vbeta families without skewing of the complementarity-determining region 3 length distribution. *J Immunol* 2001; 167: 3082–3088.
27. Guillet M, Brouard S, Gagne K et al. Different qualitative and quantitative regulation of V beta TCR transcripts during early acute allograft rejection and tolerance induction. *J Immunol* 2002; 168: 5088–5095.
28. Neuhaus TJ, Shah V, Callard RE, Barratt TM. T-lymphocyte activation in steroid-sensitive nephrotic syndrome in childhood. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 1348–1352.
29. Striegel JE, Sibley RK, Fryd DS, Mauer SM. Recurrence of focal segmental sclerosis in children following renal transplantation. *Kidney Int Suppl* 1986; 19: S44–S50.
30. Kim EM, Striegel J, Kim Y et al. Recurrence of steroid-resistant nephrotic syndrome in kidney transplants is associated with increased acute renal failure and acute rejection. *Kidney Int* 1994; 45: 1440–1445.
31. Grimbert P, Audard V, Remy P et al. Recent approaches to the pathogenesis of minimal-change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 245–248.
32. Ho IC, Lo D, Glimcher LH. c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms. *J Exp Med* 1998; 188: 1859–1866.
33. Grimbert P, Audard V, Valanciute A et al. Abnormal RNA processing and altered expression of serin-rich proteins in minimal-change nephrotic syndrome. *Pediatr Res* 2005; 57: 133–137.

Répertoire des Lymphocytes T et Biomarqueurs : Approches Statistiques

En transplantation rénale, la recherche de marqueurs biologiques liés au devenir à long terme du greffon s'oriente vers la prévention du rejet chronique et vers l'identification de patients susceptibles de développer une tolérance spontanée de leur greffon, en l'absence ou sous faible doses d'immunosuppresseurs. L'analyse globale du répertoire des lymphocytes T, basée sur l'étude des distributions de longueurs des boucles CDR3 de la chaîne beta du récepteur des lymphocytes T et sur les quantités de transcrits codant pour cette région, est un indicateur puissant de l'état du système immunitaire des patients transplantés. Le développement de méthodes statistiques spécialement dédiées à l'analyse des distributions de longueurs CDR3 constitue la majeure partie de ce travail et a permis de mettre en évidence les différences existant entre patients en rejet chronique et patient opérationnellement tolérant. Ces nouvelles méthodes ont aussi permis de révéler la grande hétérogénéité d'une cohorte de deux cent patients stables depuis au moins cinq ans et sous immunosuppression. De nombreuses pistes restent encore à explorer, concernant l'analyse des distributions de longueurs CDR3 et la validation des signatures du répertoire T, pour une prédiction efficace du devenir à long terme du greffon.

Mots-clés : CDR3, biostatistiques, transplantation, analyses factorielles, biomarqueur, spectratyping, immunoscope, sclérose en plaques

T cell Repertoire and Biomarkers : Statistical Approaches

In renal transplantation, biomarkers that predict long-term allograft outcome are dedicated towards prevention of chronic rejection or the identification of patients that could potentially develop a spontaneous tolerance versus their graft, without or low doses of immunosuppressors. Global T cell repertoire analysis, based on the study of the length distributions of the T cell receptor CDR3 beta chain and of the quantities of transcripts coding for this region, is a powerful indicator of the state of the immune system of transplanted patients. The implementation of statistical methods specially dedicated to the analysis of CDR3 length distributions constitutes the major part of this work and allows putting in evidence the differences existing between patients with chronic rejection and operationally tolerant patients. These new methods also allowed showing the high heterogeneity of a cohort of two hundred patients with a stable graft function for at least five years and under immunosuppression. Perspectives are given to this work in term of improving the statistical methods developed for the analysis of the CDR3 length distribution and for the validation of the T cell repertoire signatures in order to efficiently predict long-term allograft outcome.

Keywords : CDR3, biostatistics, transplantation, factorial analysis, biomarker, spectratyping, immunoscope, multiple sclerosis