

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTÉS DE MÉDECINE

ANNÉE 2019

2019 TOU3 1622

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement

par

Julien CARRILLO

Le 7 octobre 2019

**PRONOSTIC DES RECEPTEURS INHIBITEURS ASSOCIES A
L'EPUISEMENT LYMPHOCYTAIRE EN TRANSPLANTATION
RENALE INCOMPATIBLE**

Directeur de thèse : Dr Arnaud DEL BELLO

JURY

Monsieur le Professeur Nassim Kamar	Président
Monsieur le Professeur Dominique Chauveau	Assesseur
Monsieur le Professeur Stanislas Faguer	Assesseur
Madame le Docteur Julie Belliere	Assesseur
Monsieur le Docteur Arnaud Del Bello	Suppléant
Monsieur le Docteur Emmanuel Treiner	Membre invité

Remerciements

A Monsieur le Professeur Nassim Kamar,

Pour me faire l'honneur de présider ce jury,

Pour m'avoir accompagné avec bienveillance tout au long de mes années d'internat,

J'exprime ici ma plus profonde gratitude et mes remerciements les plus sincères.

A Monsieur le Professeur Dominique Chauveau,

Pour avoir partagé votre enseignement et votre sagesse,

Pour me faire l'honneur de participer au jury de cette thèse,

Veuillez trouver ici mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Stanislas Faguer,

Pour avoir éclairé de nombreuses réponses et soulevé autant de questions,

Pour me faire l'honneur de participer au jury de cette thèse,

J'exprime ici mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Emmanuel Treiner,

Ce travail n'aurait pas été possible sans vous et votre précieuse lecture des résultats.

Pour me faire l'honneur de participer au jury de cette thèse,

Veuillez trouver ici mes plus sincères remerciements.

A Madame le Docteur Julie Belliere,

Travailler ensemble fut un plaisir. J'ai immensément appris à tes côtés.

Pour me faire l'honneur de participer au jury de cette thèse,

J'exprime ici mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Arnaud Del Bello,

Ce travail est l'aboutissement d'un long chemin, des frissons du stress oxydatif jusqu'aux spirales de l'épuisement lymphocytaire. Il n'aurait pas été atteint sans ta persévérance et ton acuité à discerner les pistes d'aventure parmi les impasses de l'ennui. Je suis très heureux d'avoir participé à la réalisation de ce projet qui te tenait à cœur. Je te remercie infiniment de la confiance sans faille que tu m'as accordée en acceptant de diriger ce travail.

A Monsieur le Docteur Olivier Cointault,

Au-delà des apparences, tu fus parmi les premiers à percer à jour les horizons mystérieux des champignons hawaïens et des manuels interminables. Je te suis éternellement reconnaissant pour l'approche, la vision et l'expérience de la médecine que tu partages volontiers. Ta présence fut salvatrice pour mes années d'internat. Accepte de recevoir ma plus profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur David Ribes,

Comme bien d'autres, ma vocation pour la néphrologie est née très tôt à l'occasion d'une des nombreuses séances d'enseignement improvisé que tu dispenses sans compter aux étudiants. J'espère que tu continueras de partager ta passion avec ferveur. Je te remercie sincèrement.

A Monsieur le Docteur Antoine Huart,

Si le contre-pouvoir du troisième étage est indispensable à l'équilibre de l'équipe et des internes en particulier, il semble que l'humour rabelaisien le soit devenu à son tour. La gourmandise et la bonne humeur sont toujours des traits agréables lorsqu'ils vont de pair. Je t'adresse mes remerciements les plus sincères.

A Madame le Docteur Amandine Darres et Monsieur le Docteur Nicolas Setbon,

J'ai été ravi de partager tant de moments avec vous. Je ne doute pas que notre amitié se poursuivra. Puissions-nous continuer de travailler ensemble au cours des années à venir.

A mes Chefs de Clinique du Passé et du Présent, le Dr David Milongo, le Dr Ines Ferrandiz, le Dr Damien Guinault, le Dr Olivier Roque, le Dr Antoine Delarche, le Dr Saint-Cricq, le Dr Galinier, Le Dr Candela,

Je vous remercie infiniment pour votre tutelle bienveillante et pour avoir partagé votre expérience.

A toute l'équipe du département de néphrologie, du troisième et du septième étage,

Mes sincères remerciements pour votre accueil et votre gentillesse.

A l'équipe d'infectiologie Toulousaine et à Lydie Porte tout particulièrement,

Je vous remercie infiniment de m'avoir accueilli et d'avoir partagé votre expérience.

A l'Equipe de Réanimation et de Néphrologie du Val d'Ariège

Votre accueil chaleureux restera parmi mes meilleures expériences. Je vous remercie sincèrement.

A mes Co-Internes, du Passé et du Présent, Ondine, Clara, Tiphaine, Ikram, Charlotte, Rémi, Sofian, Pierre, Charlotte, Asma, Etienne, Alexis, Marine, Eloise, Joseph, Mathilde, Chloé, Clothilde, Camille, Rebecca

Allez jusqu'au bout, vous verrez ça vaut le coup !

A Thomas « Monseigneur » Laumon, à Guillaume « Pluq » Pluquet, à Paul « Vogli » Voglimacci-Stephanopoli, à Clément « Le Fléau » Puech

J'espère simplement que vous avez lu et compris intégralement ce travail. Le reste, vous le savez.

A Thibault « Eclaireur » Tambourré

L'autonomie et la survie sont des compétences rares que tu transmets brillamment. Merci !

A Clément et Anna,

Et à notre belle amitié !

A Lise,

Tu m'as soutenu longuement pendant la rédaction de ce travail. Merci !

A Quentin « agent P » Poupot,

Compagnon de cordée téméraire mais indéfectible, merci !

A Robin, Jeff, Adrian, Joachim, Johnathan

Merci pour celles belles années !

A Nico « Capet », Tristan, Gabriel, Alex "Acquier"

A Sophie, Alice, Cécile et Laura

A Laetitia et Pierre

A Guillaume, Maxime et Adeline,

Aux Amis Fidèles, Irremplaçables, Partie Intégrante des Equipes, Associations, Collectifs, Boys Bands, Couples et autres groupements inclassées successifs : Sub Ninja loot culture, Koala Eucalyptus Team, 5 Guys 1 Dodge, Pyrénées Parano Episode 1,2,3, le Rap du Bulle Neuf, les Congrès Annuels de Neurosciences, les skieurs du dimanche, Radio Cachi, le Piso Flemming, les Erasmus, le Foghé Skate Crew, le 65, la Section Européenne Espagnol...

Je ne vous oublie pas...

Au Colonel Kurtz,

Que je n'aurai heureusement finalement pas rencontré pendant la rédaction de ce travail.

A Hippocrate,

Qui nous appelle chaque jour à surmonter l'absurdité de l'existence par son héritage intemporel : « Nul ne peut se prétendre médecin s'il ne connaît les bases de l'astrologie. »

A Maurice,

Pour tes quelques conseils précieux au début de mes études, je te remercie vivement ici !

A Martine et Jean Marc Nazarezeck,

Pour toutes ces agréables étés de vacances en votre compagnie, je vous remercie chaleureusement !

A Mes Oncles, Albert et Jean Bardaji,

Vous m'avez apporté la curiosité et le goût de la science. Vous êtes la première pierre de cet édifice. Je vous embrasse.

A Mes Parents et ma Sœur Eva,

Les plus importants. Vous m'avez soutenu depuis mes premiers souffles jusqu'à mes dernières névroses. Vous avez toujours été là. Vous êtes les héros de ce travail. Je vous embrasse.

INTRODUCTION

Le concept d'épuisement lymphocytaire a été évoqué pour la première fois en 1967 par Sterzl et al puis en 1968 par Byers et al, à l'occasion d'expériences soumettant des rongeurs à de fortes doses d'antigène. Ils mettaient ainsi en évidence une diminution progressive de la réponse immunitaire spécifique [1], [2].

Différents états de dysfonction lymphocytaire ont été décrits depuis lors, résultant d'altération dans les mécanismes d'activation et de différenciation des lymphocytes T [3]–[5]. Selon la situation clinique ou les conditions expérimentales, les termes de tolérance, d'anergie, de senescence et d'épuisement ont été utilisés [6]–[8]. Les lymphocytes T épuisés (*T ex*) sont caractérisés par la perte de leurs fonctions effectrices, par une surexpression de récepteurs inhibiteurs (*IRs*), par une altération du profil transcriptionnel et métabolique, et par l'incapacité à acquérir le statut "quiescent" propre aux lymphocytes T mémories (*T mem*) [5], [9], [10]. Le concept d'épuisement lymphocytaire manque actuellement d'une définition consensuelle, rendant parfois difficile la synthèse des résultats issus d'études de groupes différents.

Chez l'homme, l'épuisement a principalement été étudié dans des situations d'infection chronique telles que le VIH [11]–[14], le VHC [15], [16], le VHB [17] et également dans des maladies dysimmunitaires [18], [19] ou encore dans le cancer [20], [21].

En transplantation d'organe, l'hypothèse d'un épuisement lymphocytaire qui contribuerait à la tolérance et à la survie du greffon est émise pour la première fois par Starzl et al en 1998 [22]. Néanmoins, à ce jour les déterminants d'un épuisement lymphocytaire en transplantation restent incertains. Une étude récente [23] a identifié plusieurs populations de lymphocytes T épuisés corrélées avec le pronostic clinique dans une série de patients transplantés rénaux. Ces travaux suggèrent que l'étude précise des lymphocytes T permettrait de mieux déterminer les risques et les complications liés à la transplantation.

Nous avons donc mené un travail rétrospectif monocentrique visant à établir la valeur pronostique des marqueurs inhibiteurs associés à l'épuisement lymphocytaire en transplantation rénale ABO et HLA incompatible.

Ci-dessous, une brève revue de la littérature, préambule au travail clinique présenté sous forme d'un manuscrit en anglais.

I/ Caractéristiques de l'épuisement lymphocytaire

Activation et différenciation d'un lymphocyte T CD8 :

Lors des infections aigües ou à la suite d'une vaccination, il se produit une prolifération et une expansion clonale des lymphocytes T CD8 naïfs. Ces derniers se différencient en CD8 effecteurs (*T eff*) dont le but se résumerait à éliminer les cellules pathologiques [24]. Ces processus sont permis par des changements transcriptionnels, épigénétiques, métaboliques et s'accompagnent de l'acquisition de capacités à produire des cytokines et des molécules cytotoxiques [25]

Dans les suites d'une situation aigue, après élimination de l'antigène et après résolution de l'inflammation, on assiste à la mort cellulaire par apoptose de la majorité des lymphocytes activés [26]. Cependant, une faible proportion de cellule persiste et se différencie en lymphocytes T mémoires (*T mem*). Ceux-ci régulent négativement leur programme effecteur et acquièrent des capacités de survie semblables aux cellules souches, indépendantes de la présence de l'antigène [25]. Elles deviennent des cellules à longue durée de vie qui accueillent une homéostasie lente et un renouvellement moléculaire lent, médié notamment par IL7 et IL15 [27].

Différentes formes de dysfonction lymphocytaire

Le concept d'une cellule *persistante mais dysfonctionnant* a été mis en évidence pour la première fois par l'équipe de Zajac *et al.* [28], [29]. Les auteurs ont étudié la régulation de la réponse T CD8+ spécifique du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) sur un modèle murin d'infection chronique à ce virus. Ils ont ainsi pu montrer que certains LT CD8+ spécifiques d'un épitope majeur du virus pouvaient persister et proliférer *in vitro* tout en perdant leur capacité opérationnelle de réponse après une stimulation spécifique.

Il existe plusieurs voies identifiées conduisant à une altération qualitative et quantitative de la réponse immune des lymphocytes T. Ces voies sont représentées par des processus de différenciation, par des marqueurs phénotypiques de surface ainsi que par des signatures moléculaires qui leur sont propres [5], [30].

L'anergie est un phénomène observé *in vitro* lorsque des cellules T sont stimulées par un antigène en l'absence de costimulation. Ces cellules deviennent alors aréactives aux stimulations ultérieures. L'anergie, ou la tolérance immune, semble être un état aréactif distinct de l'épuisement [6]. L'anergie des cellules est induite dès la première stimulation par un antigène et se met en place rapidement, contrairement à l'épuisement qui revêt un caractère progressif. De plus, le profil transcriptionnel est également distinct [5].

La senescence, définie comme un état de différenciation terminale et de perte de capacité de prolifération, doit être distinguée de l'épuisement [7], [31] Si les CD8 épuisés montrent des défauts de prolifération, ils n'expriment peu ou pas les marqueurs de senescence. Les cellules T CD8 sénescentes expriment KLRG1 ou CD57, et parviennent à remplir leurs fonctions effectrices, contrairement aux CD8 épuisés. De plus, il est possible de distinguer les deux populations par la mesure de leur télomères [7].

La déplétion physique pourrait être l'étape ultime de la dysfonction lymphocytaire, telle qu'elle est observée dans certaines situations où la stimulation antigénique est prolongée [28]. Plusieurs études ont montré la contraction ou la déplétion du compartiment CD8 dans ce contexte [30], [32], [33].

Définition de l'épuisement lymphocytaire

Dans les situations d'infection chronique ou de maladie cancéreuse, lorsque la stimulation antigénique persiste, le développement des *T mem* est entravé. On voit alors apparaître des lymphocytes « épuisés » (*T ex*). Les *T ex* sont fonctionnellement distincts des *T eff* et des *T mem* [5].

Selon la définition proposée par l'équipe de Wherry et al, les lymphocytes T CD8+ épuisés possèdent les caractéristiques suivantes [9] :

- La perte progressive et *hiérarchique* des fonctions effectrices et du potentiel prolifératif
- Une forte expression des marqueurs inhibiteurs (IRs)
- Une altération de la réponse aux cytokines
- Des anomalies métaboliques
- Une altération de l'expression de facteurs de transcription
- Un programme épigénétique distinct des *T eff* et *T mem*

Prises individuellement, ces caractéristiques sont insuffisantes pour identifier avec certitude les cellules épuisées. Néanmoins, dans de nombreuses situations, ces particularités peuvent être mises en évidence simultanément. Certains auteurs suggèrent que les *T ex* représentent une population distincte avec une voie de différenciation unique, un phénotype et une collection de fonctionnalités propres, par rapport aux *T eff* et aux *T mem* [34].

Les voies de développement de l'épuisement T restent actuellement mal comprises. La persistance de la stimulation antigénique semble indispensable, car cette caractéristique est partagée par de nombreux modèles d'infections chroniques ou de cancer, chez l'homme et chez la souris [30]. La sévérité de l'épuisement est parfois corrélée avec la charge antigénique ou la durée de l'infection. Plusieurs degrés d'état d'épuisement peuvent donc se produire, correspondant à plusieurs degrés de dysfonction CD8 [35]. D'autres facteurs sont probablement impliqués dans le développement de l'épuisement, notamment l'environnement inflammatoire associé à une forte expression de cytokine [36].

La perte progressive et hiérarchique des fonctions effectrices est suggérée initialement par les travaux de Fuller, Zajac et Wherry portant sur un modèle murin d'infection au LCMV. [32], [37]. En l'absence de dysfonction lymphocytaire, l'interleukine-2 (IL-2) est produite par les cellules T CD4+ et CD8+ activées, et induit leur propre prolifération après reconnaissance d'un antigène. Elle a également une action sur la survie des cellules T régulatrices. L'interféron-gamma (IFN- γ) est produit par les cellules T CD4+, T CD8+ et par les cellules NK. Il permet essentiellement l'activation des macrophages en vue de la phagocytose, dans le cadre de la réponse Th1. Le Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) est produit par les macrophages, les lymphocytes T et les mastocytes, il possède de multiples effets biologiques. Il conduit à l'activation des cellules endothéliales, des neutrophiles et à l'apoptose de nombreux types cellulaires.

Dans la définition de l'épuisement lymphocytaire proposée par Wherry et al [37], la diminution de production d'IL-2 est observée précocement, séquentiellement suivie d'un défaut de synthèse de TNF- α . La cytotoxicité peut également être compromise à ce stade de l'épuisement. La diminution de synthèse d'IFN- γ apparaît en général à des stades plus avancés d'épuisement et correspond à des lymphocytes T épuisés *terminaux* [38], [39].

Les travaux antérieurs sur l'interleukine-17 (IL-17) montrent une production essentiellement assurée par la sous population de cellules T CD4+ Th17. La principale fonction de ces cellules Th17 est de stimuler le recrutement de neutrophiles et, dans une moindre mesure, les monocytes, induisant ainsi l'inflammation qui accompagne de nombreuses réponses immunitaires adaptatives cellulaires, notamment dans les infections fongiques, mais aussi parasitaires et bactériennes [40], [41]. Le rôle de l'IL-17 a été peu étudié dans son association avec l'épuisement lymphocytaire, mais une étude [42] portant sur un modèle murin d'infection chronique par *Trypanosoma cruzi*, suggère que cette cytokine possède un lien étroit avec l'expression et la signalisation des IRs. En effet, chez les souris infectées KO pour le gène du récepteur de l'IL-17 (IL-17RA), l'adjonction d'inhibiteur de PD-1 restaurait partiellement la fonction des CD8.

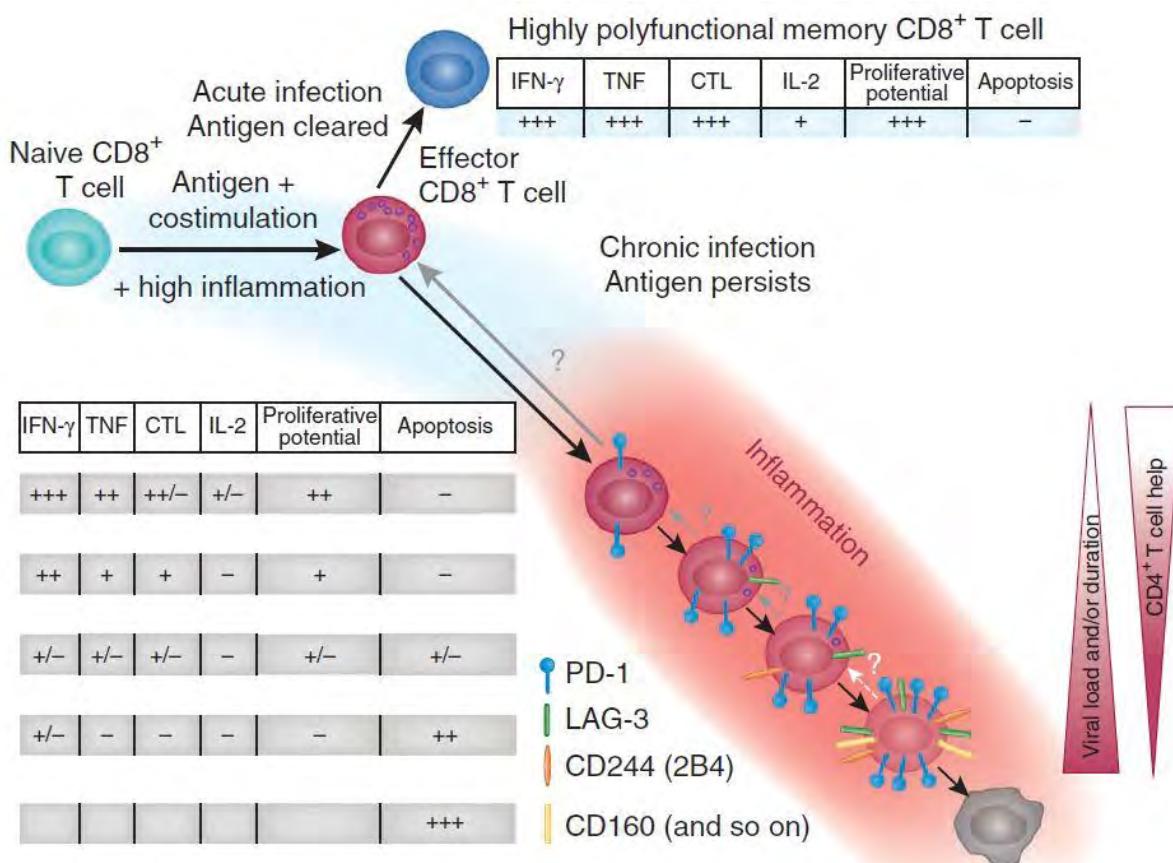


Figure 1 (Wherry et al, Nat. Immunol 2011) : Caractéristiques séquentielles de l'épuisement lymphocytaire des cellules T CD8+ lors d'une infection aigue résolutive (en haut) ou lors d'une infection chronique (en bas). Chaque propriété est présentée sur une échelle allant de « forte » (++) à « faible » (-). CTL indique le potentiel cytotoxique.

Altération de l'homéostasie lente et de la fonction mémoire. Une propriété fondamentale des cellules T mémoires est leur capacité à se maintenir indépendamment de l'antigène, via les cytokines IL-7 et IL-15, dans un état quiescent [43], [44]. Après la résolution d'une infection aigue, les *T mem* augmentent l'expression des récepteurs IL-7Ra et IL-2/15Rb pour acquérir un état d'homéostasie lente indispensable à leur fonction de « mémoire » [9]. Dans le modèle murin d'infection chronique à LCMV, les T CD8 spécifiques ne développent pas cette capacité. Les CD8 épuisés expriment alors plus faiblement le CD122, composant du récepteur de l'IL-2 et l'IL-15, et ont une réponse diminuée à l'IL-7 et l'IL-15, particulièrement à un stade d'épuisement avancé [45]–[47]. Les *T ex* perdent ainsi leur capacité de prolifération [48], [49].

Expression de récepteurs inhibiteurs (IRs) de surface. Les IRs permettent d'atténuer l'activation des cellules T et de limiter la réaction immunitaire après la résolution d'une infection aigue [50]. Les IRs ont un rôle clé dans plusieurs aspects de l'immunité adaptative, notamment dans la tolérance du soi et la prévention de l'auto-immunité [51]. Même si les *T eff* fonctionnels peuvent transitoirement exprimer des IRs pendant leur activation, l'expression prolongée ou augmentée de multiples IRs est une caractéristique fondamentale de l'épuisement CD8 et CD4, à la fois dans les modèles animaux et chez l'humain [52].

L'axe de PD-1 et son ligand PD-L1 semble être une voie régulatrice majeure de l'épuisement. Lors d'une infection aigue, PD-1 est exprimé transitoirement pendant l'activation des cellules T sur les *T eff* fonctionnels. En situation d'infection chronique ou de cancer, l'expression de PD-1 est maintenue à des niveaux élevés sur les cellules épuisées [6], [14], [53]. De plus, le blocage de PD-1 dans l'infection chronique à LCMV « revigore » la réponse CD8 virus spécifique, entraînant une charge virale moindre [54]. L'épuisement T apparaît ainsi comme un processus actif sous le contrôle des IRs. Ces observations sont répétées dans l'infection au VIH [14], [55]. Néanmoins, des cellules épuisées peuvent également se former en l'absence d'expression de PD-1 [56]. Ainsi, les résultats d'Odorizzi et al suggèrent que PD-1 préviendrait l'excès de stimulation et de prolifération des *T ex*, et ralentirait leur différenciation terminale.

Le récepteur TIGIT régule négativement la fonction des cellules T et prévient ainsi la stimulation des cellules T [57], [58]. L'interaction TIGIT-CD155 induit la production d'IL-10 et réduit la production d'IL-12 par les cellules dendritiques, promouvant ainsi le développement des *T ex* [59]. Expérimentalement, le blocage de TIGIT est synergique avec celui de PD-1 et permet un meilleur contrôle des infections chronique et des tumeurs dans les modèles murins.

D'après une étude récente [60], le marqueur TIGIT est associé à l'expression de PD-1 et Tim-3, et les lymphocytes CD8 des ganglions métastatiques exprimant TIGIT sont associés à une moindre production d'IL2, de TNF- α et à une moindre cytotoxicité chez la souris. Ces observations ont été répétées chez des patients atteints de mélanome [61].

Le marqueur 2B4 (CD244) a été initialement identifié comme un marqueur d'activation dans les cellules natural killers (NK). Membre de la famille des molécules de signalisation lymphocytaire (SLAM), il est impliqué dans la régulation de la co-stimulation, de la production de cytokine et de la cytotoxicité des T CD8+ [62]–[64]. Son expression est particulièrement importante sur les lymphocytes CD8+ différenciés de type effecteur mémoire [4], [65]. Malgré l'identification d'un unique ligand (CD48), le rôle de 2B4 est incertain et débattu. Il est décrit soit comme co-stimulateur [66], [67] soit comme co-inhibiteur [68], [69] de la différenciation et de la fonction des lymphocytes T dans les situations d'infection chronique ou de tumeurs.

Dans une étude s'appuyant sur le modèle murin d'infection chronique à LCMV, le marqueur 2B4 est sur-exprimé par les cellules CD8 spécifiques du virus [52]. Les auteurs observent également une augmentation de la co-expression de 2B4 avec PD-1 et LAG3, et enfin une augmentation de la cytotoxicité *in vitro* après le blocage de CD48.

Chez l'homme, dans une étude récente [70], un modèle clonal de lymphocytes T CD8+ VIH-spécifiques est utilisé pour étudier les fonctions de 2B4. Le blocage de 2B4 induit alors une diminution de l'activité cytolytique des *T eff* CD8+ et une diminution modeste des gènes promouvant les fonctions effectrices. Ces résultats sont en faveur d'un effet global co-stimulateur, contribuant à l'induction optimale des fonctions effectrices CD8+.

Enfin, l'équipe de Pombo et al [71] s'est intéressée au marqueur 2B4 chez les patients dits « *HIV elite controllers* », ayant une charge virale spontanément négative en dehors de tout traitement antiviral. Les patients séropositifs « *chronic progressors* » exprimaient plus fortement le cluster CD8+2B4+ et le cluster CD8+2B4+PD1+, par rapport aux patients « *elite controllers* ». Ces dernières observations témoignent d'un rôle possible de 2B4 dans une forme de dysfonction lymphocytaire favorisant l'infection par le VIH.

Le récepteur CD57. Les phénotypes associés à une réplication sénescente des CD8 sont mal définis mais sont généralement associés à un défaut d'expression de CD28 ou à un excès d'expression de CD57 [72]–[74]. Le marqueur CD57 est ainsi utilisé pour identifier des cellules T avec une faible capacité de prolifération qui semblent être sénescantes ou en phase de différenciation terminale. Ces cellules sont fréquemment observées chez les individus en situation d'activation immunitaire chronique [75], [76] et chez les individus âgés [77], [78].

Parmi les autres IRs remarquables, on cite LAG-3 qui régule négativement la progression du cycle cellulaire [79]. Il est fortement exprimé par les *T ex* dans les infections chroniques, et dans de nombreux cancers. On cite enfin TIM-3 qui est un IR avec une structure extra-cellulaire complexe, possédant probablement une activité régulatrice positive ou négative variable selon le contexte [80]. L'expression de TIM-3 est fortement augmentée sur les *T ex* et correspond aux sous-populations les plus avancées dans les stades d'épuisement observés dans le modèle de LCMV, de VHC et de VIH [81].

Altération du programme métabolique. Le profil transcriptionnel des *T ex* révèle des changements majeurs des gènes impliqués dans le métabolisme, notamment le cycle de l'acide citrique et de l'oxydation des acides gras, suggérant qu'une dérégulation métabolique accompagne le processus d'épuisement lymphocytaire [6]. Les *T ex* ont peu de réserve métabolique et n'acquièrent pas le mode de d'épargne métabolique des *T mem* [82]. Le métabolisme cellulaire représente potentiellement un aspect crucial des thérapeutiques visant à inhiber l'épuisement lymphocytaire.

Modifications du transcriptome et de l'environnement épigénétique. Les avancées récentes en génétique ont permis de définir un profil transcriptionnel et un *paysage épigénétique* des cellules T épuisées distinct des *T eff* et des *T mem* [6], [10], [83]. Les changements incluent des altérations importantes dans les gènes codants pour les IRs, les facteurs de transcriptions, et pour les gènes contrôlant la signalisation des TCR, des cytokines et de la costimulation. Le profil transcriptionnel des *T ex* est également différent des cellules T anergiques, malgré des similitudes [84]. Une des découvertes majeures est la réutilisation fréquente par les *T ex* des facteurs de transcription utilisés par les *T eff* et les *T mem*, dans des circuits transcriptionnels différents [10].

Enfin, plusieurs facteurs de transcription ont été impliqués dans l'épuisement CD8, notamment Blimp-1, Batf, T-bet, Eomes et NFAT [38], [49], [85].

Réversibilité. Il est incertain si l'épuisement est un phénomène réversible. En 2006, l'équipe de Barber et al a démontré que le blocage des interactions PD-1/ PD-L1 *in vivo* entraîne une amélioration de la fonction et de la prolifération lymphocytaire, en parallèle d'un meilleur contrôle de l'infection chronique à LCMV [54]. Les résultats du modèle LCMV ont rapidement été étendus au VIH, VHC, VHB et à d'autres infections chroniques virales [14], [17], [86]. Ces travaux apportent la preuve que les *T ex*, en tant que population, ne sont pas définitivement engagés dans la voie de la dysfonction.

Ces résultats sont nuancés par d'autres observations suggérant un caractère partiellement irréversible des mécanismes conduisant à l'épuisement. Il semble que *la sévérité de l'épuisement* permette de distinguer plusieurs sous-groupes de *T ex* CD8+ qui sont associés à des potentiels différents en termes de récupération de fonctionnalité après le blocage de PD-1 [9], [48]. En effet, les *T ex* ayant une expression *intermédiaire* de PD-1 peuvent être revigorés par blocage de l'axe PD-1, tandis que ceux ayant une expression *forte* de PD-1 ne répondent pas à cette stratégie.

Une autre étude [87] démontre que le caractère irréversible de l'épuisement dépend de la durée d'infection. Ainsi, après 30 jours d'infection chronique, les *T ex* murins transférés à des souris saines perdent leur capacité d'homéostasie, de prolifération et de survie, contrairement aux *T ex* transférés au 8^e jour de l'infection qui conservent une plasticité. Ces observations amènent également le concept de dépendance des *T ex* à un antigène, déjà évoqué auparavant [46], [88].

II/ Particularités de l'épuisement CD4

L'épuisement a été plus largement décrit pour les LT CD8, cependant des travaux montrent que ce phénomène peut également se produire dans les populations CD4 [89], B [90] NK [91].

Rationnel. Tandis que les CD4 jouent un rôle central dans les infections chroniques et le cancer, l'effet des infections chroniques sur leur fonction et leur différenciation est moins bien connu que dans les CD8. Une réponse T CD4 robuste et fonctionnelle est une caractéristique indispensable d'une immunité antivirale efficace et pourrait prévenir l'épuisement CD8 en situation d'infection chronique. Par exemple, la déplétion CD4 dans le modèle LCMV conduit à une virémie incontrôlable et prolongée [92]. Un autre exemple important est l'infection VIH, dans laquelle la progression au stade SIDA est temporellement associée (et définie) par la perte des CD4. Dans l'infection au VHC, le caractère chronique est accompagné par une réponse CD4 faible ou absente [93]. Néanmoins, dans les infections au LCMV et VHC, de grandes quantités d'anticorps virus-spécifiques sont produites, montrant que par certains aspects, la fonction de support des CD4 aux lymphocytes B reste intacte [94].

Les similitudes du programme d'épuisement CD4 et CD8 sont mal définies. Il apparaît que les CD4 pourraient développer des dysfonctions, tout en conservant ou en acquérant d'autres propriétés dans les infections chroniques.

Particularités phénotypiques. L'équipe de Crawford et al [89] a réalisé une analyse de la signature cytokinique, des IRs et du transcriptome global des LT CD4 dans un modèle de

LCMV. Elle a identifié une signature d'épuisement commune aux CD4 et CD8 virus-spécifiques, ainsi que des spécificités propres au compartiment CD4. En situation d'infection chronique à LCMV, cette étude démontrait une augmentation de l'expression de CTLA4, CD200 et BTLA dans les CD4 par rapport aux CD8. De manière plus significative, le marqueur PD-1 était plus exprimé dans les CD4 par rapport aux CD8, et cet effet perdurait au moins 50 jours. En revanche, l'expression de 2B4 était diminuée.

Particularités fonctionnelles. Tandis que la production par les CD4 d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-2 diminue au cours d'une infection chronique, suggérant des processus similaires au compartiment CD8 [37], les autres fonctions telles que la production d'IL-10 et d'IL-21 sont augmentées [95]–[97]. Par ailleurs, Plusieurs facteurs de transcription comme Eomes, blimp-1 et Helios sont associés aux T CD4 épuisés (CD4 ex). L'expression de TFs pourrait participer à la définition de l'identité cellulaire [89].

Par ailleurs, les CD4 ex présentent une hétérogénéité supérieure aux CD8 ex. Au moins deux populations de CD4 ex virus-spécifique ont été identifiées selon le profil cytokinique : les CD4 ex « monofonctionnels » producteurs d'IFN- γ et les CD4 ex « bi fonctionnel » producteurs d'IFN- γ et de TNF- α [89]. La population « bi-fonctionnelle » avait une expression augmentée de Blimp-1.

Enfin, le caractère progressif de la dysfonction des CD4 est moins clair que dans le compartiment CD8. Il semble que la dysfonction soit plus précoce et plus soutenue dans le compartiment CD4 [95].

III/ Applications cliniques

La dysfonction lymphocytaire et en particulier l'épuisement lymphocytaire ont été décrits initialement dans les infections chroniques mais sont aujourd'hui des phénomènes suscitant un fort intérêt scientifique dans plusieurs autres domaines.

L'épuisement en cancérologie a été largement décrit dans le cancer [20], [21]. En effet, les LT CD8 tumeur-spécifiques développent des signes d'épuisement et de dysfonction dans les modèles murins [5], [98], dans les cancers humains, notamment le mélanome [99]–[102] ou encore dans la leucémie myéloïde chronique [98].

Les lymphocytes T tumeur-spécifiques “épuisés” sont caractérisés par une forte expression d'IRs, par des fonctions effectrices diminuées et des points communs transcriptionnels [3], [83], [101]–[107]

Le mélanome a notamment été étudié par l'équipe de Baitsch et al [100], qui montre des différences significatives entre les LT circulants et les LT des ganglions métastatiques (TILN), qui présentent un véritable *profil d'épuisement*. Ces derniers faisaient preuve d'une production effondrée d'IFN- γ , d'une sur-expression de CTLA4, LAG3, et TIM3. Les lymphocytes circulants quant à eux exprimaient en excès PD-1 et TIM3.

L'épuisement dans les maladies dysimmunitaires est également un phénomène ayant fait l'objet de plusieurs publications dans la littérature [18], [51], [108], [109]. Ainsi, l'équipe de McKinney et al [19] a démontré que l'expression de marqueurs d'épuisement était associée à un pronostic défavorable dans la vascularite à ANCA, le lupus érythémateux disséminé, le

diabète de type 1 et la fibrose pulmonaire idiopathique. Les auteurs suggèrent qu'une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires permettrait d'améliorer la prise en charge de ces maladies inflammatoires et auto-immunes.

IV/ L'épuisement en transplantation

La dysfonction lymphocytaire en transplantation. En transplantation d'organe solide, le système immunitaire du receveur est exposé de manière prolongée à une forte charge antigénique, qui, de surplus, lui est présentée initialement dans un contexte d'inflammation importante. Il s'agit d'une situation qui reproduit les pathologies dans lesquelles l'épuisement du lymphocyte a été classiquement décrit [110], [111].

De plus, *malgré une compréhension incomplète de l'adaptation du receveur au greffon*, il semble que les capacités de réponses des cellules T donneur-spécifiques déclinent avec le temps. Ceci est illustré par la rareté des rejet T médiés après 10 ans de transplantation rénale [112] et par la possibilité de réduire l'immunosuppression chez les patients greffés de longue date, sans augmenter le risque de rejet [113].

Une autre étude [114] portant sur la transplantation d'organes solides murins apporte une preuve tangible de l'existence d'un épuisement cellulaire en transplantation. Après le transfert au receveur de cellules T spécifiques du donneur, dites cellules allo-réactives, ces dernières connaissent une phase initiale de prolifération rapide et importante, suivie d'un état hypo-réactivité et de déplétion, permettant l'acceptation du greffon hépatique. En contrepartie, les greffes de reins et de cœur se soldaient systématiquement par un rejet aigu avant le dixième jour. Ce travail suggère que la charge antigénique représentée par la volumineuse quantité de tissu de greffon hépatique, soit un déterminant du développement de la dysfonction lymphocytaire.

Un phénomène identique est décrit dans une étude [115] démontrant qu'une greffe murine simultanée de deux reins ou de deux coeurs résulte d'une diminution du risque de rejet à long terme comparativement à une greffe de cœur unique ou de rein unique, respectivement. Ce résultat suggère que la stimulation excessive et prolongée des cellules T favorise une hypo-réactivité donneur-spécifique et qu'elle promeut le succès de la transplantation.

Les caractéristiques de l'épuisement en transplantation ont d'abord été appréhendées comme un état hypo-réactivité spécifique vis-à-vis du donneur [116], [117]. Plusieurs études ont démontré que les voies inhibitrices, comme celles de CTLA-4, CD80, TIM-3 et PD1 qui sont régulées positivement dans les cellules T épuisées jouent aussi un rôle critique dans la tolérance du greffon [118]–[120].

Il existe des données suggérant que le signal CTLA-4 est requis pour la maintenance de la tolérance du greffon [121]. De manière similaire, le signal inhibiteur TIM-3 est requis pour la régulation de la réponse immune et son blocage conduit au rejet précoce dans un modèle murin de transplantation cardiaque, mais uniquement en présence de cellules CD4+ circulantes [122].

La voie de signalisation de PD-1, marqueur classique d'épuisement, a également été mise en évidence dans les mécanismes de tolérance du greffon [118]. Dans un modèle murin de

transplantation hépatique, le blocage de PD-L1 par anticorps monoclonal ou par KO du gène résultait d'un rejet suraigu conduisant au décès en 12 jours en moyenne [123].

L'étude de Sarraj et al [124] s'intéressait à un modèle murin de rejet cardiaque chronique. Dans cette étude, l'inhibition du recrutement de leucocytes médié la voie des selectines prévenait le rejet chronique et résultait d'une meilleure survie du greffon. La survie du greffon était alors associée à un profil d'épuisement des lymphocytes T circulants, avec notamment une diminution de la production de cytokine, une prolifération déficiente, une augmentation de l'expression des IRs tels que PD-1, Tim-3 et KLRG1.

Dans une étude clinique [125] évaluant le retrait du traitement immunosuppresseur chez des transplantés hépatiques atteints d'hépatite C, l'absence de rejet, était associée avec une augmentation des T CD8+ circulants virus-spécifique exprimant de multiples IRs. Dans ce même travail, l'expression de gènes immuno-régulateurs comme PD-1, PDL-1, IL-10, BATF, Fox-p3, étaient significativement plus élevée chez les receveurs "tolérants" que chez les patients en rejet. Cette observation suggère l'implication d'une réactivité croisée pour un antigène donné sur la même cellule dans le développement de l'épuisement.

L'équipe de Fribourg et al. [23] a publié en 2019 une analyse en cytométrie de masse sur 26 patients transplantés rénaux et a permis d'obtenir une description précise et séquentielle du phénotype lymphocytaire post-transplantation. Dans cette étude, les cellules CD4+ épuisées (*CD4+ T ex*) ou CD8+ épuisées (*CD8+ T ex*) étaient définies par l'expression d'au moins un récepteur inhibiteur parmi PD-1, TIGIT, 4-1BB, TIM3 et 2B4.

Cette étude rapportait une augmentation des CD4+ *T ex* au sixième mois post-greffe par rapport à une analyse pré-greffe. Cette augmentation est essentiellement médiée par le cluster CD4+PD1+TIGIT+TIM3-2B4-. Elle démontre également une augmentation des CD4+ *T ex* et des CD8+ *T ex* chez les patients ayant reçu une induction déplétante pour les lymphocytes T. De plus, le taux de CD4+ *T ex* était inversement corrélé à la production d'ATP, suggérant une altération du métabolisme cellulaire.

De surcroit, cette étude apportait des preuves convaincantes d'un lien entre les marqueurs d'épuisement et le pronostic rénal. Ainsi, le taux de *CD4+ T ex* et le taux de *CD8+ T ex*, toujours définis par l'expression d'au moins un IR, étaient inversement corrélés à la fibrose interstitielle du greffon évaluée par biopsie rénale systématique au sixième mois post-greffe. Il n'y avait cependant pas de corrélation significative avec la fonction rénale dans cette configuration.

Les analyses de toutes les combinaisons de marqueurs inhibiteurs, de marqueurs de senescence et de marqueurs d'anergie révèlent que les simples clusters CD4+PD1+CD57- et CD8+PD1+CD57- sont corrélés avec la fibrose interstitielle du greffon. Remarquablement, les CD4+ *T ex* et CD8+ *T ex*, ainsi définis par les clusters CD4+PD1+CD57- et CD8+PD1+CD57- étaient également associés à une diminution de production d'IL-2, d'IFN-γ et de TNF-α, au sixième mois post-greffe. Enfin, ces deux dernières sous-populations permettaient d'établir une corrélation positive entre *la variation du taux de cellules T épuisées à 6 mois et le débit de filtration glomérulaire*.

V/ Techniques d'analyse lymphocytaire

La cytométrie en flux

La cytométrie en flux est définie comme l'étude précise de particules isolées, de cellules ou de bactéries entraînées par un flux liquide ou gazeux à grande vitesse dans le faisceau d'un laser. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Il s'agit d'analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Cette technique est largement utilisée en immunologie moderne pour caractériser les lymphocytes circulants en routine et en recherche.

Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs aux propriétés optiques induites par fluorescence, elle-même obtenue par des marquages spécifiques de structures ou de molécules cellulaires. Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur par l'intermédiaire d'une composante informatique et optique.

Ce procédé d'analyse individuelle est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. Un programme informatique calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés sur une ou plusieurs populations et les représente éventuellement sous forme graphique.

Etudier la fonction lymphocytaire

Les cytokines sont produites transitoirement en réponse à un antigène. Elles agissent habituellement sur la même cellule (action autocrine) ou sur des cellules voisines (action paracrine). Ce sont des marqueurs essentiels des fonctions lymphocytaires.

L'observation et la mesure des cytokines *in vivo* est complexe, notamment à cause du caractère transitoire de leur expression. Les techniques habituelles de mesure sont réalisées *ex vivo*, après stimulation des lymphocytes, puis perméabilisation, et enfin immuno-marquage par des anticorps fluorescents dirigés contre les cytokines intra-cellulaires.

Il existe différentes techniques de stimulation lymphocytaire préalable. Il est possible d'effectuer une stimulation spécifique par un peptide immunogène [126], [127] reproduisant la stimulation d'un virus ou d'un agent infectieux. La stimulation lymphocytaire non spécifique est réalisée quant à elle par l'incubation de sang avec un agent chimique tel que le PMA (Phorbol-12 myristate 13 acetate) et un ionophore calcique, la ionomycine.

Les tétramères de molécules CMH-peptides (complexe majeur d'histocompatibilité) et les TCR (T cell receptor) transgéniques permettent de quantifier les lymphocytes T spécifiques d'un antigène [128]. Ces techniques ont permis des avancées majeures dans la compréhension de la dysfonction lymphocytaire en situation d'exposition prolongée à un antigène [37]. Cependant, l'étude précise de l'allo-réactivité en transplantation est plus complexe et fait appel notamment aux techniques de réaction lymphocytaire mixte (MLR). Ces dernières consistent à mettre en culture pendant plusieurs jours les lymphocytes activés du receveur avec les lymphocytes inactivés du donneur.

L'objectif de notre travail était donc de préciser la valeur pronostique des marqueurs inhibiteurs associés à l'épuisement lymphocytaire dans une cohorte de patients transplantés rénaux. Le rapport de ce travail est présenté sous la forme d'un manuscrit en anglais.

Références

- [1] J. Sterzl and A. M. Silverstein, "Developmental aspects of immunity," *Adv. Immunol.*, vol. 6, pp. 337–459, 1967.
- [2] V. S. Byers and E. E. Sercarz, "The X-Y-Z scheme of immunocyte maturation. IV. The exhaustion of memory cells," *J. Exp. Med.*, vol. 127, no. 2, pp. 307–325, Feb. 1968.
- [3] P. S. Kim and R. Ahmed, "Features of responding T cells in cancer and chronic infection," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 22, no. 2, pp. 223–230, Apr. 2010.
- [4] L. Baitsch *et al.*, "Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 2, p. e30852, 2012.
- [5] A. Schietinger and P. D. Greenberg, "Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction," *Trends in Immunology*, vol. 35, no. 2, pp. 51–60, Feb. 2014.
- [6] E. J. Wherry *et al.*, "Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection," *Immunity*, vol. 27, no. 4, pp. 670–684, Oct. 2007.
- [7] A. N. Akbar and S. M. Henson, "Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity?," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 4, pp. 289–295, 2011.
- [8] J. Crespo, H. Sun, T. H. Welling, Z. Tian, and W. Zou, "T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 25, no. 2, pp. 214–221, Apr. 2013.
- [9] E. J. Wherry, "T cell exhaustion," *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 6, pp. 492–499, Jun. 2011.
- [10] T. A. Doering, A. Crawford, J. M. Angelosanto, M. A. Paley, C. G. Ziegler, and E. J. Wherry, "Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory," *Immunity*, vol. 37, no. 6, pp. 1130–1144, Dec. 2012.
- [11] P. A. Goepfert *et al.*, "A significant number of human immunodeficiency virus epitope-specific cytotoxic T lymphocytes detected by tetramer binding do not produce gamma interferon," *J. Virol.*, vol. 74, no. 21, pp. 10249–10255, Nov. 2000.
- [12] P. Shankar, M. Russo, B. Harnisch, M. Patterson, P. Skolnik, and J. Lieberman, "Impaired function of circulating HIV-specific CD8(+) T cells in chronic human immunodeficiency virus infection," *Blood*, vol. 96, no. 9, pp. 3094–3101, Nov. 2000.
- [13] S. Kostense *et al.*, "High viral burden in the presence of major HIV-specific CD8(+) T cell expansions: evidence for impaired CTL effector function," *Eur. J. Immunol.*, vol. 31, no. 3, pp. 677–686, Mar. 2001.
- [14] C. L. Day *et al.*, "PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression," *Nature*, vol. 443, no. 7109, pp. 350–354, Sep. 2006.
- [15] F. Lechner *et al.*, "Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus," *J. Exp. Med.*, vol. 191, no. 9, pp. 1499–1512, May 2000.
- [16] N. H. Gruener *et al.*, "Sustained Dysfunction of Antiviral CD8+ T Lymphocytes after Infection with Hepatitis C Virus," *J Virol*, vol. 75, no. 12, pp. 5550–5558, Jun. 2001.

- [17] B. Ye, X. Liu, X. Li, H. Kong, L. Tian, and Y. Chen, “T-cell exhaustion in chronic hepatitis B infection: current knowledge and clinical significance,” *Cell Death Dis*, vol. 6, p. e1694, Mar. 2015.
- [18] A. H. Sharpe, E. J. Wherry, R. Ahmed, and G. J. Freeman, “The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection,” *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 3, pp. 239–245, Mar. 2007.
- [19] E. F. McKinney, J. C. Lee, D. R. W. Jayne, P. A. Lyons, and K. G. C. Smith, “T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection,” *Nature*, vol. 523, no. 7562, pp. 612–616, Jul. 2015.
- [20] K. E. Pauken and E. J. Wherry, “Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer,” *Trends Immunol.*, vol. 36, no. 4, pp. 265–276, Apr. 2015.
- [21] H. M. Zarour, “Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, no. 8, pp. 1856–1864, Apr. 2016.
- [22] T. E. Starzl and R. M. Zinkernagel, “Antigen localization and migration in immunity and tolerance,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 339, no. 26, pp. 1905–1913, Dec. 1998.
- [23] M. Fribourg *et al.*, “T-cell exhaustion correlates with improved outcomes in kidney transplant recipients,” *Kidney Int.*, Feb. 2019.
- [24] R. W. Dutton, L. M. Bradley, and S. L. Swain, “T cell memory,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 16, pp. 201–223, 1998.
- [25] S. M. Kaech, S. Hemby, E. Kersh, and R. Ahmed, “Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation,” *Cell*, vol. 111, no. 6, pp. 837–851, Dec. 2002.
- [26] K. Murali-Krishna *et al.*, “Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection,” *Immunity*, vol. 8, no. 2, pp. 177–187, Feb. 1998.
- [27] W. Cui and S. M. Kaech, “Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells: Effector and memory T-cell differentiation,” *Immunological Reviews*, vol. 236, no. 1, pp. 151–166, Jun. 2010.
- [28] A. J. Zajac *et al.*, “Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function,” *J Exp Med*, vol. 188, no. 12, pp. 2205–2213, Dec. 1998.
- [29] A. Gallimore *et al.*, “Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes,” *J. Exp. Med.*, vol. 187, no. 9, pp. 1383–1393, May 1998.
- [30] E. J. Wherry and M. Kurachi, “Molecular and cellular insights into T cell exhaustion,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 15, no. 8, pp. 486–499, Aug. 2015.
- [31] D. van Baarle, A. Tsegaye, F. Miedema, and A. Akbar, “Significance of senescence for virus-specific memory T cell responses: rapid ageing during chronic stimulation of the immune system,” *Immunol. Lett.*, vol. 97, no. 1, pp. 19–29, Feb. 2005.
- [32] M. J. Fuller and A. J. Zajac, “Ablation of CD8 and CD4 T cell responses by high viral loads,” *J. Immunol.*, vol. 170, no. 1, pp. 477–486, Jan. 2003.
- [33] G. Zeng, Y. Huang, Y. Huang, Z. Lyu, D. Lesniak, and P. Randhawa, “Antigen-Specificity of T Cell Infiltrates in Biopsies With T Cell-Mediated Rejection and BK Polyomavirus Viremia: Analysis by Next Generation Sequencing,” *Am. J. Transplant.*, vol. 16, no. 11, pp. 3131–3138, 2016.
- [34] L. M. McLane, M. S. Abdel-Hakeem, and E. J. Wherry, “CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 37, pp. 457–495, Apr. 2019.
- [35] B. Bengsch, T. Ohtani, R. S. Herati, N. Bovenschen, K.-M. Chang, and E. J. Wherry, “Deep immune profiling by mass cytometry links human T and NK cell differentiation

- and cytotoxic molecule expression patterns,” *J. Immunol. Methods*, vol. 453, pp. 3–10, 2018.
- [36] J. M. Curtsinger and M. F. Mescher, “Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 22, no. 3, pp. 333–340, Jun. 2010.
- [37] E. J. Wherry, J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, R. van der Most, and R. Ahmed, “Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment,” *J. Virol.*, vol. 77, no. 8, pp. 4911–4927, Apr. 2003.
- [38] P. Agnellini, P. Wolint, M. Rehr, J. Cahenzli, U. Karrer, and A. Oxenius, “Impaired NFAT nuclear translocation results in split exhaustion of virus-specific CD8+ T cell functions during chronic viral infection,” *PNAS*, vol. 104, no. 11, pp. 4565–4570, Mar. 2007.
- [39] K. J. Mackerness, M. A. Cox, L. M. Lilly, C. T. Weaver, L. E. Harrington, and A. J. Zajac, “Pronounced virus-dependent activation drives exhaustion but sustains IFN- γ transcript levels,” *J. Immunol.*, vol. 185, no. 6, pp. 3643–3651, Sep. 2010.
- [40] W. Jin and C. Dong, “IL-17 cytokines in immunity and inflammation,” *Emerg Microbes Infect*, vol. 2, no. 9, p. e60, Sep. 2013.
- [41] S. Cypowij, C. Picard, L. Maródi, J.-L. Casanova, and A. Puel, “Immunity to infection in IL-17-deficient mice and humans,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 42, no. 9, pp. 2246–2254, Sep. 2012.
- [42] J. Tosello Boari *et al.*, “IL-17RA-Signaling Modulates CD8+ T Cell Survival and Exhaustion During Trypanosoma cruzi Infection,” *Front Immunol*, vol. 9, Oct. 2018.
- [43] S. G. Nanjappa, E. H. Kim, and M. Suresh, “Immunotherapeutic effects of IL-7 during a chronic viral infection in mice,” *Blood*, vol. 117, no. 19, pp. 5123–5132, May 2011.
- [44] F. Y. Yue *et al.*, “HIV-Specific IL-21 Producing CD4+ T Cells Are Induced in Acute and Chronic Progressive HIV Infection and Are Associated with Relative Viral Control,” *The Journal of Immunology*, vol. 185, no. 1, pp. 498–506, Jul. 2010.
- [45] E. J. Wherry, D. L. Barber, S. M. Kaech, J. N. Blattman, and R. Ahmed, “Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 101, no. 45, pp. 16004–16009, Nov. 2004.
- [46] H. Shin, S. D. Blackburn, J. N. Blattman, and E. J. Wherry, “Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection,” *J. Exp. Med.*, vol. 204, no. 4, pp. 941–949, Apr. 2007.
- [47] E. J. Wherry and R. Ahmed, “Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection,” *J. Virol.*, vol. 78, no. 11, pp. 5535–5545, Jun. 2004.
- [48] S. D. Blackburn, H. Shin, G. J. Freeman, and E. J. Wherry, “Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 105, no. 39, pp. 15016–15021, Sep. 2008.
- [49] M. A. Paley *et al.*, “Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection,” *Science*, vol. 338, no. 6111, pp. 1220–1225, Nov. 2012.
- [50] P. M. Odorizzi and E. J. Wherry, “Inhibitory receptors on lymphocytes: insights from infections,” *J. Immunol.*, vol. 188, no. 7, pp. 2957–2965, Apr. 2012.
- [51] L. M. Francisco, P. T. Sage, and A. H. Sharpe, “The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity,” *Immunol. Rev.*, vol. 236, pp. 219–242, Jul. 2010.
- [52] S. D. Blackburn *et al.*, “Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection,” *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 1, pp. 29–37, Jan. 2009.

- [53] S. Urbani *et al.*, “PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion,” *J. Virol.*, vol. 80, no. 22, pp. 11398–11403, Nov. 2006.
- [54] D. L. Barber *et al.*, “Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection,” *Nature*, vol. 439, no. 7077, pp. 682–687, Feb. 2006.
- [55] C. Petrovas *et al.*, “PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection,” *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 10, pp. 2281–2292, Oct. 2006.
- [56] P. M. Odorizzi, K. E. Pauken, M. A. Paley, A. Sharpe, and E. J. Wherry, “Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8+ T cells,” *J. Exp. Med.*, vol. 212, no. 7, pp. 1125–1137, Jun. 2015.
- [57] R. J. Johnston *et al.*, “The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function,” *Cancer Cell*, vol. 26, no. 6, pp. 923–937, Dec. 2014.
- [58] J. Attanasio and E. J. Wherry, “Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease,” *Immunity*, vol. 44, no. 5, pp. 1052–1068, 17 2016.
- [59] X. Yu *et al.*, “The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells,” *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 1, pp. 48–57, Jan. 2009.
- [60] S. Kurtulus *et al.*, “TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells,” *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. 11, pp. 4053–4062, Nov. 2015.
- [61] J.-M. Chauvin *et al.*, “TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in melanoma patients,” *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. 5, pp. 2046–2058, May 2015.
- [62] J. L. Cannons, S. G. Tangye, and P. L. Schwartzberg, “SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, pp. 665–705, 2011.
- [63] A. Veillette, “Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, no. 1, pp. 56–66, Jan. 2006.
- [64] E. Assarsson, T. Kambayashi, C. M. Persson, B. J. Chambers, and H.-G. Ljunggren, “2B4/CD48-mediated regulation of lymphocyte activation and function,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 4, pp. 2045–2049, Aug. 2005.
- [65] A. Legat, D. E. Speiser, H. Pircher, D. Zehn, and S. A. Fuertes Marraco, “Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than ‘Exhaustion’ of Human CD8 T Cells,” *Front Immunol*, vol. 4, p. 455, 2013.
- [66] K.-M. Lee *et al.*, “Cutting edge: the NK cell receptor 2B4 augments antigen-specific T cell cytotoxicity through CD48 ligation on neighboring T cells,” *J. Immunol.*, vol. 170, no. 10, pp. 4881–4885, May 2003.
- [67] T. Kambayashi, E. Assarsson, B. J. Chambers, and H. G. Ljunggren, “Cutting edge: Regulation of CD8(+) T cell proliferation by 2B4/CD48 interactions,” *J. Immunol.*, vol. 167, no. 12, pp. 6706–6710, Dec. 2001.
- [68] C. C. Ezinne, M. Yoshimitsu, Y. White, and N. Arima, “HTLV-1 Specific CD8+ T Cell Function Augmented by Blockade of 2B4/CD48 Interaction in HTLV-1 Infection,” *PLOS ONE*, vol. 9, no. 2, p. e87631, Feb. 2014.
- [69] S. V. Vaidya *et al.*, “Targeted disruption of the 2B4 gene in mice reveals an in vivo role of 2B4 (CD244) in the rejection of B16 melanoma cells,” *J. Immunol.*, vol. 174, no. 2, pp. 800–807, Jan. 2005.
- [70] A. Lissina *et al.*, “Fine-tuning of CD8(+) T-cell effector functions by targeting the 2B4-CD48 interaction,” *Immunol. Cell Biol.*, vol. 94, no. 6, pp. 583–592, 2016.
- [71] C. Pombo, E. J. Wherry, E. Gostick, D. A. Price, and M. R. Betts, “Elevated Expression of CD160 and 2B4 Defines a Cytolytic HIV-Specific CD8+ T-Cell Population in Elite Controllers,” *J. Infect. Dis.*, vol. 212, no. 9, pp. 1376–1386, Nov. 2015.

- [72] J. M. Brenchley *et al.*, “Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells,” *Blood*, vol. 101, no. 7, pp. 2711–2720, Apr. 2003.
- [73] T. E. Lloyd, L. Yang, D. N. Tang, T. Bennett, W. Schober, and D. E. Lewis, “Regulation of CD28 costimulation in human CD8+ T cells.,” *The Journal of Immunology*, vol. 158, no. 4, pp. 1551–1558, Feb. 1997.
- [74] D. E. Lewis, D. S. Tang, A. Adu-Oppong, W. Schober, and J. R. Rodgers, “Anergy and apoptosis in CD8+ T cells from HIV-infected persons.,” *The Journal of Immunology*, vol. 153, no. 1, pp. 412–420, Jul. 1994.
- [75] E. C. Wang, T. M. Lawson, K. Vedhara, P. A. Moss, P. J. Lehner, and L. K. Borysiewicz, “CD8high+ (CD57+) T cells in patients with rheumatoid arthritis,” *Arthritis Rheum.*, vol. 40, no. 2, pp. 237–248, Feb. 1997.
- [76] M. P. Weekes, M. R. Wills, K. Mynard, R. Hicks, J. G. P. Sissons, and A. J. Carmichael, “Large clonal expansions of human virus-specific memory cytotoxic T lymphocytes within the CD57+ CD28– CD8+ T-cell population,” *Immunology*, vol. 98, no. 3, pp. 443–449, Nov. 1999.
- [77] D. V. Dolfi *et al.*, “Increased T-bet is associated with senescence of influenza virus-specific CD8 T cells in aged humans,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 93, no. 6, pp. 825–836, Jun. 2013.
- [78] C. M. Weyand, J. C. Brandes, D. Schmidt, J. W. Fulbright, and J. J. Goronzy, “Functional properties of CD4+ CD28- T cells in the aging immune system,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. 102, no. 2–3, pp. 131–147, May 1998.
- [79] C. J. Workman, K. J. Dugger, and D. A. A. Vignali, “Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3,” *J. Immunol.*, vol. 169, no. 10, pp. 5392–5395, Nov. 2002.
- [80] V. K. Kuchroo, V. Dardalhon, S. Xiao, and A. C. Anderson, “New roles for TIM family members in immune regulation,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 8, pp. 577–580, 2008.
- [81] H.-T. Jin *et al.*, “Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 107, no. 33, pp. 14733–14738, Aug. 2010.
- [82] B. Bengsch *et al.*, “Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion,” *Immunity*, vol. 45, no. 2, pp. 358–373, 16 2016.
- [83] D. R. Sen *et al.*, “The epigenetic landscape of T cell exhaustion,” *Science*, vol. 354, no. 6316, pp. 1165–1169, 02 2016.
- [84] G. J. Martinez *et al.*, “The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8⁺ T cells,” *Immunity*, vol. 42, no. 2, pp. 265–278, Feb. 2015.
- [85] H. Shin *et al.*, “A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection,” *Immunity*, vol. 31, no. 2, pp. 309–320, Aug. 2009.
- [86] N. Nakamoto *et al.*, “Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade,” *PLoS Pathog.*, vol. 5, no. 2, p. e1000313, Feb. 2009.
- [87] J. M. Angelosanto, S. D. Blackburn, A. Crawford, and E. J. Wherry, “Progressive loss of memory T cell potential and commitment to exhaustion during chronic viral infection,” *J. Virol.*, vol. 86, no. 15, pp. 8161–8170, Aug. 2012.
- [88] B. D. Jamieson *et al.*, “Epitope escape mutation and decay of human immunodeficiency virus type 1-specific CTL responses,” *J. Immunol.*, vol. 171, no. 10, pp. 5372–5379, Nov. 2003.

- [89] A. Crawford *et al.*, “Molecular and transcriptional basis of CD4⁺ T cell dysfunction during chronic infection,” *Immunity*, vol. 40, no. 2, pp. 289–302, Feb. 2014.
- [90] S. Moir and A. S. Fauci, “B-cell exhaustion in HIV infection: the role of immune activation,” *Curr Opin HIV AIDS*, vol. 9, no. 5, pp. 472–477, Sep. 2014.
- [91] J. Bi and Z. Tian, “NK Cell Exhaustion,” *Front Immunol*, vol. 8, p. 760, 2017.
- [92] M. Matloubian, R. J. Concepcion, and R. Ahmed, “CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection,” *J. Virol.*, vol. 68, no. 12, pp. 8056–8063, Dec. 1994.
- [93] J. Schulze Zur Wiesch *et al.*, “Broadly directed virus-specific CD4+ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence,” *J. Exp. Med.*, vol. 209, no. 1, pp. 61–75, Jan. 2012.
- [94] B. Bartosch *et al.*, “In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 100, no. 24, pp. 14199–14204, Nov. 2003.
- [95] D. G. Brooks, L. Teyton, M. B. A. Oldstone, and D. B. McGavern, “Intrinsic functional dysregulation of CD4 T cells occurs rapidly following persistent viral infection,” *J. Virol.*, vol. 79, no. 16, pp. 10514–10527, Aug. 2005.
- [96] H. Elsaesser, K. Sauer, and D. G. Brooks, “IL-21 is required to control chronic viral infection,” *Science*, vol. 324, no. 5934, pp. 1569–1572, Jun. 2009.
- [97] A. Fröhlich *et al.*, “IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection,” *Science*, vol. 324, no. 5934, pp. 1576–1580, Jun. 2009.
- [98] S. Mumprecht, C. Schürch, J. Schwaller, M. Solenthaler, and A. F. Ochsenbein, “Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression,” *Blood*, vol. 114, no. 8, pp. 1528–1536, Aug. 2009.
- [99] A. C. Huang *et al.*, “T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response,” *Nature*, vol. 545, no. 7652, pp. 60–65, 04 2017.
- [100] L. Baitsch *et al.*, “Exhaustion of tumor-specific CD8⁺ T cells in metastases from melanoma patients,” *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 6, pp. 2350–2360, Jun. 2011.
- [101] P. P. Lee *et al.*, “Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients,” *Nat. Med.*, vol. 5, no. 6, pp. 677–685, Jun. 1999.
- [102] M. Ahmadzadeh *et al.*, “Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired,” *Blood*, vol. 114, no. 8, pp. 1537–1544, Aug. 2009.
- [103] J. Fourcade *et al.*, “Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8⁺ T cell dysfunction in melanoma patients,” *J Exp Med*, vol. 207, no. 10, pp. 2175–2186, Sep. 2010.
- [104] J. Matsuzaki *et al.*, “Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8⁺ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 107, no. 17, pp. 7875–7880, Apr. 2010.
- [105] Y. Zhang, S. Huang, D. Gong, Y. Qin, and Q. Shen, “Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 7, no. 5, pp. 389–395, Sep. 2010.
- [106] T. Zenz, “Exhausting T cells in CLL,” *Blood*, vol. 121, no. 9, pp. 1485–1486, Feb. 2013.
- [107] K. E. Pauken *et al.*, “Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade,” *Science*, vol. 354, no. 6316, pp. 1160–1165, 02 2016.

- [108] M. Rangachari *et al.*, “Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion,” *Nat. Med.*, vol. 18, no. 9, pp. 1394–1400, Sep. 2012.
- [109] J. C. Lee *et al.*, “Gene expression profiling of CD8+ T cells predicts prognosis in patients with Crohn disease and ulcerative colitis,” *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 10, pp. 4170–4179, Oct. 2011.
- [110] E. B. Thorp, C. Stehlik, and M. J. Ansari, “T-cell exhaustion in allograft rejection and tolerance,” *Curr Opin Organ Transplant*, vol. 20, no. 1, pp. 37–42, Feb. 2015.
- [111] A. Sanchez-Fueyo and J. F. Markmann, “Immune Exhaustion and Transplantation,” *Am. J. Transplant.*, vol. 16, no. 7, pp. 1953–1957, 2016.
- [112] P. F. Halloran *et al.*, “Disappearance of T Cell-Mediated Rejection Despite Continued Antibody-Mediated Rejection in Late Kidney Transplant Recipients,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 26, no. 7, pp. 1711–1720, Jul. 2015.
- [113] C. Benítez *et al.*, “Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients,” *Hepatology*, vol. 58, no. 5, pp. 1824–1835, Nov. 2013.
- [114] U. Steger, C. Denecke, B. Sawitzki, M. Karim, N. D. Jones, and K. J. Wood, “Exhaustive differentiation of alloreactive CD8+ T cells: critical for determination of graft acceptance or rejection.,” *Transplantation*, vol. 85, no. 9, pp. 1339–1347, May 2008.
- [115] J. Sun *et al.*, “Tolerance to rat liver allografts: IV. Acceptance depends on the quantity of donor tissue and on donor leukocytes,” *Transplantation*, vol. 62, no. 12, pp. 1725–1730, Dec. 1996.
- [116] N. N. Iwakoshi, J. P. Mordes, T. G. Markees, N. E. Phillips, A. A. Rossini, and D. L. Greiner, “Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8+ T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner,” *J. Immunol.*, vol. 164, no. 1, pp. 512–521, Jan. 2000.
- [117] M. P. Hernandez-Fuentes and R. I. Lechler, “A ‘biomarker signature’ for tolerance in transplantation,” *Nat Rev Nephrol*, vol. 6, no. 10, pp. 606–613, Oct. 2010.
- [118] J. Yang *et al.*, “Critical role of donor tissue expression of programmed death ligand-1 in regulating cardiac allograft rejection and vasculopathy,” *Circulation*, vol. 117, no. 5, pp. 660–669, Feb. 2008.
- [119] L. V. Riella, A. M. Paterson, A. H. Sharpe, and A. Chandraker, “Role of the PD-1 pathway in the immune response,” *Am. J. Transplant.*, vol. 12, no. 10, pp. 2575–2587, Oct. 2012.
- [120] N. Murakami and L. V. Riella, “Co-inhibitory pathways and their importance in immune regulation,” *Transplantation*, vol. 98, no. 1, pp. 3–14, Jul. 2014.
- [121] M. Sho *et al.*, “Requirements for induction and maintenance of peripheral tolerance in stringent allograft models,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no. 37, pp. 13230–13235, Sep. 2005.
- [122] O. Boenisch *et al.*, “TIM-3: a novel regulatory molecule of alloimmune activation,” *J. Immunol.*, vol. 185, no. 10, pp. 5806–5819, Nov. 2010.
- [123] M. Morita *et al.*, “PD1/B7-H1 Interaction Contribute to the Spontaneous Acceptance of Mouse Liver Allograft,” *Am J Transplant*, vol. 10, no. 1, pp. 40–46, Jan. 2010.
- [124] B. Sarraj *et al.*, “Impaired selectin-dependent leukocyte recruitment induces T-cell exhaustion and prevents chronic allograft vasculopathy and rejection,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 111, no. 33, pp. 12145–12150, Aug. 2014.

- [125] F. Bohne *et al.*, “HCV-induced immune responses influence the development of operational tolerance after liver transplantation in humans,” *Sci Transl Med*, vol. 6, no. 242, p. 242ra81, Jun. 2014.
- [126] H. T. Maecker *et al.*, “Standardization of cytokine flow cytometry assays,” *BMC Immunol*, vol. 6, p. 13, Jun. 2005.
- [127] A. M. Asemissen *et al.*, “Flow cytometric determination of intracellular or secreted IFNgamma for the quantification of antigen reactive T cells,” *J. Immunol. Methods*, vol. 251, no. 1–2, pp. 101–108, May 2001.
- [128] J. D. Altman *et al.*, “Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. Science. 1996. 274: 94-96,” *J. Immunol.*, vol. 187, no. 1, pp. 7–9, Jul. 2011.

Prognosis of inhibitory receptors associated with T cell immune exhaustion in kidney incompatible transplantation.

Abstract

Introduction. Despite major advances concerning the management of kidney transplant recipients, the long-term kidney allograft survival remains disappointing. Identifying reliable phenotypic markers of T cells dysfunction could improve our assessment and management of kidney transplantation. Here, we assessed the prognosis value of inhibitory receptors expression classically associated with immune exhaustion in kidney transplant recipients with preformed anti-HLA donor specific antibody (DSA) and/or ABO incompatible (ABOi) graft.

Methods. We first divided all 44 patients based on renal function outcome at 12 months of follow-up. The “progression” group included patients who either developed biopsy proven rejection or showed a decrease of at least 25%CKD-EPI eGFR compared with baseline or who presented graft loss within 12 months. We also separated the 44 patients into the “infection and cancer” group defined by the occurrence of admission-requiring infection or newly diagnosed cancer within the 12 months duration of follow-up, and the “event-free” group.

Results. Lower rates of memory CD4+2B4+PD1- and memory CD8+2B4+CD57+TIGIT+ expression were correlated with progression of kidney failure. A higher expression of 2B4 in memory CD8+ cells was associated with the occurrence of infection or cancer. Memory CD4+2B4+CD57+ T cells were positively associated with TNF- α and IL-2 secretion, and negatively associated with TNF- α and IL-17.

Conclusion. We found that memory CD4+2B4+PD1- and memory CD8+2B4+TIGIT+CD57+ T cells were correlated with renal allograft disease progression following incompatible kidney transplantation. Moreover, we found that a higher expression memory CD8+2B4+ cells was associated with the occurrence of infectious complications and malignancies.

Words count 243

Key words: T cell immune exhaustion, T cell dysfunction, anergy, ABO-incompatible, DSA, kidney transplantation, PD-1, 2B4, CD57, TIGIT.

Corresponding author:

Dr Arnaud Del Bello, MD, PhD

Department of Nephrology and Organ Transplantation,

CHU Rangueil, TSA 50032, 31059 Toulouse Cedex 9, France

Tel: +33 5 61 32 39 23; Fax: +33 5 61 32 28 64

E-mail : delbello.a@chu-toulouse.fr

Introduction

Over the past few decades, despite major advances concerning the management of kidney transplant recipients, the long-term kidney allograft survival remains disappointing [1]–[3]. On the other hand, infectious and malignant complications after solid organ transplantation are still a major pitfall [4]–[6]. Investigating new immunological pathways and targeting endpoints beyond first-year outcomes could provide further progress in long term survival. Recent research in immunology has suggested that exhausted T cells are a unique type of dysfunctional immune cells [7], [8]. These cells play a central role in cancer, chronic infections, but also in autoimmune and inflammatory disease [9]–[11]. The advent of PD-1 (programmed death cell-1) blocking therapies enlightened the potential of these immune pathways in clinical setting [12].

There is currently little evidence of the role and impact of T cell exhaustion after solid organ transplantation. However, allo-transplantation allows a biological environment previously described as promoting exhaustion, especially chronic antigen exposure and initial inflammation [13]. Recently, Fribourg and colleagues [14] suggested that several exhausted T cell subsets correlate with clinical outcomes in kidney transplant recipients. Thus, identifying reliable phenotypic markers for immune exhaustion could improve our assessment and management of kidney transplantation.

Due to the high risk of rejection, and hence, the use of induction therapies, kidney transplants performed across the ABO, or HLA barriers, provide an interesting field to study immune exhaustion. Here, we assessed the prognosis value of inhibitory receptors expression classically associated with immune exhaustion in kidney transplant recipients with preformed anti-HLA donor specific antibody (DSA) and/or ABO incompatible (ABOi) graft.

Methods

Study design and patients

We performed a retrospective observational study of prospectively collected data, in the Organ Transplant Department of Toulouse, France. Between 2011 and 2017, 114 patients received a kidney transplantation with either preformed HLA donor specific antibody (DSA), or ABO incompatible donor. Among them, 70 were excluded (graft loss n=17, death n=2, lost follow-up n=12, basiliximab induction n=33, refused consent n=3, technical defect n=3). All donors from our cohort were living related, and all graft recipients were administrated lymphocyte-depleting induction with anti-thymocyte globulin (ATG), preceded by rituximab and plasma exchange as desensitization, followed by standard tacrolimus, mycophenolic acid and steroid immunosuppressive regimen.

All patients consented to participate to the experimental study “A3” (RC31/17/0426) and were followed for 12 months for clinical outcomes. According to French law (Loi Jardé), anonymous retrospective studies do not require Institutional Review Board (IRB) approval.

We first divided all 44 patients based on renal function outcome at 12 months of follow-up. The “progression” group included patients who either developed biopsy proven rejection or showed

a decrease of at least 25%CKD-EPI eGFR compared with baseline or who presented graft loss within 12 months, while the “progression-free survival” group had none of these criteria. We also separated the 44 patients into the “infection and cancer” group defined by the occurrence of admission-requiring infection or newly diagnosed cancer within the 12 months duration of follow-up, and the “event-free” group which showed none of these criteria.

Data collection

Data on the clinical and laboratory outcomes were retrospectively collected from the medical records and included demographic characteristics regarding age, gender, blood type, number of kidney transplantation, induction regimen, immunosuppressive medication, kidney biopsy findings, and allograft status. The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated using the CKD-EPI equation.

Cytometry analysis

All blood samples were drawn by veinipuncture in EDTA and heparin collection tubes and transferred with 4 hours to the laboratory of immunology for analysis.

Cell surface staining. All stainings were performed directly on whole EDTA blood, within 8h after collection. Briefly, 100 µL of whole blood were incubated for 15 mns with the appropriate concentrations of monoclonal antibodies at room temperature (RT) in the dark. For determination of the concentrations of the major blood lymphocyte subsets (TCD4, TCD8, B, NK cells), blood samples were fixed and lysed with the TQ-prep workstation (Beckman Coulter), according to the manufacturer’s instructions. 100 µL of flowcount fluorospheres (Beckman Coulter) were added to the lysed blood and the samples were directly analyzed by flow cytometry (No-wash procedure). In every other case, following incubation with the staining antibodies, 2mL of facslyse solution (BD Biosciences) was added and the samples were further incubated for 10 mns at RT. Cells were then washed after red blood cell lysis, suspended in 500 µL of cellwash solution (BD biosciences), and analyzed by flow cytometry. The following antibodies were used: anti CD3-AA700, CD4-APC, CD8-PC5.5, CD45-BV510, CD45RA-FITC, CD197-PECF594 BD Biosciences), CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5, CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5, CD3-AA750, CD4 AA700, CD8 KrOr, CD197-PE, TIGIT-ECD, CD244-PerCp5.5, CD279-PC7, CD57-PB (Beckman Coulter).

Cell stimulation and intracellular staining: 50 µL of fresh heparinized blood were incubated for 3h at 37°C, 5% CO₂ in a Duractive 1 tube (Beckman Coulter), containing a fixed amount of PMA and Ionomycin. Fixation, permeabilization and intracellular stainings were performed with the Perfix NC kit and the Duraclone IFT activation kit (Beckman Coulter), according to the manufacturer’s instructions. The Duraclone IFT activation tube contains the following dried antibodies: anti-CD3 AF750, CD4-PB, CD8-AF700, IFNγ-FITC, TNFα-PE, IL-2-PC7. Following the procedure, cells were immediately analyzed by flow cytometry.

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

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using commercially available versions of Prism Graphpad and XLStat. Mann Whitney tests and chi-square tests were performed when adequate. Multivariate analysis was conducted using logistic regression. Heatmaps were performed using XLStat.

Results

1. Lower rates of memory CD4+2B4+PD1- and memory CD8+2B4+CD57+TIGIT+ expression were correlated with progression of kidney failure.

The “progression” group included 16 patients while the “progression-free” group had 28 patients. Mean time from transplantation to baseline was 27 (± 2) and 38 months (± 1), $p=0.13$. The “progression group” and the “progression free” group differed by rejection prior to baseline, respectively: 13 (81%) and 8 (29%); $p=0.001$. The latest result was mainly driven by antibody mediated rejection ($p= 0.01$). The other characteristics at baseline were similar within the two groups, in terms of demographical features, cardiovascular risk factors, immunological settings, infectious disease prior to baseline and immunosuppressive regimen, as depicted in **Table 1**. Allograft function was comparable according to chronic kidney disease (CKD) international staging. Nonetheless, mean initial CKD-EPI eGFR was lower in progression group compared with progression-free, respectively: 39 (± 19) and 54 mL/min/1m² (± 22) $p=0.02$.

The “progression” group showed 36% mean decrease of CKD-eGFR at 12 months, compared with baseline (**Table 2**). Rejections within the 12 months follow-up duration accounted for 10 patients, including 8 chronic active antibody mediated rejection, one T cell mediated acute rejection and 3 mixtes acute rejections. Only 3 graft losses were reported, and all of them had history of chronic active antibody mediated rejection, either prior ($n=2$) or after baseline ($n=2$). Eight patients presented at least a 25% decrease of their eGFR compared to baseline. Mean eGFR at 12 months of follow-up was 21 and 56 mL/min/1m², in the “progression” and the “progression-free”, respectively. Mean eGFR variation compared with baseline was -36% (± 16.4) and +7% (± 26.5), respectively.

One death was reported, due to vascular disease. To note, patients from the “progression” group developed more infections, and mainly more bacterial infections than “progression-free” patients, $p= 0.03$ and $p= 0.01$, respectively.

Intracellular cytokine tests were performed on total CD4 and CD8 population. The intracellular cytokine staining analysis did not show any statistical difference between “progression” and progression-free groups (medians T cells cytokine expressions are reported in **supplementary tables 1 and 2**).

Comparing inhibitory receptors (IRs) between “progression” versus “progression-free” group, we found four clusters among memory CD4+ cells and one cluster among memory CD8+ cells which expressions were statistically lower in the renal progression group than the progression-free group (**figure 1**) : CD4mem 2B4+ (median 0.9% and 2.2% respectively ; $p=0.01$) ; CD4mem 2B4+CD57+ (0.3% and 2.4% respectively ; $p=0.004$) ; CD4mem 2B4+ TIGIT+ (0.1% and 0.7% respectively ; $p=0.01$) CD4m 2B4+ TIGIT+ CD57+ (0.2% and 0.3%

respectively ; $p=0.05$) ; CD8mem 2B4+ CD57+ TIGIT+ (9.7% and 18.3 % respectively ; $p=0.04$). Additionally, the sum of four CD4+mem clusters expressing 2B4+PD1- was significantly lower in the progression group: 2.2 (0.2;6.1) and 6.8% (0.3;55.0); $p=0.001$. Complete data are presented in **supplementary table 3**.

2. A higher expression of 2B4 in memory CD8+ cells was associated with the occurrence of infection or cancer.

The “infection and cancer” group ($n=26$) and the “event-free” group ($n=18$) differed only by infections prior to baseline, respectively 19 (73%) and 6 (33%); $p=0.01$. It was mainly driven by bacterial infections ($p=0.01$). Baseline features are reported in **Table 3**.

Among the “infection and cancer” patients, we reported 23 (88%) infections of all kinds, 16 bacterial infections, 11 viral infections (including 2 CMV diseases), and 4 cancers which were all newly diagnosed epidermoid carcinoma.

Intracellular cytokine tests were performed on total CD4 and total CD8 population. The intracellular cytokine staining analysis did not show any statistical difference between “infection and cancer” and “event-free” groups (**supplementary tables 1 and 2**).

We compared the expression of IRs between patients who developed infections prior to baseline and patients who did not (**suppl. Table 6**). We found a slightly higher expression of CD4m PD1+TIGIT+ cells in patients with infections prior to baseline compared with patients without infections prior to baseline (13% and 10.4%, respectively, $p=0.05$).

Next, we compared IRs between “infection and cancer” versus “event-free”. Results showed that the expression of 2B4 among memory CD8+ cells was higher in the “infection and cancer” group than the “event-free” group (91.4% and 85.0%, respectively; $p=0.02$). There was one IRs cluster which expression was lower in the “infection and cancer” group: CD8mem 2B4+ PD1+ CD57+ (respectively 1.5% and 5.3%; $p=0.01$). Results are shown in **figure 2** and complete data is shown in **supp. table 4**. Among the subgroup without infection prior to baseline, there were two clusters which were associated with an increased frequency of infections: CD8mem 2B4+ and CD8mem 2B4+CD57+TIGIT+ (**figure 3**). Complete data of this subgroup is available in **supp. table 5**.

3. Memory CD4+2B4+CD57+ T cells were associated with cytokine production.

In order to determine the relation between T cells phenotype and function, Spearman’s correlation tests were performed between each IRs combination and each cytokines combination. Results are displayed as heat maps for CD4+ and CD8+ cells separately (**Figure 4 and 5**). Within the five clusters previously associated with renal outcomes, T cells CD4mem 2B4+ CD57+ were positively associated with expression of IL-2 ($r=0.40$; $p=0.02$) and TNF- α + IL-2+ ($r=0.35$; $p=0.05$). The cluster CD4m 2B4+ TIGIT+ CD57+ was negatively associated with the absence of cytokine ($r=-0.34$; $p=0.04$). The single marker 2B4 on CD8mem was associated positively with the production of IL-17 ($r=0.43$; $p=0.01$) though IL-17 absolute rates were very low, accounting for 0.1% to 0.3% of CD8+ T cells.

Discussion

Despite considerable advances regarding the management of immunosuppressive therapy, adverse events of such treatments are still a major issue. As a result, infections and cancer are responsible for severe complications and deaths after solid organ transplantation [4], [6]. Hence, biomarkers to better predict such complications or graft rejections are urgently needed. In this study, we found a positive correlation between the rate of CD8mem expressing 2B4 and the incidence of infections and cancer during the following 12 months. The “infection and cancer” group was defined by occurrence of such events during follow-up, but also revealed a higher rate of *previous* infection. To address this bias, we compared patients with previous infections and patients without. We found not statistical difference of IRs expression in this setting. When we performed the IRs analyses among the subgroup of patients who did not develop infection prior to baseline, we found two subsets (memory CD8+2B4+ and memory CD8+2B4+ CD57+TIGIT+) which expression was higher among patients *who will develop* an infection for the next twelve months. This latest result is consistent with the full cohort analysis and supports the independent role of 2B4 in the development of infections.

The inhibitory receptor 2B4 (CD244) was initially identified as an activation marker in natural killer cells (NK) [15], but it is also highly expressed on CD8+ and CD4+ memory T cells [16], [17]. His role in T cell differentiation and effector functions has been debated, either described as co-stimulatory [18], [19] or as co-inhibitory [20], [21]. An increased expression of 2B4 has been reported on exhausted CD8+ T cells (*CD8 T ex*) in the murine model of LCMV infection [22].

Our results are consistent with previous published studies by Chen and colleagues [23]. In this study, they investigate the expression of 2B4 in sepsis related lymphocyte dysfunction and the association with outcomes in a murine model of sepsis (cecal ligation and puncture). They reported an increased 2B4 expression on CD4+ T cells in septic mice and human patients at early time points. Most importantly, genetic loss or pharmacologic inhibition of 2B4 significantly increased survival in their murine model of sepsis. A recent study [24] did not find any statistical difference in the percent positivity of neither 2B4 nor others typical exhaustion markers (i.e., BTLA, CD57, TIM-3) in patients with candidemia compared with non-septic control patients. In the same setting, they still demonstrated an increased positivity of PD-1 in patients with candidemia. In addition, Mysore et al [25] examined the association of T cell dysfunction and post-transplant infections in a cohort of liver transplant recipients. They found that patients with the highest expression of PD-1+Tim-3+ T cells in the memory compartment before transplantation had increased incidence of infections after liver transplantation, especially within the first 90 days. Unfortunately, they did not investigate the 2B4 receptor.

Kidney graft rejection remains a severe complication after incompatible transplantation. In the study presented here, we found a positive correlation between *CD4mem 2B4+PD1-* T cells subsets and the absence of renal allograft disease progression. Among the CD8mem, this observation was repeated with the subset *CD8mem 2B4+TIGIT+CD57+*. Recently, Liu et al [26] performed an immunological analysis on donor-specific T cells in a murine skin transplantation model using *in vivo* co-stimulatory blockade. They demonstrated that blockade of CD28 signals in the presence of preserved CTLA-4 signals results in the unique up-regulation of 2B4 on CD8+ effectors and allows superior graft survival. Median survival time was superior to 50 days with CD28 blockade, 32 days with anti CTLA4 and only 14 days with

controls. Authors suggest that 2B4 expression plays a critical functional role in controlling antigen-specific CD8+ T cell responses and could be a lead to immune allograft tolerance.

Fribourg et al [14], recently investigated the role of immune exhaustion in a cohort of 26 kidney transplant recipients. They found a correlation between the percentage of exhausted CD4+ or CD8+ T cell, defined by the expression of at least one inhibitory receptor among PD-1, TIGIT, 4-1BB, TIM3 and 2B4), and reduced graft interstitial fibrosis at 6 months post-transplantation. They also found a positive correlation between the variation of the exhausted T cell subsets CD4+PD1+CD57- or CD8+PD1+CD57-, and the estimated glomerular filtration rate (eGFR) at 6 months post-transplantation. The authors therefore suggest a positive role of exhausted T cells in immune allograft adaptation. These latter results are discordant with ours, as we did not find any association with most of the markers used, especially PD-1. Though, several differences of study design can be pointed out. Firstly, they included ABO-compatible and DSA-free kidney transplant recipients treated with lymphocyte-depleting induction or with basiliximab, leading to major confusion bias in T cell phenotype analysis. Secondly, they repeated flow cytometry twice within the 6 months follow-up duration, allowing assessment of IRs percentage variation. Moreover, they did not find any correlation between inhibitory receptors and cytokine production, which could lead to confusion between the rate of inhibitory receptors expression and *T cell exhaustion*.

Regarding T cell function, we found no significant difference of cytokine production between groups. This result was partially expected due to intrinsic limits of cytokine staining technique. The *ex vivo* test performed here was a stimulation with PMA and ionomycin, well known as potent cell stimulating chemical agents. This robust but unspecific technique could not to be able to detect subtle changes in donor-specific alloreactivity. Assessing donor specific T cells would most likely improve our understanding, though it currently requires complex laboratory techniques and immunological processes. Liu et al [26] used a TCR transgenic model of minor antigen disparity to specifically identify and characterize the expression co-stimulatory and coinhibitory molecules on antigen-specific T cell responses, in a murine skin transplant model. It allowed them to yield unique conclusions, as described above. Quantification and phenotyping inhibitory receptors on alloreactive cells, and hence donor-specific T-cell exhaustion, are a major challenge for upcoming immune research.

Furthermore, we found a positive correlation between the four CD4mem subsets correlated with renal outcome (*i.e* CD4mem 2B4+, CD4mem 2B4+TIGIT+, CD4mem 2B4+CD57+, CD4m 2B4+TIGIT+CD57+) and the production of TNF- α and IL-2. A negative correlation was also reported with the absence of cytokine in these subsets. Thus, these clusters are likely to reflect cell activation and differentiation, rather than dysfunction. Such correlation with inhibitory receptor and activation has been previously described in literature [17], [27]. Our data also shows that IL-2 secretion is operated by roughly 50% of total T CD4 cells. These four clusters of interest represent 2 to 3% of total CD4 cells, therefore mitigating our conclusions about phenotype and cytokine correlation.

Our study had several limitations. At the baseline of our study, groups were slightly different. The “progression group” showed a higher rate of previous rejection and a lower mean eGFR. However, even statistically significant, the median difference between groups was small (39 and 54 mL/min/1m²), as both medians belong to CKD stage 3, and one considers such little difference would have low impact on renal outcome. Moreover, in our cohort, the *progression group* has experienced more acute rejections prior to baseline, which were given appropriate

treatments including steroid pulse, plasma exchange, rituximab and intensified immunosuppressive regimen. Whereas we would expect to find dysfunctional immune phenotype, this group still displayed a lower percentage of the inhibitory receptor 2B4. This result could therefore suggest a T cell dysfunction as an independent phenomenon of previous rejections.

Secondly, we analyzed the outcomes of transplant recipients after a median of 25 months (6 to 79) post transplantation. Hence, we could not describe the kinetic of appearance of inhibitory receptor expression *before, at the time and after* kidney rejection or infections. Further prospective studies concerning *de novo* kidney transplant recipients are required to assess the role of T cell exhaustion after kidney transplantation. Despite relatively small number of subjects, results observed here between the different groups described in this study are encouraging. Indeed, significant differences were found between patients who developed or not a progression of graft failure, or who developed or not infectious or malignant complications during the first year.

Finally, in this study we tried to investigate the utility of inhibitory receptors of total memory T cells to predict complications related to over-immunosuppression (infectious or malignant tumors) or under-immunosuppression (rejections). However, we did not perform analysis neither on virus-specific, nor on bacteria-specific nor on alloreactive T cells. Specifically, as the frequency of alloreactive T cells is probably low among circulating T cells, previously stated between 1 and 10% [28], we cannot affirm yet the causal effect of inhibitory receptor expression upon clinical outcomes. Nonetheless, results presented here could suggest that a higher expression of inhibitory molecules such as 2B4 on T cell compartment are correlated with clinical events and could be useful after kidney transplantation to individualize the immunosuppressive regimen. Further studies are needed to confirm this point.

Conclusion

We found that memory CD4+2B4+PD1- and memory CD8+2B4+TIGIT+CD57+ T cells were correlated with renal allograft disease progression following incompatible kidney transplantation. These cells were positively associated with TNF- α and IL-2 secretion, and negatively associated with TNF- α and IL-17. Moreover, we found that a higher expression memory CD8+2B4+ cells was associated with the occurrence of infectious complications and malignancies. Further analyses are required to confirm the potential use of these markers after solid organ transplantation, in order to individualize the immunosuppressive regimen.

Words count 3441

References

- [1] S. A. Lodhi, K. E. Lamb, and H. U. Meier-Kriesche, "Solid organ allograft survival improvement in the United States: the long-term does not mirror the dramatic short-term success," *Am. J. Transplant.*, vol. 11, no. 6, pp. 1226–1235, Jun. 2011.
- [2] H.-U. Meier-Kriesche, J. D. Schold, T. R. Srinivas, and B. Kaplan, "Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era," *Am. J. Transplant.*, vol. 4, no. 3, pp. 378–383, Mar. 2004.
- [3] M. Coemans *et al.*, "Analyses of the short- and long-term graft survival after kidney transplantation in Europe between 1986 and 2015," *Kidney Int.*, vol. 94, no. 5, pp. 964–973, 2018.
- [4] H. Pilmore, H. Dent, S. Chang, S. P. McDonald, and S. J. Chadban, "Reduction in cardiovascular death after kidney transplantation," *Transplantation*, vol. 89, no. 7, pp. 851–857, Apr. 2010.
- [5] B. A. Kiberd, C. Rose, and J. S. Gill, "Cancer mortality in kidney transplantation," *Am. J. Transplant.*, vol. 9, no. 8, pp. 1868–1875, Aug. 2009.
- [6] S. Karuthu and E. A. Blumberg, "Common Infections in Kidney Transplant Recipients," *CJASN*, vol. 7, no. 12, pp. 2058–2070, Dec. 2012.
- [7] A. Schietinger and P. D. Greenberg, "Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction," *Trends in Immunology*, vol. 35, no. 2, pp. 51–60, Feb. 2014.
- [8] E. J. Wherry and M. Kurachi, "Molecular and cellular insights into T cell exhaustion," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 15, no. 8, pp. 486–499, Aug. 2015.
- [9] C. L. Day *et al.*, "PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression," *Nature*, vol. 443, no. 7109, pp. 350–354, Sep. 2006.
- [10] K. E. Pauken and E. J. Wherry, "Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer," *Trends Immunol.*, vol. 36, no. 4, pp. 265–276, Apr. 2015.
- [11] E. F. McKinney, J. C. Lee, D. R. W. Jayne, P. A. Lyons, and K. G. C. Smith, "T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection," *Nature*, vol. 523, no. 7562, pp. 612–616, Jul. 2015.
- [12] H. M. Zarour, "Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, no. 8, pp. 1856–1864, Apr. 2016.
- [13] A. Sanchez-Fueyo and J. F. Markmann, "Immune Exhaustion and Transplantation," *Am. J. Transplant.*, vol. 16, no. 7, pp. 1953–1957, 2016.
- [14] M. Fribourg *et al.*, "T-cell exhaustion correlates with improved outcomes in kidney transplant recipients," *Kidney Int.*, Feb. 2019.
- [15] K.-M. Lee *et al.*, "2B4 acts as a non-major histocompatibility complex binding inhibitory receptor on mouse natural killer cells," *J. Exp. Med.*, vol. 199, no. 9, pp. 1245–1254, May 2004.
- [16] L. Baitsch *et al.*, "Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 2, p. e30852, 2012.
- [17] A. Legat, D. E. Speiser, H. Pircher, D. Zehn, and S. A. Fuertes Marraco, "Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than 'Exhaustion' of Human CD8 T Cells," *Front Immunol*, vol. 4, p. 455, 2013.
- [18] K.-M. Lee *et al.*, "Cutting edge: the NK cell receptor 2B4 augments antigen-specific T cell cytotoxicity through CD48 ligation on neighboring T cells," *J. Immunol.*, vol. 170, no. 10, pp. 4881–4885, May 2003.
- [19] T. Kambayashi, E. Assarsson, B. J. Chambers, and H. G. Ljunggren, "Cutting edge: Regulation of CD8(+) T cell proliferation by 2B4/CD48 interactions," *J. Immunol.*, vol. 167, no. 12, pp. 6706–6710, Dec. 2001.

- [20] C. C. Ezinne, M. Yoshimitsu, Y. White, and N. Arima, "HTLV-1 Specific CD8+ T Cell Function Augmented by Blockade of 2B4/CD48 Interaction in HTLV-1 Infection," *PLOS ONE*, vol. 9, no. 2, p. e87631, Feb. 2014.
- [21] S. V. Vaidya *et al.*, "Targeted disruption of the 2B4 gene in mice reveals an in vivo role of 2B4 (CD244) in the rejection of B16 melanoma cells," *J. Immunol.*, vol. 174, no. 2, pp. 800–807, Jan. 2005.
- [22] S. D. Blackburn *et al.*, "Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection," *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 1, pp. 29–37, Jan. 2009.
- [23] C.-W. Chen *et al.*, "Cutting Edge: 2B4-Mediated Coinhibition of CD4+ T Cells Underlies Mortality in Experimental Sepsis," *J. Immunol.*, vol. 199, no. 6, pp. 1961–1966, 15 2017.
- [24] A. Spec *et al.*, "T cells from patients with Candida sepsis display a suppressive immunophenotype," *Crit Care*, vol. 20, Jan. 2016.
- [25] K. R. Mysore *et al.*, "Longitudinal assessment of T cell inhibitory receptors in liver transplant recipients and their association with posttransplant infections," *Am. J. Transplant.*, vol. 18, no. 2, pp. 351–363, 2018.
- [26] D. Liu *et al.*, "2B4 (CD244) induced by selective CD28 blockade functionally regulates allograft-specific CD8+ T cell responses," *J. Exp. Med.*, vol. 211, no. 2, pp. 297–311, Feb. 2014.
- [27] L. Baitsch *et al.*, "Exhaustion of tumor-specific CD8⁺ T cells in metastases from melanoma patients," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 6, pp. 2350–2360, Jun. 2011.
- [28] E. J. Suchin, P. B. Langmuir, E. Palmer, M. H. Sayegh, A. D. Wells, and L. A. Turka, "Quantifying the Frequency of Alloreactive T Cells In Vivo: New Answers to an Old Question," *The Journal of Immunology*, vol. 166, no. 2, pp. 973–981, Jan. 2001.
-

Annexes

Tables

1. Baseline characteristics “renal disease progression” VS “progression-free”
2. Outcomes
3. Baseline characteristics “infection and cancer” VS “event-free”

Figures

1. Inhibitory receptors groups comparison “renal disease progression” VS “progression-free” significant results only
2. Inhibitory receptors groups “infection and cancer” VS “event-free” significant results only
3. infection-free prior to baseline, Inhibitory receptors groups comparison between “infection and cancer” VS “event-free” significant results only
4. Heat map of correlation between IRs expression and cytokine production within CD4+ T cells
5. Heat map of correlation between IRs expression and cytokine production within CD8+ T cells

Supplementary tables

1. Intracellular cytokine staining “renal disease progression” VS “progression-free”
2. Intracellular cytokine staining “infection and cancer” VS “event-free”
3. Inhibitory receptors comparison between “renal disease progression” VS “progression-free” groups, complete data.
4. Inhibitory receptors groups comparison between “infection and cancer” VS “event-free” groups, complete data.
5. Subgroup infection-free prior to baseline, Inhibitory receptors groups comparison between “infection and cancer” VS “event-free” groups, complete data.
6. Inhibitory receptor comparison between patients who showed infections prior to baseline and those who did not

	Renal disease progression (n = 16)	Progression free survival (n = 28)	p value
Mean time TR to baseline (SD), mth	27 ±2	38 ±1	0.13
Mean age at Baseline (SD), yr	53.4 ±13	55.6 ±13	0.66
Male, n (%)	6 (38%)	16 (57%)	0.35
ESRD leading to transplant, n (%)			
Glomerular disease	6 (38%)	14 (50%)	
Hereditary Disease	2 (13%)	0 (0%)	
Vascular Disease	1 (6%)	7 (25%)	*0.08
Interstitial Nephropathy	6 (38%)	4 (14%)	
Missing	1 (6%)	3 (11%)	
Diabetes at baseline, n (%)	4 (25%)	5 (18%)	0.70
Hypertension at baseline, n (%)	14 (88%)	24 (86%)	1.00
Number of kidney transplantation, n (%)			
First kidney transplant	8 (50%)	18 (64%)	
Second and + kidney transplant	8 (50%)	10 (36%)	0.52
Preemptive transplantation, n (%)	2 (13%)	9 (32%)	0.28
Median dialysis duration (min:max), mth	15 (0:171)	11 (0:72)	0.38
Incompatibility			
DSA, n (%)	3 (19%)	12 (43%)	
ABO incompatible transplant, n (%)	7 (44%)	11 (39%)	0.19
DSA and ABO incompatible, n (%)	6 (38%)	5 (18%)	
Mean cold ischemia time (SD), min	261 ±80	262 ±87	0.92
Delayed graft function, n (%)	2 (13%)	1 (4%)	0.54
Donor			
Mean age (SD), yr	53.8 ±15	52.2 ±11	0.57
Male, n (%)	5 (31%)	14 (50%)	0.34
CMV serology, n (%)			
D-/R-	4 (25%)	8 (29%)	
R+	6 (38%)	12 (43%)	0.90
D+/R+	2 (13%)	6 (21%)	
CKD international staging, n (%)			
CKD stage 1	1 (6%)	3 (11%)	
CKD stage 2-3	10 (63%)	21 (75%)	0.39
CKD stage 4-5	5 (31%)	4 (14%)	
Infection prior to Baseline, n (%)	10 (63%)	15 (54%)	0.75
Bacterial infection	8 (50%)	10 (36%)	0.52
Viral infection	7 (44%)	10 (36%)	0.52
BK virus infection	5 (31%)	7 (25%)	1.00
CMV infection	1 (6%)	6 (21%)	0.39
ICU adm. for sepsis	2 (13%)	1 (4%)	0.54
Rejection at baseline (all kind), n (%)	13 (81%)	8 (29%)	0.001
T mediated rejection	2 (13%)	3 (11%)	1
Antibody mediated rejection	7 (44%)	3 (11%)	0.02
Mixt acute rejection	3 (19%)	1 (4%)	0.13
mTOR without MPA at baseline, n (%)	5 (31%)	12 (43%)	0.53
Mean tacrolimus trough at baseline (SD), mg/L	5.9 ±2.2	6.2 ±2.7	0.69
Mean creatinin at baseline (SD), µmol/L	182 ±95	130 ±43	0.05
Mean eGFR at baseline (SD), mL/min/1.73m²	39 ±19	54 ±22	0.02
Albuminuria at baseline, mg/g	274 (3:1375)	19 (3:298)	0.01
Median lymphocytes M0 [min:max], elmts/µL			
Total lymphocytes	835.6 [371:2027]	1150 [355:3001]	0.35
CD3 lymphocyte	700 [209:1702]	944 [163:2429]	0.46
CD4 lymphocyte	279.5 [92:864]	326 [73:1332]	0.46
CD8 lymphocyte	345 [51:729]	446 [69:1671]	0.36
CD19 lymphocyte	14 [0:380]	47 [1:415]	0.26
NK lymphocyte	110 [30:212]	154 [52:483]	0.04

Table 1 : Baseline characteristics comparison between "renal disease progression" and "progression-free" group. *chi-square test could be performed due to small sample size.

	Renal disease progression (n = 16)	Progression free survival (n = 28)	p value	Infection and cancer (n = 26)	Event-free (n = 18)	p value
Renal disease progression, n (%)				12 (46%)	4 (22%)	0.13
Death, n (%)	1 (6%)	0 0%		1 (4%)	0 (0%)	*
Graft Loss, n (%)	3 (19%)	0		1 (4%)	2 (11%)	0.56
25% eGFR Loss, n (%)	8 (50%)	0		7 (27%)	1 (6%)	0.11
Rejection, n (%)	10 (63%)	0		8 (31%)	2 (11%)	0.16
chronic active antibody mediated rejection	8 (50%)	0		6 (23%)	2 (11%)	0.44
T mediated rejection	1 (6%)	0		1 (4%)	0 (0%)	*
Mixt acute rejection	3 (19%)	0		2 (8%)	1 (6%)	1.00
Mean Creatinemia M12 (SD), µmol/L	224.2 ±136.7	123.4 ±44.9		157.5 ±112.6	123.5 ±39.6	0.1
Mean CKE EPI eGFR M12 (SD), mL/min/1.73m ²	21.2 ±14.7	56.89 ±22.4		41.2 ±25.4	49.0 ±27.5	0.3
Mean eGFR variation M0-M12 (SD), %baseline	64% ±16.4	107% ±26.5		88.0 ±41.9	98.7 ±14.1	0.2
Infection and cancer, n (%)	12 (75%)	14 (50%)	0.13			
Infection all kind, n (%)	12 (75%)	11 (39%)	0.03	23 (88%)	0	
Bacterial infection, n (%)	10 (63%)	6 (21%)	0.01	16 (62%)	0	
Viral infection, n (%)	5 (31%)	6 (21%)	0.49	11 (42%)	0	
ICU adm. For sepsis, n (%)	2 (13%)	0 (0%)	*	3 (12%)	0	
CMV infection, n (%)	2 (13%)	0 (0%)	*	2 (8%)	0	
CMV disease, n (%)	2 (13%)	0 (0%)	*	2 (8%)	0	
Cancer, n (%)	1 (6%)	3 (11%)	1.00	4 (15%)	0	
mTORi at M12, n (%)	5 (31%)	10 (36%)	1.00	10 (38%)	5 (28%)	0.53
MPA at M12, n (%)	6 (38%)	16 (57%)	0.35	12 (46%)	10 (56%)	0.76
Median PBMCs M12 [min:max], elmts/µL						
Total lymphocytes	598 [332:1183]	1124 [379:2943]	0.28	808 [332:2943]	980 [451:1111]	
CD3 lymphocyte	462.5 [260:1077]	764.5 [322:2070]	0.28	611 [260:2070]	770 [322:1200]	
CD4 lymphocyte	175 [140:298]	376 [132:551]	0.41	180 [132:476]	551 [356:682]	**
CD19 lymphocyte	7 [0:104]	102 [5:551]	0.11	18 [0:541]	174 [5:475]	
NK lymphocyte	62.5 [22:112]	139 [39:310]	0.11	97 [22:310]	125 [42:213]	
Mean tacrolimus trough M12 (SD), mg/L	6.6 ±4.7	6.3 ±3.4	0.45	6.0 ±4.0	6.7 ±2.6	0.46

Table 2 : Outcome comparison between groups. Parameters defining groups are in the shaded areas. PBMC : peripheral blood monocytes count

* low occurrence ** insufficient data

	Infection and cancer (n = 26)	Event-free (n = 18)	p value
Mean time TR to baseline (SD), mth	34.1 ±24	32.8 ±23	0.86
Mean age at Baseline (SD), yr	56 ±14	53 ±11	0.29
Male, n (%)	12 (46%)	10 (56%)	0.76
ESRD leading to transplant, n (%)			
Glomerular disease	11 (42%)	9 (50%)	
Hereditary Disease	2 (8%)	0 (0%)	
Vascular Disease	4 (15%)	4 (22%)	0.76
Interstitial Nephropathy	6 (23%)	4 (22%)	
Missing	3 (12%)	1 (6%)	
Diabetes at baseline, n (%)	7 (27%)	2 (11%)	0.27
Hypertension at baseline, n (%)	24 (92%)	14 (78%)	0.21
Number of kidney transplantation, n (%)			
First kidney transplant	15 (58%)	11 (61%)	1.00
Second and + kidney transplant	11 (42%)	7 (39%)	
Preemptive transplantation, n (%)	5 (19%)	6 (33%)	0.31
Median dialysis duration (min:max), mth	17 (0:171)	7 (0:62)	0.08
Incompatibility			
DSA, n (%)	7 (27%)	8 (44%)	
ABO incompatible transplant, n (%)	10 (38%)	8 (44%)	0.18
DSA and ABO incompatible, n (%)	9 (35%)	2 (11%)	
Mean cold ischemia time (SD), min	268 ±91	253 ±74	0.72
Delayed graft function, n (%)	2 (8%)	1 (6%)	1.00
Donor			
Mean age (SD), yr	53 ±14	52 ±10	0.57
Male, n (%)	12 (46%)	10 (56%)	1.00
CMV serology, n (%)			
D-/R-	5 (19%)	7 (39%)	
R+	6 (23%)	12 (67%)	0.14
D+/R+	6 (23%)	2 (11%)	
CKD international staging, n (%)			
CKD stage 1	3 (12%)	1 (6%)	
CKD stage 2-3	17 (65%)	14 (78%)	0.65
CKD stage 4-5	6 (23%)	3 (17%)	
Infection before Baseline, n (%)	19 (73%)	6 (33%)	0.01
Bacterial infection	15 (58%)	3 (17%)	0.01
Viral infection	12 (46%)	5 (28%)	0.35
BK Virus infection	8 (31%)	2 (11%)	0.16
CMV infection	6 (23%)	1 (6%)	0.21
ICU adm. for sepsis	3 (12%)	0 (0%)	*
Rejection at baseline (all kind), n (%)	14 (54%)	7 (39%)	0.37
T mediated rejection	3 (12%)	2 (11%)	1.00
Antibody mediated rejection	7 (27%)	3 (17%)	0.49
Mixt acute rejection	4 (15%)	0 (0%)	*
mTOR without MPA at baseline, n (%)	10 (38%)	7 (39%)	1.00
Mean tacrolimus trough at baseline (SD), mg/L	5.6 ±2	6.7 ±3	0.29
Median tot. lymphocytes M0 [min:max], elmts/µL			
Total lymphocytes	1039 [371:3001]	955 [355:1745]	0.53
CD3 lymphocyte	831 [209:2429]	809 [163:1525]	0.59
CD4 lymphocyte	305 [73:1332]	319 [83:701]	0.82
CD8 lymphocyte	375 [51:1671]	322 [69:825]	0.56
CD19 lymphocyte	37 [0:415]	33 [1:255]	0.84
NK lymphocyte	126 [30:483]	131 [52:279]	0.93

Table 3 : Baseline characteristics comparison between "infection & cancer" and "event-free" group. *chi-square test could be performed due to small sample size.

	Renal disease progression (n = 11)		Progression free survival (n = 24)		p value
Single marker analysis					
CD4 IFNg	28%	(14.8 : 54.1)	30%	(11.4 : 74.2)	0.99
CD4 IL-17	3%	(0.0 : 8.1)	2%	(0.0 : 9.7)	0.30
CD4 IL2	48%	(9.7 : 72.0)	47%	(11.3 : 72.3)	0.82
CD4 TNFa	81%	(17.5 : 90.9)	79%	(30.8 : 95.2)	0.94
Four markers cluster analysis					
CD4 TNFa+ IFNg+ IL2+	19%	(4.4 : 27.6)	15%	(2.9 : 31.5)	0.63
CD4 TNFa+ IFNg+ IL2+ IL17+	0%	(0.0 : 2.1)	0%	(0.0 : 2.0)	0.34
CD4 TNFa+ IFNg+	8%	(3.0 : 31.0)	8%	(1.7 : 45.5)	0.74
CD4 TNFa+ IFNg+ IL17+	0%	(0.0 : 0.6)	0%	(0.0 : 1.0)	0.75
CD4 TNFa+ IL2+	24%	(2.3 : 37.7)	25%	(5.0 : 43.3)	0.85
CD4 TNFa+ IL2+ IL17+	1%	(0.0 : 4.1)	1%	(0.0 : 6.4)	0.19
CD4 TNFa+	19%	(3.1 : 28.2)	19%	(6.5 : 33.9)	0.85
CD4 TNFa+ IL17+	1%	(0.0 : 2.5)	0%	(0.0 : 1.1)	0.31
CD4 IFNg+	0%	(0.2 : 2.3)	0%	(0.1 : 1.4)	0.68
CD4 IL2+	2%	(0.7 : 9.5)	3%	(0.6 : 9.3)	0.28
CD4 all neg	17%	(6.8 : 77.0)	16%	(3.0 : 65.6)	0.74
Single marker analysis					
CD8 IFNg	67%	(23.0 : 86.7)	70%	(18.3 : 98.5)	0.47
CD8 IL17	0%	(0.0 : 2.1)	0%	(0.0 : 2.2)	0.46
CD8 IL2	22%	(7.1 : 53.8)	17%	(4.3 : 39.5)	0.38
CD8 TNFa	65%	(22.5 : 77.1)	63%	(17.1 : 86.4)	0.66
Four markers cluster analysis					
CD8 IFNg+ TNFa+ IL2+	15%	(3.8 : 36.4)	12%	(2.9 : 33.8)	0.35
CD8 IFNg+ TNFa+ IL2+ IL17+	0%	(0.0 : 0.6)	0%	(0.0 : 0.3)	0.94
CD8 IFNg+ TNFa+	31%	(12.5 : 60.5)	47%	(5.3 : 79.4)	0.11
CD8 IFNg+ TNFa+ IL17+	0%	(0.0 : 0.4)	0%	(0.0 : 1.3)	0.30
CD8 IFNg+ IL2+	1%	(0.9 : 3.4)	1%	(0.2 : 5.6)	0.68
CD8 IFNg+ IL2+ IL17+	0%	(0.0 : 0.0)	0%	(0.0 : 0.0)	*
CD8 IFNg+	4%	(1.7 : 55.0)	4%	(1.1 : 46.1)	0.36
CD8 IFNg+ IL17+	0%	(0.0 : 0.2)	0%	(0.0 : 0.0)	*
CD8 TNFa+ IL2+	2%	(0.1 : 8.9)	2%	(0.2 : 3.3)	0.44
CD8 TNFa+ IL2+ IL17+	0%	(0.0 : 0.9)	0%	(0.0 : 0.1)	0.73
CD8 TNFa+	2%	(0.4 : 11.2)	2%	(0.1 : 7.8)	0.51
CD8 TNFa+ IL17+	0%	(0.0 : 0.4)	0%	(0.0 : 0.2)	0.52
CD8 IL2+	1%	(0.1 : 5.3)	1%	(0.1 : 5.7)	0.76
CD8 IL2+ IL17+	0%	(0.0 : 0.2)	0%	(0.0 : 0.0)	*
CD8 all neg	24%	(12.7 : 71.1)	24%	(1.2 : 74.3)	0.79
CD8 IL17+	0%	(0.0 : 0.2)	0%	(0.0 : 1.3)	0.64

Supplementary table 1 : Intracellular cytokine staining comparison between "renal progression" and "progression free" groups. Numbers shown are medians (min:max). * Low occurrence invalidating test

	Infection and cancer (n = 20)		Event Free survival (n = 15)		p value
Single marker analysis					
CD4 IFNg	29%	(11 : 74.2)	28%	(12 : 55.4)	0.96
CD4 IL-17	2%	(0 : 8.1)	2%	(0 : 9.7)	0.59
CD4 IL2	52%	(10 : 72.3)	44%	(13 : 64.6)	0.19
CD4 TNFa	84%	(18 : 95.2)	78%	(44 : 90.9)	0.15
Four markers cluster analysis					
CD4 TNFa+ IFNg+ IL2+	19%	(4 : 31.5)	15%	(3 : 29.0)	0.29
CD4 TNFa+ IFNg+ IL2+ IL17+	0%	(0 : 2.1)	0%	(0 : 2.0)	0.79
CD4 TNFa+ IFNg+	7%	(2 : 45.5)	11%	(3 : 34.1)	0.20
CD4 TNFa+ IFNg+ IL17+	0%	(0 : 1.0)	0%	(0 : 0.4)	0.68
CD4 TNFa+ IL2+	26%	(2 : 43.3)	24%	(6 : 36.6)	0.22
CD4 TNFa+ IL2+ IL17+	1%	(0 : 4.1)	1%	(0 : 6.4)	0.74
CD4 TNFa+	18%	(3 : 31.9)	19%	(12 : 33.9)	0.83
CD4 TNFa+ IL17+	0%	(0 : 2.5)	1%	(0 : 1.1)	0.79
CD4 IFNg+	0%	(0 : 2.3)	0%	(0 : 1.1)	0.80
CD4 IL2+	3%	(1 : 6.3)	4%	(1 : 9.5)	0.38
CD4 all negative	13%	(3 : 77.0)	19%	(6 : 52.8)	0.14
Single marker analysis					
CD8 IFNg	70%	(23 : 98.5)	67%	(18 : 88.4)	0.49
CD8 IL17	0%	(0 : 2.2)	0%	(0 : 1.4)	0.97
CD8 IL2	19%	(5 : 53.8)	17%	(4 : 39.5)	0.58
CD8 TNFa	67%	(22 : 86.4)	61%	(17 : 81.3)	0.80
Four markers cluster analysis					
CD8 IFNg+ TNFa+ IL2+	14%	(3 : 36.4)	13%	(3 : 33.8)	0.65
CD8 IFNg+ TNFa+ IL2+ IL17+	0%	(0 : 0.6)	0%	(0 : 0.3)	0.49
CD8 IFNg+ TNFa+	40%	(12 : 79.4)	46%	(5 : 67.9)	0.65
CD8 IFNg+ TNFa+ IL17+	0%	(0 : 1.3)	0%	(0 : 0.2)	0.68
CD8 IFNg+ IL2+	2%	(0 : 5.6)	1%	(0 : 3.9)	0.48
CD8 IFNg+ IL2+ IL17+	0%	(0 : 0.0)	0%	(0 : 0.0)	*
CD8 IFNg+	5%	(1 : 55.0)	4%	(2 : 26.6)	0.29
CD8 IFNg+ IL17+	0%	(0 : 0.0)	0%	(0 : 0.0)	*
CD8 TNFa+ IL2+	2%	(0 : 8.9)	2%	(0 : 3.6)	0.71
CD8 TNFa+ IL2+ IL17+	0%	(0 : 0.9)	0%	(0 : 0.1)	0.86
CD8 TNFa+	2%	(0 : 7.8)	2%	(1 : 11.2)	0.99
CD8 TNFa+ IL17+	0%	(0 : 0.4)	0%	(0 : 0.1)	0.69
CD8 IL2+	1%	(0 : 5.6)	1%	(0 : 5.7)	0.47
CD8 IL2+ IL17+	0%	(0 : 0.2)	0%	(0 : 0.0)	*
CD8 all neg	21%	(1 : 71.1)	27%	(10 : 74.3)	0.22
CD8 IL17+	0%	(0 : 0.7)	0%	(0 : 1.3)	0.37

Supplementary table 2 : Intracellular cytokine staining comparison between "infection and cancer" and "event free" groups. Numbers shown are medians (min:max). * Low occurrence invalidating test

	Renal disease progression (n = 26)		Progression Free survival (n = 18)		p value
Single marker analysis					
CD4+ 2B4	5.9%	(1.9 : 48.6)	11.0%	(1.1 : 62.6)	0.65
CD4+ PD1	27.2%	(8.5 : 67.6)	26.1%	(13.5 : 54.0)	0.65
CD4+ CD57	5.6%	(0.9 : 39.3)	11.8%	(1.2 : 56.3)	0.20
CD4+ TIGIT	24.0%	(12.3 : 46.5)	20.9%	(3.6 : 41.1)	0.26
CD8+ 2B4	68.9%	(22.7 : 89.6)	73.9%	(29.7 : 91.2)	0.98
CD8+PD1	22.9%	(12.6 : 49.2)	25.4%	(10.4 : 54.5)	0.92
CD8+CD57	25.4%	(1.3 : 69.3)	32.9%	(3.1 : 67.6)	0.95
CD8+TIGIT	48.9%	(17.1 : 69.9)	40.5%	(10.2 : 73.7)	0.92
Single marker analysis					
CD4mem 2B4	5.9%	(1.6 : 56.2)	11.7%	(0.7 : 66.0)	0.44
CD4mem PD1	45.0%	(11.0 : 76.6)	34.2%	(16.3 : 69.0)	0.09
CD4mem CD57	4.8%	(1.1 : 44.6)	12.9%	(1.3 : 61.6)	0.14
CD4mem TIGIT	26.2%	(15.6 : 64.6)	23.6%	(6.6 : 69.3)	0.32
Four markers cluster analysis					
CD4m 2B4+	0.9%	(0.1 : 3.1)	2.2%	(0.1 : 5.5)	0.01
CD4m 2B4+ CD57+	0.3%	(0.0 : 2.0)	2.4%	(0.0 : 37.7)	<0.01
CD4m 2B4+ TIGIT+	0.1%	(0.1 : 2.9)	0.7%	(0.0 : 2.9)	0.01
CD4m 2B4+ TIGIT+ CD57+	0.2%	(0.0 : 0.7)	0.3%	(0.0 : 13.6)	0.05
CD4m all neg	44.8%	(10.6 : 62.3)	39.4%	(11.3 : 54.2)	0.24
CD4m CD57+	0.5%	(0.0 : 1.6)	0.7%	(0.1 : 5.9)	0.13
CD4m PD1+	14.7%	(5.9 : 24.0)	13.4%	(3.7 : 28.2)	0.15
CD4m PD1+ 2B4+	0.9%	(0.1 : 5.7)	1.1%	(0.1 : 7.2)	0.57
CD4m PD1+ 2B4+ CD57+	0.8%	(0.0 : 22.2)	3.2%	(0.0 : 40.4)	0.24
CD4m PD1+ 2B4+ TIGIT+	1.2%	(0.3 : 11.0)	1.6%	(0.2 : 7.8)	0.47
CD4m PD1+ 2B4+ TIGIT+ CD57+	0.5%	(0.1 : 33.1)	1.3%	(0.1 : 21.9)	0.35
CD4m PD1+ CD57+	0.6%	(0.1 : 4.4)	0.9%	(0.1 : 8.6)	0.47
CD4m PD1+ TIGIT+	13.3%	(8.0 : 36.9)	11.1%	(2.6 : 23.0)	0.10
CD4m PD1+ TIGIT+ CD57+	0.6%	(0.2 : 5.4)	0.6%	(0.1 : 8.9)	1.00
CD4m TIGIT+	10.2%	(3.7 : 25.1)	8.5%	(2.7 : 21.1)	0.54
CD4m TIGIT+ CD57+	0.2%	(0.0 : 0.4)	0.2%	(0.0 : 2.4)	0.41
Single marker analysis					
CD8mem 2B4	87.9%	(58.3 : 99.2)	89.6%	(55.5 : 97.9)	0.79
CD8mem PD1	33.9%	(15.0 : 53.8)	25.7%	(10.0 : 54.8)	0.26
CD8mem CD57	35.9%	(5.4 : 75.5)	50.4%	(10.5 : 73.4)	0.25
CD8mem TIGIT	51.8%	(18.4 : 86.3)	55.5%	(12.8 : 81.4)	0.84
Four markers cluster analysis					
CD8m 2B4+	11.0%	(3.9 : 41.0)	9.8%	(1.1 : 59.3)	0.29
CD8m 2B4+ CD57+	6.7%	(0.2 : 40.7)	8.9%	(0.4 : 43.0)	0.65
CD8m 2B4+ CD57+ PD1+	1.9%	(0.4 : 11.5)	2.5%	(0.4 : 12.4)	0.86
CD8m 2B4+ CD57+ PD1+ TIGIT+	7.1%	(3.6 : 18.6)	9.0%	(3.3 : 28.0)	0.29
CD8m 2B4+ CD57+ TIGIT+	9.7%	(0.6 : 33.5)	18.3%	(1.9 : 40.6)	0.04
CD8m 2B4+ PD1+	5.5%	(0.6 : 19.5)	3.1%	(0.5 : 16.7)	0.11
CD8m 2B4+ PD1+ TIGIT+	12.7%	(3.3 : 29.4)	8.2%	(1.3 : 36.2)	0.24
CD8m 2B4+ TIGIT+	10.6%	(2.9 : 39.0)	10.2%	(1.7 : 39.2)	0.71
CD8m all neg	5.8%	(0.2 : 20.8)	3.3%	(0.2 : 17.5)	0.16
CD8m CD57+	0.1%	(0.0 : 0.9)	0.1%	(0.0 : 3.2)	0.33
CD8m CD57+ PD1+	0.0%	(0.0 : 0.2)	0.1%	(0.0 : 0.8)	0.12
CD8m CD57+ PD1+ TIGIT+	0.1%	(0.0 : 1.0)	0.1%	(0.0 : 3.9)	0.90
CD8m CD57+ TIGIT+	0.1%	(0.0 : 0.4)	0.1%	(0.0 : 3.4)	0.43
CD8m PD1+	1.1%	(0.1 : 5.4)	0.5%	(0.0 : 5.3)	0.07
CD8m PD1+ TIGIT+	1.4%	(0.1 : 5.6)	0.7%	(0.1 : 8.1)	0.63
CD8m TIGIT+	2.0%	(0.0 : 7.6)	1.1%	(0.2 : 9.9)	0.89

Supplementary table 3 : Marker expression (median, [min:max]) comparison between "Renal disease progression" group and "progression free" group. Analysis on total CD4 and total CD8 cells included 10 and 23 patients, in the "progression" group and "progression-free" group, respectively.

	Infection & cancer (n = 26)		Event Free survival (n = 18)		p value
Single marker analysis					
CD4+ 2B4	12%	(2 : 62.6)	4%	(1 : 48.6)	0.06
CD4+ PD1	29%	(9 : 54.0)	24%	(13 : 67.6)	0.40
CD4+ CD57	14%	(1 : 56.3)	5%	(1 : 39.3)	0.20
CD4+ TIGIT	23%	(8 : 41.1)	22%	(4 : 46.5)	0.51
CD8+ 2B4+	76%	(23 : 91.2)	64%	(30 : 87.8)	0.17
CD8+PD1+	20%	(13 : 49.0)	29%	(10 : 54.5)	0.19
CD8+CD57+	35%	(1 : 67.6)	26%	(3 : 69.3)	0.42
CD8+TIGIT+	37%	(10 : 73.7)	44%	(21 : 70.4)	0.87
Single marker analysis					
CD4mem 2B4	11%	(1 : 66.0)	5%	(1 : 56.2)	0.09
CD4mem PD1	39%	(11 : 76.6)	32%	(17 : 74.6)	0.20
CD4mem CD57	14%	(1 : 61.6)	6%	(1 : 44.6)	0.25
CD4mem TIGIT	26%	(7 : 69.3)	21%	(12 : 46.2)	0.17
Four markers cluster analysis					
CD4m 2B4+	2%	(0 : 5.5)	1%	(0 : 4.4)	0.32
CD4m 2B4+ CD57+	2%	(0 : 37.7)	1%	(0 : 18.9)	0.44
CD4m 2B4+ TIGIT+	0%	(0 : 2.9)	0%	(0 : 2.1)	0.40
CD4m 2B4+ TIGIT+ CD57+	0%	(0 : 13.6)	0%	(0 : 10.2)	0.10
CD4m all neg	39%	(11 : 62.3)	45%	(11 : 58.9)	0.44
CD4m CD57+	1%	(0 : 5.9)	1%	(0 : 4.3)	0.37
CD4m PD1+	13%	(4 : 24.0)	14%	(6 : 28.2)	0.16
CD4m PD1+ 2B4+	1%	(0 : 7.2)	1%	(0 : 5.7)	0.33
CD4m PD1+ 2B4+ CD57+	3%	(0 : 40.4)	1%	(0 : 22.2)	0.88
CD4m PD1+ 2B4+ TIGIT+	1%	(0 : 11.0)	2%	(0 : 11.0)	0.62
CD4m PD1+ 2B4+ TIGIT+ CD57+	1%	(0 : 29.9)	1%	(0 : 33.1)	0.92
CD4m PD1+ CD57+	1%	(0 : 8.6)	1%	(0 : 2.9)	0.71
CD4m PD1+ TIGIT+	13%	(3 : 36.9)	11%	(6 : 22.6)	0.97
CD4m PD1+ TIGIT+ CD57+	1%	(0 : 8.9)	1%	(0 : 1.9)	0.81
CD4m TIGIT+	8%	(3 : 25.1)	10%	(4 : 21.1)	0.36
CD4m TIGIT+ CD57+	0%	(0 : 2.4)	0%	(0 : 0.7)	0.50
Single marker analysis					
CD8mem 2B4	91%	(58 : 99.2)	85%	(56 : 95.6)	0.02
CD8mem PD1	30%	(10 : 47.3)	36%	(11 : 54.8)	0.13
CD8mem CD57	42%	(5 : 73.4)	43%	(14 : 75.5)	0.86
CD8mem TIGIT	54%	(13 : 86.3)	55%	(18 : 81.4)	0.73
Four markers cluster analysis					
CD8m 2B4+	10%	(4 : 59.3)	15%	(1 : 34.0)	0.75
CD8m 2B4+ CD57+	6%	(0 : 40.6)	12%	(0 : 43.0)	0.14
CD8m 2B4+ CD57+ PD1+	2%	(0 : 11.5)	5%	(0 : 12.4)	0.01
CD8m 2B4+ CD57+ PD1+ TIGIT+	8%	(3 : 28.0)	8%	(4 : 24.9)	0.95
CD8m 2B4+ CD57+ TIGIT+	18%	(1 : 40.5)	10%	(2 : 40.6)	0.35
CD8m 2B4+ PD1+	3%	(0 : 19.5)	4%	(1 : 16.7)	0.77
CD8m 2B4+ PD1+ TIGIT+	11%	(3 : 29.4)	8%	(1 : 36.2)	0.37
CD8m 2B4+ TIGIT+	13%	(3 : 39.0)	9%	(2 : 39.2)	0.14
CD8m all neg	4%	(0 : 20.8)	4%	(0 : 17.5)	0.84
CD8m CD57+	0%	(0 : 0.9)	0%	(0 : 3.2)	0.34
CD8m CD57+ PD1+	0%	(0 : 0.3)	0%	(0 : 0.8)	0.19
CD8m CD57+ PD1+ TIGIT+	0%	(0 : 1.3)	0%	(0 : 3.9)	0.34
CD8m CD57+ TIGIT+	0%	(0 : 0.5)	0%	(0 : 3.4)	0.99
CD8m PD1+	1%	(0 : 5.4)	1%	(0 : 5.3)	0.91
CD8m PD1+ TIGIT+	1%	(0 : 6.6)	1%	(0 : 8.1)	0.50
CD8m TIGIT+	1%	(0 : 9.9)	1%	(0 : 8.6)	0.77

Supplementary table 4: Marker expression (median, [min:max]) comparison between "Infection and cancer" group and "event-free" group. Analysis on total CD4 and total CD8 cells included 17 and 16 patients, in the "infection and cancer" group and "event-free" group, respectively.

	Infection & cancer (n = 7)		Event Free survival (n = 12)		p value
Single marker analysis					
CD4+ 2B4	12.8%	(3 : 53.6)	4.4%	(1 : 38.7)	0.39
CD4+ PD1	23.8%	(9 : 42.7)	22.7%	(19 : 57.5)	0.58
CD4+ CD57	13.0%	(2 : 52.1)	7.6%	(1 : 39.3)	0.65
CD4+ TIGIT	18.8%	(9 : 24.5)	22.1%	(12 : 36.4)	0.29
CD8+ 2B4+	71.1%	(60 : 85.8)	60.9%	(30 : 87.2)	0.29
CD8+PD1+	16.2%	(13 : 37.4)	28.6%	(10 : 54.5)	0.15
CD8+CD57+	32.0%	(20 : 55.7)	32.9%	(7 : 69.3)	0.73
CD8+TIGIT+	43.7%	(10 : 69.0)	40.5%	(21 : 70.4)	0.73
Single marker analysis					
CD4mem 2B4	23.1%	(4 : 57.2)	4.7%	(1 : 43.6)	0.10
CD4mem PD1	38.1%	(11 : 76.6)	29.2%	(17 : 62.1)	0.97
CD4mem CD57	21.2%	(3 : 56.4)	7.2%	(1 : 44.6)	0.19
CD4mem TIGIT	23.3%	(7 : 64.6)	21.0%	(12 : 37.8)	0.83
Four markers cluster analysis					
CD4m 2B4+	2.5%	(0 : 4.3)	1.5%	(0 : 4.4)	0.33
CD4m 2B4+ CD57+	1.8%	(0 : 37.7)	1.5%	(0 : 18.9)	0.37
CD4m 2B4+ TIGIT+	0.7%	(0 : 1.6)	0.7%	(0 : 2.1)	0.58
CD4m 2B4+ TIGIT+ CD57+	0.4%	(0 : 13.6)	0.2%	(0 : 10.2)	0.29
CD4m all neg	46.0%	(14 : 62.3)	41.6%	(18 : 58.9)	0.97
CD4m CD57+	0.9%	(0 : 5.3)	0.6%	(0 : 4.3)	0.31
CD4m PD1+	11.6%	(6 : 18.8)	14.0%	(6 : 28.2)	0.19
CD4m PD1+ 2B4+	1.4%	(0 : 5.6)	0.7%	(0 : 4.0)	0.18
CD4m PD1+ 2B4+ CD57+	3.3%	(0 : 14.3)	1.4%	(0 : 22.2)	0.47
CD4m PD1+ 2B4+ TIGIT+	1.3%	(0 : 9.8)	2.1%	(0 : 4.0)	0.77
CD4m PD1+ 2B4+ TIGIT+ CD57+	1.9%	(0 : 29.9)	0.6%	(0 : 17.1)	0.83
CD4m PD1+ CD57+	0.9%	(0 : 3.7)	0.5%	(0 : 2.9)	0.87
CD4m PD1+ TIGIT+	8.4%	(3 : 15.0)	10.6%	(6 : 22.6)	0.12
CD4m PD1+ TIGIT+ CD57+	0.5%	(0 : 5.4)	0.6%	(0 : 1.9)	0.68
CD4m TIGIT+	8.4%	(4 : 25.1)	9.5%	(4 : 21.1)	0.53
CD4m TIGIT+ CD57+	0.2%	(0 : 0.4)	0.1%	(0 : 0.3)	0.29
Single marker analysis					
CD8mem 2B4	94.2%	(78 : 99.2)	79.3%	(56 : 93.4)	0.03
CD8mem PD1	15.7%	(14 : 36.3)	29.0%	(11 : 54.8)	0.16
CD8mem CD57	42.8%	(31 : 62.7)	40.5%	(14 : 75.5)	0.64
CD8mem TIGIT	62.6%	(13 : 86.3)	44.7%	(18 : 81.4)	0.47
Four markers cluster analysis					
CD8m 2B4+	8.8%	(5 : 38.8)	13.0%	(1 : 34.0)	0.97
CD8m 2B4+ CD57+	14.1%	(3 : 26.6)	9.9%	(0 : 40.7)	0.64
CD8m 2B4+ CD57+ PD1+	2.2%	(1 : 11.5)	3.9%	(0 : 10.2)	0.64
CD8m 2B4+ CD57+ PD1+ TIGIT+	9.2%	(4 : 20.9)	6.5%	(4 : 24.9)	0.47
CD8m 2B4+ CD57+ TIGIT+	25.6%	(11 : 33.5)	9.7%	(2 : 40.6)	0.04
CD8m 2B4+ PD1+	2.6%	(1 : 10.0)	4.3%	(1 : 16.7)	0.47
CD8m 2B4+ PD1+ TIGIT+	8.1%	(3 : 20.2)	8.3%	(1 : 36.2)	0.77
CD8m 2B4+ TIGIT+	9.5%	(5 : 39.0)	7.7%	(2 : 39.2)	0.45
CD8m all neg	3.1%	(0 : 12.8)	5.1%	(0 : 17.5)	0.29
CD8m CD57+	0.1%	(0 : 0.2)	0.1%	(0 : 3.2)	0.70
CD8m CD57+ PD1+	0.0%	(0 : 0.1)	0.1%	(0 : 0.8)	0.37
CD8m CD57+ PD1+ TIGIT+	0.1%	(0 : 0.1)	0.1%	(0 : 3.9)	0.11
CD8m CD57+ TIGIT+	0.1%	(0 : 0.2)	0.0%	(0 : 3.4)	0.93
CD8m PD1+	0.3%	(0 : 1.0)	1.2%	(0 : 5.3)	0.13
CD8m PD1+ TIGIT+	0.5%	(0 : 0.8)	1.1%	(0 : 5.8)	0.03
CD8m TIGIT+	0.8%	(0 : 5.0)	1.6%	(2 : 0.3)	8.63

Supplementary table 5 : Sub group without infection prior to baseline. Marker expression (%median, [min:max]) comparison between "Infection and cancer" group and "event-free" group.

	Infection prior to baseline (n = 25)	No infection (n = 19)		p value
Single marker analysis				
CD4+ 2B4	9.3% (2 : 62.6)	8.5%	(1 : 53.6)	0.55
CD4+ PD1	28.5% (13 : 67.6)	22.7%	(9 : 57.5)	0.17
CD4+ CD57	9.8% (1 : 56.3)	8.7%	(1 : 52.1)	0.68
CD4+ TIGIT	23.3% (4 : 46.5)	20.9%	(9 : 36.4)	0.71
CD8+ 2B4+	73.6% (23 : 91.2)	66.2%	(30 : 87.2)	0.58
CD8+PD1+	26.7% (15 : 49.2)	21.4%	(10 : 54.5)	0.29
CD8+CD57+	25.9% (1 : 67.6)	32.9%	(7 : 69.3)	0.76
CD8+TIGIT+	47.7% (17 : 73.7)	40.5%	(10 : 70.4)	0.51
Single marker analysis				
CD4mem 2B4	6.0% (1 : 66.0)	9.9%	(1 : 57.2)	0.98
CD4mem PD1	36.8% (21 : 74.6)	31.2%	(11 : 76.6)	0.20
CD4mem CD57	8.9% (1 : 61.6)	12.3%	(1 : 56.4)	0.92
CD4mem TIGIT	29.5% (7 : 69.3)	21.3%	(7 : 64.6)	0.05
Four markers cluster analysis				
CD4m 2B4+	1.1% (0 : 5.5)	2.0%	(0 : 4.4)	0.62
CD4m 2B4+ CD57+	0.7% (0 : 26.1)	1.8%	(0 : 37.7)	0.45
CD4m 2B4+ TIGIT+	0.4% (0 : 2.9)	0.7%	(0 : 2.1)	0.33
CD4m 2B4+ TIGIT+ CD57+	0.2% (0 : 11.4)	0.3%	(0 : 13.6)	0.97
CD4m all neg	42.5% (11 : 55.2)	45.4%	(14 : 62.3)	0.39
CD4m CD57+	0.7% (0 : 5.9)	0.6%	(0 : 5.3)	0.89
CD4m PD1+	13.7% (4 : 24.0)	13.4%	(6 : 28.2)	0.95
CD4m PD1+ 2B4+	0.8% (0 : 7.2)	1.1%	(0 : 5.6)	1.00
CD4m PD1+ 2B4+ CD57+	1.8% (0 : 40.4)	2.1%	(0 : 22.2)	0.51
CD4m PD1+ 2B4+ TIGIT+	1.4% (0 : 11.0)	1.4%	(0 : 9.8)	0.87
CD4m PD1+ 2B4+ TIGIT+ CD57+	0.9% (0 : 33.1)	0.7%	(0 : 29.9)	0.76
CD4m PD1+ CD57+	0.9% (0 : 8.6)	0.6%	(0 : 3.7)	0.98
CD4m PD1+ TIGIT+	13.0% (3 : 36.9)	10.4%	(3 : 22.6)	0.05
CD4m PD1+ TIGIT+ CD57+	0.7% (0 : 8.9)	0.6%	(0 : 5.4)	0.76
CD4m TIGIT+	9.0% (3 : 20.2)	8.5%	(4 : 25.1)	0.70
CD4m TIGIT+ CD57+	0.2% (0 : 2.4)	0.2%	(0 : 0.4)	0.53
Single marker analysis				
CD8mem 2B4	89.6% (58 : 98.8)	87.3%	(56 : 99.2)	0.46
CD8mem PD1	33.7% (10 : 53.8)	25.5%	(11 : 54.8)	0.27
CD8mem CD57	41.1% (5 : 73.4)	42.8%	(14 : 75.5)	0.46
CD8mem TIGIT	56.0% (24 : 84.5)	45.5%	(13 : 86.3)	0.42
Four markers cluster analysis				
CD8m 2B4+	10.1% (4 : 59.3)	9.5%	(1 : 38.8)	0.67
CD8m 2B4+ CD57+	6.8% (0 : 43.0)	12.3%	(0 : 40.7)	0.36
CD8m 2B4+ CD57+ PD1+	1.5% (0 : 12.4)	2.8%	(0 : 11.5)	0.26
CD8m 2B4+ CD57+ PD1+ TIGIT+	8.7% (3 : 28.0)	7.3%	(4 : 24.9)	0.96
CD8m 2B4+ CD57+ TIGIT+	16.6% (1 : 40.5)	11.6%	(2 : 40.6)	0.64
CD8m 2B4+ PD1+	3.6% (0 : 19.5)	3.5%	(1 : 16.7)	0.71
CD8m 2B4+ PD1+ TIGIT+	10.2% (3 : 29.4)	8.2%	(2 : 36.2)	0.67
CD8m 2B4+ TIGIT+	11.9% (3 : 35.9)	8.1%	(2 : 39.2)	0.29
CD8m all neg	4.4% (0 : 20.8)	3.6%	(0 : 17.5)	0.92
CD8m CD57+	0.2% (0 : 1.3)	0.1%	(0 : 3.2)	0.92
CD8m CD57+ PD1+	0.1% (0 : 0.6)	0.0%	(0 : 0.8)	0.59
CD8m CD57+ PD1+ TIGIT+	0.1% (0 : 1.3)	0.1%	(0 : 3.9)	0.63
CD8m CD57+ TIGIT+	0.1% (0 : 0.7)	0.1%	(0 : 3.4)	0.48
CD8m PD1+	0.6% (0 : 5.4)	0.5%	(0 : 5.3)	0.87
CD8m PD1+ TIGIT+	1.5% (0 : 8.1)	0.7%	(0 : 5.8)	0.55
CD8m TIGIT+	1.3% (0 : 9.9)	1.3%	(0 : 8.6)	0.89

Supplementary table 6 : Marker expression (% median, [min:max]) comparison between patients with infection prior to baseline and patients without.

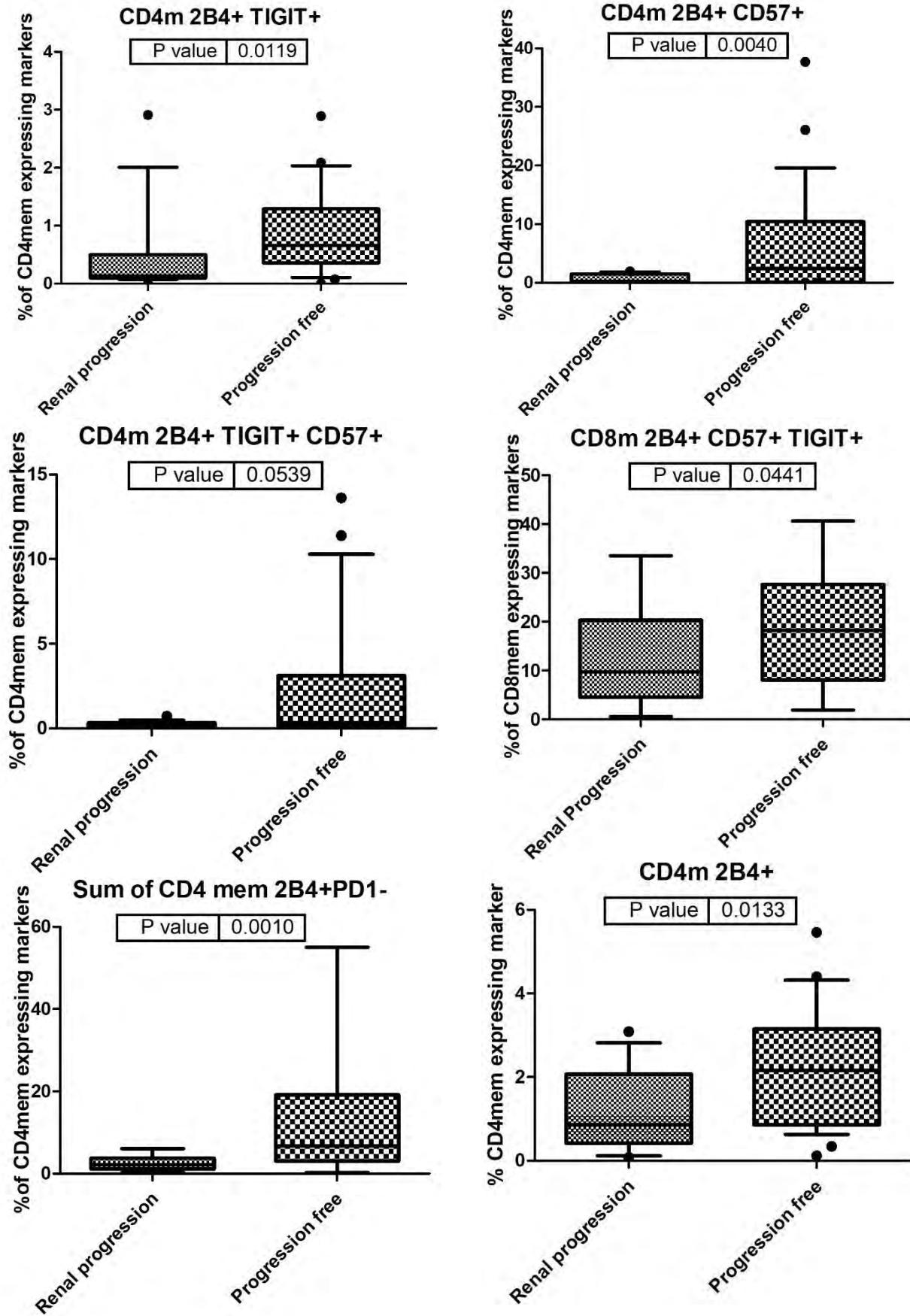


Figure 1 : Inhibitory receptors groups comparison between groups “renal disease progression” and “progression-free”, significant results only. Boxplots with whiskers representing the 10th and the 90th percentile.

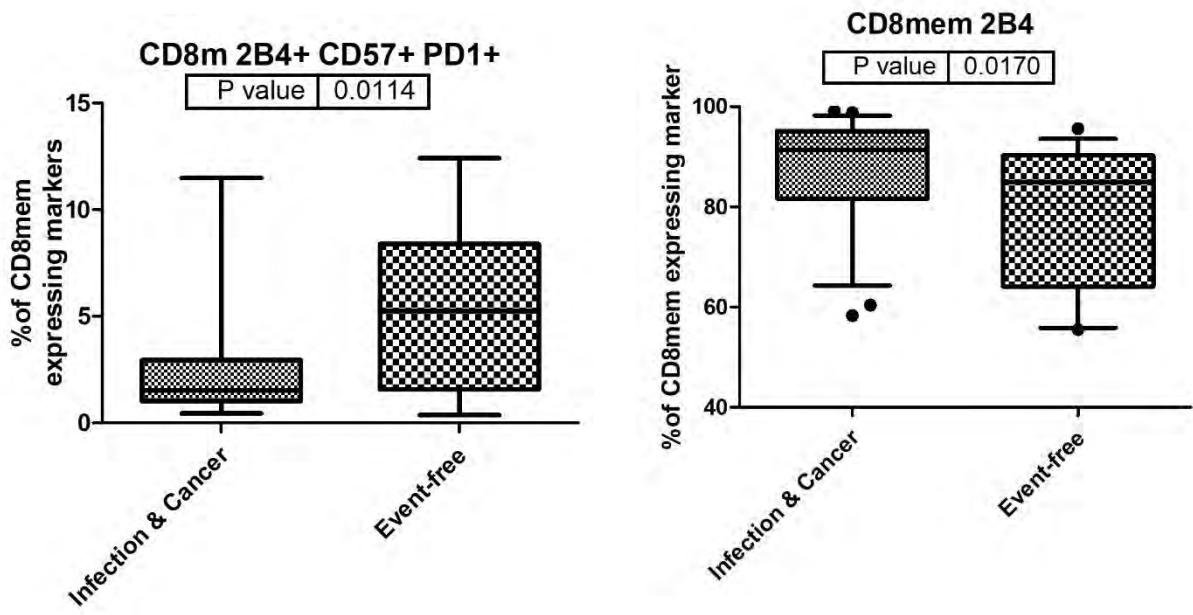


Figure 2 : Inhibitory receptors comparison between groups “infection and cancer” and “event-free”, significant results only. Boxplots with whiskers representing the 10th and the 90th percentile.

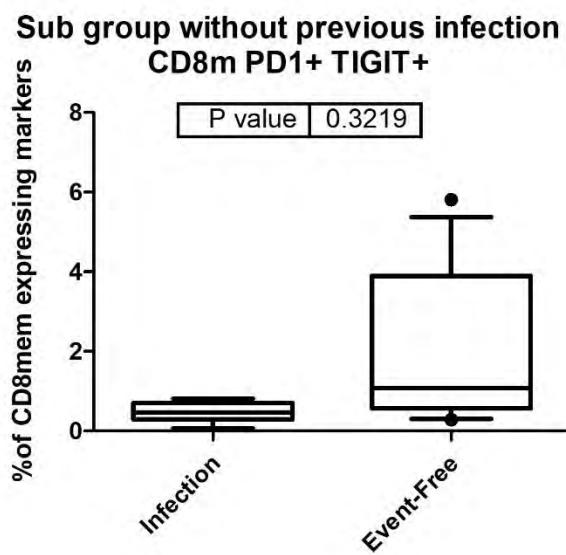
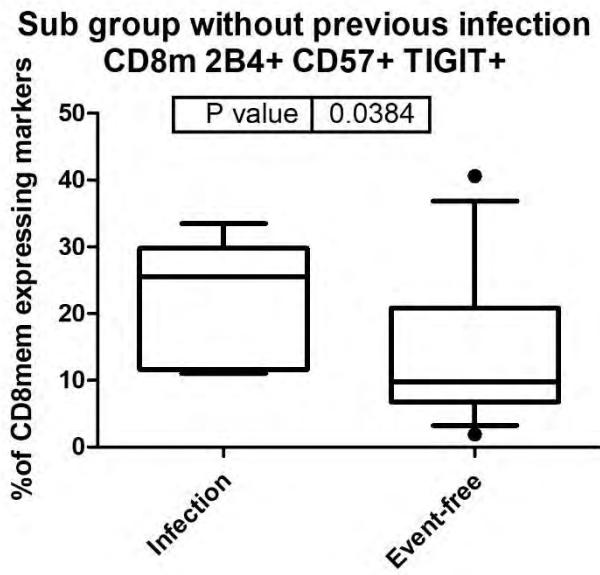
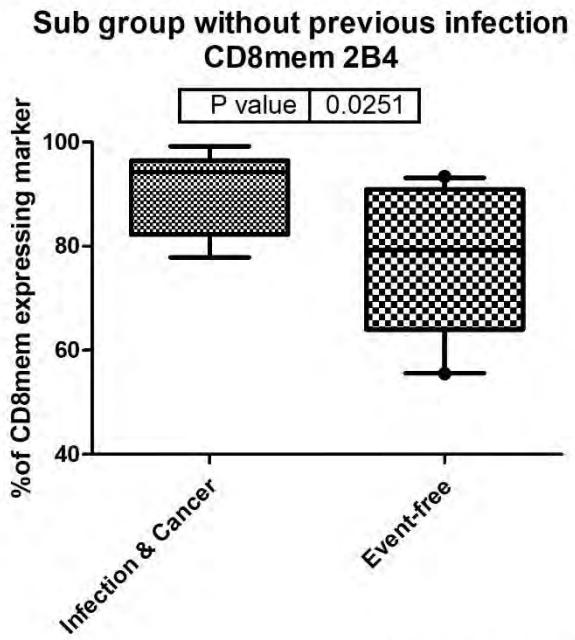


Figure 3: Within subgroup of patients without infection prior to baseline, comparison of inhibitory receptors groups between “infection and cancer” and “event-free”, significant results only. Boxplots with whiskers representing the 10th and the 90th percentile.

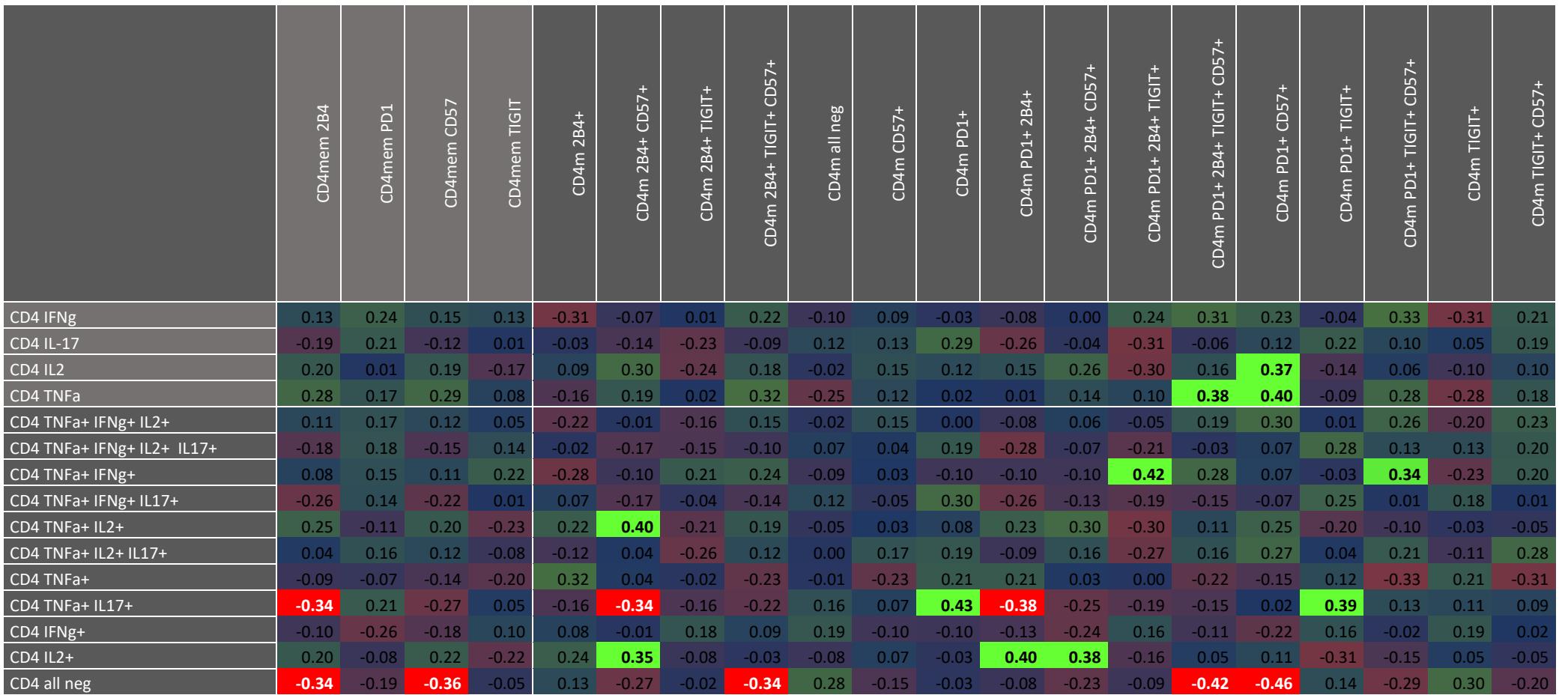


Figure 4: Heat map of spearman's correlation matrix between inhibitory receptors expression and ex vivo cytokine staining on CD4+ cells. Positive values indicates positive correlation and are shown as green cells, whereas negative correlations are shown as red cells. Significative correlation are displayed bold and highlighted. First four rows and first columns display single marker or single cytokine analysis, whereas the rest of the sheet displays four-type cluster

Variables	CD8mem 2B4	CD8mem PD1	CD8mem CD57	CD8mem TIGIT	CD8m 2B4+	CD8m 2B4+ CD57+	CD8m 2B4+ CD57+ PD1+	CD8m 2B4+ CD57+ TIGIT+	CD8m 2B4+ CD57+ PD1+ TIGIT+	CD8m 2B4+ PD1+	CD8m 2B4+ PD1+ TIGIT+	CD8m all neg	CD8m CD57+	CD8m CD57+ PD1+	CD8m CD57+ TIGIT+	CD8m PD1+	CD8m PD1+ TIGIT+	CD8m TIGIT+		
CD8 IFNg	0.28	-0.21	0.10	0.10	0.03	0.06	0.03	-0.03	0.04	0.02	-0.07	-0.13	0.01	0.12	-0.20	-0.07	-0.05	0.03	0.05	0.12
CD8 IL17	-0.02	-0.17	0.17	-0.24	-0.09	-0.06	0.07	0.12	-0.08	0.12	0.03	0.08	0.15	0.04	0.06	0.28	0.10	0.17	0.22	0.23
CD8 IL2	-0.16	0.13	0.17	-0.07	-0.25	0.01	0.10	0.15	0.03	0.16	0.08	0.01	0.15	0.02	0.07	0.28	0.17	0.26	0.18	0.29
CD8 TNFa	0.01	-0.12	0.15	-0.14	0.07	0.17	0.22	0.00	-0.02	0.19	-0.23	-0.35	0.30	0.22	0.05	0.14	0.10	0.35	0.31	0.38
CD8 IFNg+ TNFa+ IL2+	-0.19	0.17	0.15	-0.09	-0.23	0.02	0.13	0.15	0.02	0.17	0.05	-0.08	0.17	0.05	0.09	0.29	0.20	0.30	0.25	0.34
CD8 IFNg+ TNFa+ IL2+ IL17+	0.06	-0.28	0.27	-0.26	-0.33	0.18	0.16	-0.04	0.07	-0.04	-0.10	-0.08	-0.06	-0.04	-0.13	0.04	-0.07	0.06	0.00	0.17
CD8 IFNg+ TNFa+	0.17	-0.26	0.14	-0.01	0.20	0.26	0.26	-0.07	0.01	0.08	-0.27	-0.29	0.16	0.32	0.05	-0.06	0.02	0.13	0.17	0.19
CD8 IFNg+ TNFa+ IL17+	-0.13	-0.15	0.10	-0.19	0.05	0.14	0.14	-0.07	-0.14	-0.01	-0.07	0.09	0.18	0.25	0.28	0.28	0.22	0.18	0.30	0.27
CD8 IFNg+ IL2+	0.00	0.09	0.03	0.29	-0.09	-0.21	-0.16	0.04	-0.13	0.05	0.33	0.28	-0.01	-0.16	-0.15	0.08	0.01	-0.04	-0.10	0.01
CD8 IFNg+ IL2+ IL17+	0.14	-0.27	0.20	-0.05	-0.29	0.08	0.20	0.25	0.07	-0.25	-0.02	-0.19	-0.19	0.27	0.19	0.29	0.29	-0.28	0.19	0.07
CD8 IFNg+	0.14	-0.09	-0.21	0.17	0.19	-0.29	-0.37	0.05	-0.04	-0.05	0.15	0.05	-0.06	-0.21	-0.19	-0.29	-0.15	-0.20	-0.25	-0.16
CD8 IFNg+ IL17+	0.07	0.00	0.29	-0.10	0.19	0.15	0.24	-0.14	-0.10	0.17	0.02	-0.05	0.08	0.00	-0.26	-0.14	-0.14	0.12	0.05	0.17
CD8 TNFa+ IL2+	-0.19	0.02	0.15	-0.12	-0.25	0.05	0.10	0.10	0.03	0.04	0.07	0.10	0.06	-0.10	0.11	0.23	0.07	0.05	0.10	0.22
CD8 TNFa+ IL2+ IL17+	-0.12	-0.15	0.28	0.04	-0.12	-0.24	-0.20	0.16	-0.14	-0.03	0.15	0.28	0.22	0.15	0.20	0.31	0.22	0.15	0.33	0.37
CD8 TNFa+	-0.19	0.17	-0.15	-0.23	0.05	-0.04	0.18	0.00	-0.22	0.28	0.14	-0.02	0.29	-0.12	0.22	0.13	0.02	0.27	0.15	0.12
CD8 TNFa+ IL17+	-0.13	-0.09	0.00	-0.34	0.02	-0.08	0.04	-0.10	-0.20	0.07	0.15	-0.01	0.12	-0.27	0.00	0.04	-0.20	0.06	0.09	0.10
CD8 IL2+	-0.15	-0.03	0.21	-0.08	-0.32	0.15	0.08	0.15	0.19	-0.14	-0.09	0.11	-0.10	0.15	0.22	0.33	0.25	-0.07	0.08	0.08
CD8 IL2+ IL17+	-0.26	0.22	-0.02	0.16	0.01	-0.28	-0.07	0.17	-0.28	0.13	0.32	0.23	0.30	-0.23	0.09	0.29	0.08	0.21	0.31	0.22
CD8 all neg	-0.23	0.21	-0.11	-0.12	-0.01	-0.01	0.01	-0.03	-0.04	-0.05	0.06	0.08	-0.09	-0.13	0.08	-0.04	-0.06	-0.13	-0.14	-0.21
CD8 IL17+	0.43	-0.25	0.32	-0.06	0.04	0.05	0.15	0.04	-0.02	0.04	0.03	0.16	-0.02	0.15	-0.09	0.10	0.05	-0.10	0.01	0.05

Figure 5: Heat map of spearman's correlation matrix between inhibitory receptors expression and ex vivo cytokine staining on CD8+ cells. Positive values indicates positive correlation and are shown as green cells, whereas negative correlations are shown as red cells. Significative correlation are displayed bold and highlighted. First four rows and first columns display single marker or single cytokine analysis, whereas the rest of the sheet displays four-type cluster

Conclusion

La définition d'un profil d'épuisement est confrontée à de multiples déterminants, notamment l'expression de marqueurs cellulaires de surface, la production de cytokines ou encore la fonction cytotoxique. De surcroit, les frontières qui séparent l'épuisement des autres formes de dysfonction lymphocytaire doivent être positionnées plus précisément.

L'identification de marqueurs phénotypiques fiables pour des cellules T épuisées chez le patient transplanté rénal, et leur association avec des paramètres cliniques pourrait fondamentalement améliorer la compréhension et l'évaluation des risques en transplantation rénale. Nos résultats suggèrent que la sous-populations de lymphocytes CD4mem 2B4+PD1- soit associée à une meilleure stabilité de la fonction du greffon. Nos observations tendent également à montrer une association entre la sous-population CD8mem 2B4+ et une incidence excessive des infections. Notre travail propose de nouvelles pistes de réflexion dans l'adaptation immune en transplantation rénale.

Avis favorable
Dr N. KAMAR
18/03/2013

Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
De Médecine Rangueil

24.09.19
E. SERRANO

Pr Nassim KAMAR
Département de Néphrologie et Transplantation d'Organes
CHU TOULOUSE - CHU RANGUEIL
TSA 50032 - 31059 TOULOUSE Cedex 9
Tél. 05 61 32 23 35 - Fax. 05 61 32 28 64
N° RPPS 10002912698

PRONOSTIC DES RECEPTEURS INHIBITEURS ASSOCIES A L'EPUISEMENT LYMPHOCYTAIRE EN TRANSPLANTATION RENALE INCOMPATIBLE.

RESUME EN FRANÇAIS :

Introduction. Malgré les récentes avancées majeures en transplantation rénale, les progrès en termes de survie du greffon à long terme sont décevants. L'identification de marqueurs phénotypiques fiables de dysfonction lymphocytaire T pourrait permettre d'améliorer notre compréhension et notre prise en charge des complications de la transplantation. **Méthodes.** Nous avons mené un travail rétrospectif monocentrique visant à établir la valeur pronostique des marqueurs d'épuisement lymphocytaire en transplantation rénale. Nous avons inclus 44 patients receveurs de greffe rénale incompatible entre 2011 et 2017. Ils étaient séparés entre le groupe « Progression de la maladie rénale » et le groupe « Stabilité de la maladie rénale ». Une deuxième analyse séparaient les patients dans le groupe « Infection et néoplasie » et dans un groupe sans événement. **Résultats.** Les patients qui stabilisaient leur fonction rénale présentaient un excès de lymphocytes mémoires T CD4+2B4+PD1- et de lymphocytes T mémoires CD8+2B4+CD57+TIGIT+. Les patients qui présentaient une infection dans l'année suivant l'analyse exprimaient en excès la sous population de lymphocyte T CD8 mémoires 2B4+. Les lymphocytes mémoires CD4+2B4+CD57+ étaient positivement corrélés avec une sécrétion de TNF- α et d'IL-2, et négativement corrélés à un sécrétion de TNF- α et IL-17. **Conclusion.** Les lymphocytes mémoires CD4+2B4+PD1- et CD8+2B4+TIGIT+CD57+ sont corrélés à une progression de la maladie rénale d'allogreffe en transplantation incompatible. De plus, les cellules T mémoires CD8+2B4+ sont associées à un augmentation de la survie d'infections et de néoplasies.

TITRE EN ANGLAIS : Prognosis of inhibitory receptors associated with T cell immune exhaustion in kidney incompatible transplantation.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée clinique

MOTS-CLÉS : Epuisement lymphocytaire, Dysfonction Lymphocytaire, Anergie, Senescence, Tolérance, PD-1, 2B4, TIGIT, CD57, Transplantation, ABO-incompatible, DSA,

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Toulouse III-Paul Sabatier
Faculté de médecine Toulouse-Purpan,
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

Directeur de thèse : Dr Arnaud DEL BELLO