THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté Médecine et Pharmacie)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale « Sciences Biologiques & Santé »
Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Présentée par :

Lauren DANIEL

****

Les lymphocytes T CD8 innés, une nouvelle population T non conventionnelle (re)programmée en transplantation rénale.

****

Directeur de Thèse : Dr. André HERBELIN
Co-directeur de Thèse : Pr. Antoine THIERRY
Co-encadrante : Dr. Alice BARBARIN

****

Soutenue le 8 juillet 2021
Devant la Commission d'Examen

****

JURY

Dr. Sophie Brouard, DR, Inserm U1064, Université de Nantes	Rapportrice
Pr. Christophe Mariat, PU-PH, GIMAP, Université Jean Monnet, Saint-Etienne	Rapporteur
Dr. Julie Dechanet-Merville, DR, CNRS UMR5164, Université Bordeaux 2	Examinatrice
Pr. Julien Zuber, PU-PH, Inserm UMRS1163, Université Paris V	Examinateur
Pr. Luc Pellerin, PU, Inserm U1082, Université de Poitiers	Examinateur
Dr. Alice Barbarin, Inserm U1082, Université de Poitiers	Co-encadrante
Dr. André Herbelin, DR, Inserm U1082, Université de Poitiers	Directeur de thèse
Pr. Antoine Thierry, PU-PH, Inserm U1082, Université de Poitiers	Codirecteur de thèse

Remerciements

Ce manuscrit est l'aboutissement de quatre années de travail, qui m'ont semblées à la fois longues et courtes. A travers ces quelques lignes, je tiens à remercier tous ceux qui y ont participé, de près ou de loin.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci au Dr Sophie Brouard et au Pr Chrisophe Mariat, rapporteurs de cette thèse, pour l'intérêt que vous aurez bien voulu porter à mon travail.

Je remercie également le Dr Julie Dechanet-Merville, le Pr Julien Zuber et le Pr Luc Pellerin de me faire l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Je suis également reconnaissante envers mes directeurs de thèse, le Dr André Herbelin et le Pr Antoine Thierry, pour m'avoir proposé ce sujet, qui a au final avancé dans une direction imprévue, et pour votre accompagnement. Merci André pour les relectures et corrections sur la première version puis la deuxième version de ce manuscrit, votre confiance et votre soutien tout au long de ces quatre années. Merci également au Pr Jean-Marc Gombert, qui au final était aussi un peu un directeur de thèse, pour votre accompagnement et vos conseils.

Merci à Alice, promue co-encadrante, pour répondre à chaque fois à mes questions, pour chercher à améliorer toujours plus l'organisation du labo et des manips. Et également un grand merci pour ton amitié et pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble en dehors du labo, en congrès ou les week-ends à Poitiers.

Je dois également un énorme merci à toute l'équipe IRATI : Aurélie, Alice, Benjamin, Lucie, Nathalie et Maroua, pour tous les bons moments passés ensemble le midi, pour toutes nos discussions littéraires et philosophiques, pour les blind-tests du vendredi et pour tout le contact social que vous m'avez apporté. Après mon année à Paris, j'en avais besoin et vous me l'avez offert de bon cœur, alors merci à vous tous. Sans oublier Coni, qui n'est pas restée assez longtemps.

Merci aussi à tous les stagiaires, en particulier celles avec qui j'ai travaillé, Léa, Stecy et Marion.

Ce travail de recherche s'est effectué au sein de l'unité Inserm U1082 de Poitiers, dirigée par le Pr Thierry Hauet puis le Pr Luc Pellerin. Merci à vous deux pour votre intérêt pour ce projet de thèse. Et merci aussi à tous les autres membres du laboratoire, ceux avec qui j'ai

discuté lors des réunions, ceux avec qui je suis partie en congrès : Sébastien, Clara, Raphaël, Jacques, Patrick, Thomas, et tous les autres.

Un gros merci également à toute l'équipe enseignante de la section 65. J'appréhendais beaucoup l'enseignement, et au final j'ai beaucoup apprécié cette année pourtant exténuante. Merci en particulier à Aurélie et Thierry Berges, mais aussi Thierry Janet, Omar, Fatima, Marianne, Corinne, Arnaud, Jean-Marc, Nathalie, Aline et Grace. Mais aussi à Nadia, Paule, Vincent et Matthieu de la section 64.

Merci aussi à la plateforme de cytométrie ImageUP.

A ma famille, mes parents en particulier, qui m'ont laissé toute liberté pour choisir les études et la vie que je voulais mener. C'était difficile mais cela m'a permis de grandir et d'assumer mes choix.

A mon frère et ma sœur. A mon neveu Nathan. A ma belle-sœur Marine. Merci d'être là.

A mes amies : toute l'équipe des SMA, Marie, Hélène, Laure, Margaux, Maryse, Stella, Lydia, Catherine, Ludivine et Léa. Nous ne nous sommes pas beaucoup vues ces derniers temps, mais j'entends rattraper ça rapidement. Mais je sais que même si on ne se voit pas, les liens sont toujours là. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté et tous les excellents moments passés ensemble, à la fois virtuels et IRL, à nos (vos !) délires et à nos fous rires.

Table des matières

REMERCIEMENTS 2
TABLE DES MATIERES 4
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 7
LISTE DES ABREVIATIONS 9
INTRODUCTION GENERALE 11
PREMIERE PARTIE. LES LYMPHOCYTES T NON CONVENTIONNELS 12
Chapitre 1 : De l'immunité innée à l'immunité acquise 12
Chapitre 2 : L'immunité naturelle : des LT non conventionnels, éléments effecteurs et régulateurs, à l'interface des immunités innée et acquise 13
1. Caractéristiques et fonctions des iNKT 15
2. Caractéristiques et fonctions des MAIT 18
3. Caractéristiques et fonctions des LT-γδ 20
4. Caractéristiques et fonctions des NK : des cellules de l'immunité naturelle ? 23
Chapitre 3 : Le concept de gradient d'*innateness* 26
DEUXIEME PARTIE. LES LYMPHOCYTES T CD8 INNES 28
Chapitre 1 : Mise en évidence des LT CD8 innés IM chez la souris 28
1. Les souris déficientes en Itk ou Rlk 28
2. Les souris déficiences en Klf2 30
3. Autres modèles murins 30
4. Caractéristiques fonctionnelles des LT CD8 IM 30
5. Des LT CD8 IM présents chez les souris WT 32
6. Sélection des LT CD8 IM 32
6.1. La sélection thymique 32
6.2. La sélection par des antigènes du soi ? 33
Chapitre 2 : Différenciation des LT CD8 IM chez la souris 34
1. Le rôle essentiel de l'IL-15 34
2. Le rôle essentiel d'Eomesodermine (Eomes) 34
3. Un axe iNKT/IL-4/T CD8 IM ? 36
4. Cellules virtuelles mémoires : différenciation possible en périphérie ? 37
Chapitre 3 : Mise en évidence des LT CD8 innés chez l'humain 39
1. Dans le sang périphérique de donneurs sains 39
2. Dans le sang de cordon 40
3. Phénotype Eomes(+) panKIR/NKG2A(+) 40
Chapitre 4 : Les fonctions des LT CD8 innés 42
1. Immunité anti-infectieuse chez la souris 42
1.1. Immunité anti-bactérienne 42
1.2. Immunité anti-virale 43
2. Immunité anti-tumorale 44
2.1. Chez la souris 44
2.2. Chez l'humain 45
Chapitre 5 : Les LT CD8 innés pourraient-ils être issus d'une reprogrammation ? 46
1. L'immuno-sénescence et les LT CD8 innés 47
2. La stimulation chronique, la sénescence et les LT CD8 « NK-like » 48
3. Le métabolisme énergétique, une reprogrammation spécifique des LT CD8 innés ? 49
4. LT CD8 innés, quelle place dans le gradient d'*innateness* ? 50

TROISIEME PARTIE. TRANSPLANTATION RENALE, TOLERANCE ET LT NON CONVENTIONNELS 52
Chapitre 1 : La réaction allo-génique et la transplantation d'organe 52
1. Les différentes types de présentation des allo-antigènes 52
1.1. La présentation directe 52
1.2. La présentation indirecte 53
1.3. La présentation semi-directe 54
2. Les différents types de rejet 54
Chapitre 2 : Les immunosuppresseurs et leur action sur les cellules immunitaires 55
1. Les différents traitements immunosuppresseurs 55
1.1. Traitement d'induction 56
1.2. Traitement d'entretien 56
1.2.1. Les inhibiteurs de la calcineurine (CNI) 56
1.2.1.1. Mécanismes d'action dépendants de la calcineurine 56
1.2.1.2. Mécanismes d'action indépendants de la calcineurine 57
1.2.2. Les antimétabolites 58
1.2.3. Les inhibiteurs de mTOR 58
1.2.4. Les corticoïdes 58
2. Immunosuppression et cancer 59
Chapitre 3 : La tolérance en transplantation rénale 61
1. Du concept de tolérance immunologique à la définition clinique de tolérance 61
2. La tolérance centrale 62
3. La tolérance périphérique 63
4. Les LT CD4 régulateurs 64
4.1. Les Treg, description 64
4.2. Les Treg, mécanismes d'action 65
4.2.1. Mécanismes d'actions régulateurs intrinsèques des Treg 65
4.2.2. Coopération avec d'autres cellules 67
4.2.3. Fonctions dites « non immunitaires » des Treg 68
5. Tolérance et immunosuppression 69
Chapitre 4 : Les LT non conventionnels en transplantation rénale 70
QUATRIEME PARTIE. HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS 72
RESULTATS 74
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 99
1. Evidence d'une reprogrammation des LT CD8 en transplantation rénale 100
1.1. Résumé des principaux résultats acquis en faveur d'une reprogrammation des LT CD8 100
1.2. Causes multifactorielles de la reprogrammation des LT CD8 101
2. Une (re)programmation homéostatique et fonctionnelle des LT CD8 innés induite par la CsA : mécanismes sous-jacents ? 102
2.1. Modélisation *in vitro* 103
2.2. Une programmation à partir du compartiment Eomes(-) ? 105
2.3. Une reprogrammation à partir du compartiment Eomes(+) ? 107
2.4. Quel rôle pour la calcineurine/CsA dans la différenciation des LT CD8 innés E(+) ? 108
3. La place de l'activation chronique du système immunitaire associée à la transplantation d'organe dans la (re)programmation des LT CD8 innés E(+) 110
3.1. Activation immunitaire chronique allo-spécifique ? 111
3.2. Activation immunitaire chronique viro-induite (CMV) 112

4. Une (re)programmation des LT CD8 innés générée/exacerbée par le vieillissement ? 113
4.1. Etude de l'impact de l'âge sur le statut senescent des LT CD8 innés 113
4.2. Le statut senescent exacerbé des LT CD8 innés : un phénomène de type *inflammaging* ? 114
5. Origine du défaut d'expression d'IFN-γ dans les LT CD8 innés chez les patients transplantés rénaux traités par CsA 115
5.1. L'hypothèse d'une exhaustion 116
5.2. L'hypothèse d'un déficit en IL-15R 117
6. Place des LT CD8 innés E(+) et de leur reprogrammation dans la physiopathologie associée à la transplantation rénale 119
6.1. Etudier le rôle physiopathologique des LT CD8 innés en transplantation d'organe 119
6.2. Une reprogrammation en cellules régulatrices ? 119
6.3. Place du cancer dans la reprogrammation des LT CD8 innés 121
6.4. Un profil transcriptomique pour mieux caractériser les LT CD8 innés E(+) .. 123
Conclusion générale 124
BIBLIOGRAPHIE 125
RESUME 155

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Ensemble des cellules intervenant dans les différents types d'immunité 14

Figure 2 : Cinétique d'action des différents types d'immunité 15

Figure 3 : Structure de la molécule CD1d avec les sites de liaison à l'antigène, en comparaison avec la molécule du CMH de classe I 16

Figure 4 : Les conformations de l'α-GalCer humain et murin se superposent dans le complexe formé avec CD1d. 16

Figure 5 : Points communs entre les MAIT et les iNKT 19

Figure 6 : Les récepteurs à la surface des NK et leurs cibles, régulant la balance activation/inhibition de ces cellules 24

Figure 7 : Expression de l'ARNm codant PLFZ (ZBTB16), l'IFN-γ et de l'ARNr 47S (marqueur de la biogénèse ribosomale) à l'état basal dans les différents LT conventionnels et non conventionnels du gradient d'*innateness* 27

Figure 8 : Caractéristiques des LT CD8 IM et VM murins. 39

Figure 9 : Caractéristiques des LT CD8 innés humains. 41

Figure 10 : Expression de l'ARNm codant Eomes, KIR3DL1, NKG2A (KLRC1) et CD122 (IL2RB) à l'état basal dans les différents LT conventionnels et non conventionnels du gradient d'*innateness* 51

Figure 11 : Les différentes voies de présentation des allo-antigènes 54

Figure 12 : Mécanisme d'action principal de la CsA 57

Figure 13 : Sites d'action des différentes molécules immunosuppressive dans la signalisation des LT 59

Figure 14 : Mécanismes d'action des Treg 67

Figure 15 : Effet des différents traitements immunosuppresseurs sur la fréquence des sous-populations de LT CD8, leur production d'IFN-γ et leur phénotype sénescent. 102

Figure 16 : La CsA favorise la génération des LT CD8 innés *in vitro*. 104

Figure 17: La CsA favorise la production d'IFN-γ par les LT CD8 en modélisation *in vitro* chez le donneur sain. 105

Figure 18 : Analyse des phénotypes de prolifération et d'activation chez les patients et les sujets sains. 106

Figure 19 : Analyse du phénotype de prolifération chez les patients CsA-T et les sujets sains. 108

Figure 20 : Les LT CD8 innés E(+) sont les principaux producteurs d'IFN-γ parmi les LT CD8 en réponse à la stimulation de type inné du couple IL-12/IL-18, sans modulation de la CsA. 110

Figure 21 : Les LT CD8 innés E(+) des patients CsA-T dont la sérologie CMV est positive (CMV+) produisent moins d'IFN-γ en réponse à la stimulation de type inné du couple IL-12/IL-18. 113

Figure 22 : Production d'IFN-γ et expression de la perforine par les NK des souris jeunes et âgées 115

Figure 23 : Les LT CD8 des patients CsA-T ne présentent pas un phénotype d'exhaustion. 116

Figure 24 : Le traitement par CsA est associé à une diminution de l'expression de CD122 ex vivo et une augmentation de son expression in vitro. 118

Figure 25 : Impact des antécédents de cancer (Ca) sur la fréquence des LT CD8 innés E(+) et de leurs marqueurs chez les patients transplantés de la cohorte CsA-T. 122

Tableau 1 : Rapport standardisé d'incidence (SIR, pour *standardized incidence ratio*) pour les cancers les plus fréquents chez les patients transplantés rénaux au Royaume-Uni 61

Liste des abréviations

α-GalCer : α-galactosylcéramide
ADCC : antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
AIRE : Auto-immune regulator
AMP : adenosine monophosphate
AMPc : adenosine monophosphate cyclique
ATP : adenosine triphosphate
BCG : *bacillus* de Calmette et Guerin
BCR : B-Cell Receptor
BTN : butyrophilines
CBP : CREB binding protein
CD : cluster de différenciation
CFU : unité formant colonie
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMN : cellules mononucléées
CMV : cytomégalovirus
CNI : inhibiteurs de la calcineurine
CPA : cellule présentatrice d'antigène
CsA : cyclosporine A
CsA-M : CsA-monotherapy
CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DC : cellule dendritique
DETC : dendritic epidermal T cell
DP : double positive CD4(+) CD8(+)
DSA : anticorps spécifiques du donneur
EBV : Virus d'Epstein-Barr
EMRA : effector memory RA(+)
Eomes : Eomesodermine
EPCR : endothelial protein C receptor
GITR : glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
GMP : guanosine monophosphate
GS-T : gold standard treatment
GVHD : graft versus host disease
HD : healthy donor
HHV : virus de l'herpès humain
HPV : papilloma virus humain
ICAM : intercellular adhesion molecule
ID3 : inhibitor of differentiation ou inhibitor of DNA binding
IFN : interféron
Ig : immunoglobuline
IGF-1 : insulin-like growth factor

IL : interleukine
IL-2Rα/β/γ : chaîne α/β/γ du récepteur de l'IL-2
ILT : immunoglobulin-like transcript
IM : inné/mémoire
iNKT : invariant natural killer t-cell
IPEX : Immunodérégulation, Polyendocrinopathie, Entéropathie lié au chromosome X
KGF : keratinocyte growth factor
KIR : killer-cell immunoglobulin-like receptors)
KLF2 : kruppel-like factor 2
KLRG1 : killer cell lectin-like receptor subfamilly G member 1
LB : lymphocytes B
LCMV : lymphocytic choriomeningitis virus
LMC : leucémie myéloïde chronique
LPS : lipopolysaccharide
LT : lymphocytes T
MAIT : mucosal-associated invariant T-cells
MCMV : murine cytomegalovirus
MLR : mixed lymphocyte reaction
MNSC : non-malanoma skin cancer
NCR : natural cytotoxicity receptor
NK : Natural Killer
PHA : phytohemagglutinine
PLZF : promyelocytic leukemia zinc finger
PMA : phorbol myristate acetate
PMA/iono : PMA et ionomycine
SAP : SLAM associated protein
SLAM : signaling lymphocyte activation molecule
SLP76 : Src homology 2 domain-containing leucocyte protein 76 kDa
SP : simple positif
TCR : T-cell receptor
TGF : transforming growth factor
Th : T helper
TNF : tumor necrosis factor
Treg : LT régulateurs
Ts : T suppressif
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VM : virtuelle mémoire
WT : wild type, sauvage
-/- : Délétion/invalidation homozygote d'un gène par technique utilisant la recombinaison homologue

INTRODUCTION GENERALE

Première partie. Les lymphocytes T non conventionnels

Chapitre 1 : De l'immunité innée à l'immunité acquise

Le système immunitaire est apparu au cours de l'évolution pour maintenir l'intégrité des organismes pluricellulaires, sélectionnant des mécanismes de plus en plus complexes, assurant la détection et l'élimination de tout élément extérieur ou intérieur qui pourrait lui porter atteinte, ainsi que la réparation et la maintenance/entretien des tissus et des organes.

Chez l'être humain, la majorité des cellules immunitaires sont produites dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques. Celles-ci se différencient en progéniteurs hématopoïétiques qui se différencient eux-mêmes en cellules différenciées dont on peut distinguer deux grandes lignées : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde. La maturation de ces populations s'effectue dans la moelle osseuse, à l'exception de celle des LT (pour lymphocyte T) qui s'effectue dans le thymus. Les cellules immunitaires, une fois produites et fonctionnelles, quittent l'organe différenciateur et se dirigent alors vers la circulation sanguine, la circulation lymphatique, dans les organes lymphoïdes secondaires ou tertiaires ou enfin dans des tissus non lymphoïdes. Ainsi localisées, les cellules immunitaires peuvent détecter les événements dangereux et les éliminer ou mettre en jeu les signaux de réparation ou de maintenance (Espinosa & Chillet, 2010).

Le système immunitaire peut être séparé en deux couches fonctionnelles : l'immunité innée et l'immunité acquise (**Figure 1**), lesquelles peuvent être distinguées par le délai d'intervention et la temporalité d'action au cours d'une réponse immunitaire donnée, la spécificité (ou l'absence de spécificité) envers un antigène et la mémoire immunitaire caractéristique de l'immunité acquise. Cependant si leur temporalité et les populations qui les composent sont différentes, elles sont toutes capables de produire des cytokines et des chimiokines qui leur permettent de communiquer entre elles afin de réguler et contrôler la réponse immunitaire (Espinosa & Chillet, 2010).

L'immunité innée fut la première à apparaitre au cours de l'évolution. Elle est mobilisable en un temps court, de l'ordre de quelques minutes à quelques heures. Traditionnellement, il est considéré que ses modes d'actions, bien que nombreux, ne s'adaptent pas au danger au cours du temps et qu'il n'y a pas de mémoire immunologique portée par les éléments de l'immunité innée. Au sein de cette immunité, on peut également compter les barrières physiques, telles

que les barrières épithéliales et les microbiotes (Bengmark, 2013; Lloyd-Price et al., 2017; Sender et al., 2016).

Après l'immunité innée, est apparue au cours de l'évolution l'immunité acquise, adaptative ou spécifique. Au contraire de l'immunité innée, qui est considérée habituellement comme invariable, censée répondre de façon identique à chaque stimulation, l'immunité acquise permet la génération de cellules spécifiques de l'antigène rencontré. La notion même d'antigène est liée à l'existence de l'immunité acquise, puisque ce qui définit un antigène c'est le fait d'être reconnu spécifiquement par le récepteur d'un LT (TCR ou *T-cell receptor*), d'un LB (pour lymphocyte B) (BCR ou *B-cell receptor*) ou par un anticorps (Espinosa & Chillet, 2010).

Cependant, par rapport à l'immunité innée, le temps de latence de la mise en place de la réponse immunitaire spécifique est plus long, de l'ordre de plusieurs jours. En effet, ces cellules, qui sont sélectionnées pour leur spécificité antigénique, subissent une phase d'expansion clonale qui prend du temps et explique cette latence. Cependant, une fois la réponse immunitaire résolue, une petite partie de ces cellules survivra et se différenciera en cellules mémoires. L'immunité contre l'antigène en question reste donc opérante pendant plusieurs semaines, mois voire années. Cette mémoire immunitaire permet à l'organisme de pouvoir réagir plus rapidement à un second contact avec cet antigène ; c'est le principe de la vaccination (Espinosa & Chillet, 2010).

Si ces deux types d'immunité présentent des caractéristiques très différentes, elles coexistent et coopèrent afin de maintenir l'intégrité de l'organisme.

Chapitre 2 : L'immunité naturelle : des LT non conventionnels, éléments effecteurs et régulateurs, à l'interface des immunités innée et acquise

Au cours des dernières décennies, la frontière entre immunités innée et acquise se fait moins nette, avec la description de cellules de l'immunité acquise possédant des caractéristiques de l'immunité innée, comme les LT non-conventionnels.

Les LT non-conventionnels ont été mis en évidence ces dernières décennies (pour revue (Godfrey et al., 2015)) (**Figure 1**). Ils expriment des TCR activés par les molécules du CMH (pour complexe majeur d'histocompatibilité) (ou apparentées au CMH) et exercent les

fonctions effectrices des LT. Mais ils peuvent également se comporter comme des cellules de l'immunité innée en répondant de façon rapide et non spécifique (**Figure 2**).

Ces populations comprennent les iNKT (pour *invariant Natural Killer T-cell*), les MAIT (pour *mucosal-associated invariant T-cell*), les LT-γδ ou encore les LT CD8 innés.

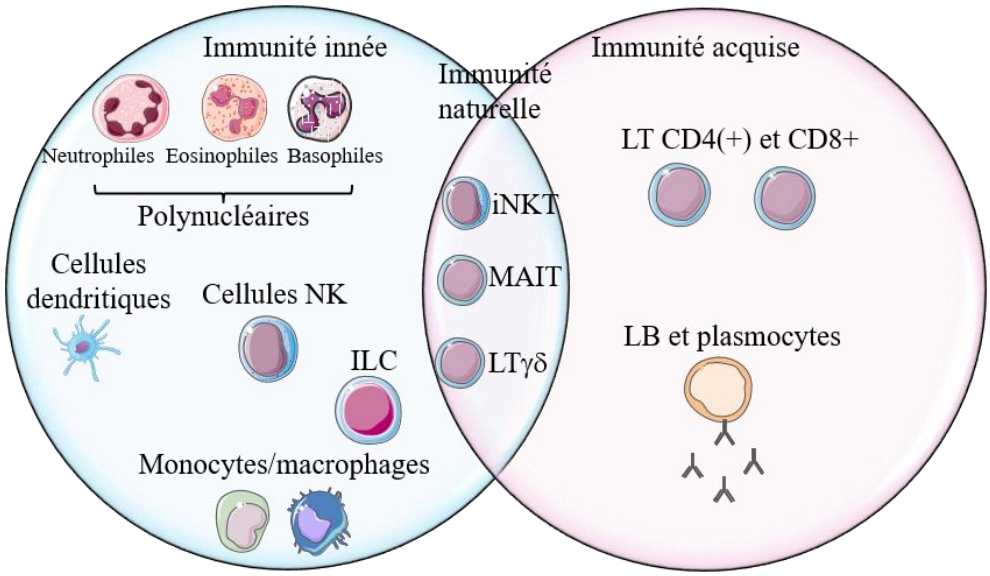


Figure 1 : Ensemble des cellules intervenant dans les différents types d'immunité (adapté d'après (Dranoff, 2004))

Quatre éléments peuvent être pris en compte pour décrire le caractère inné de ces populations lymphocytaires T :

- Un répertoire du TCR invariant ou peu polymorphe et des modes de reconnaissance de leur antigène/ligand qui sont non conventionnels,

- La nature monomorphe ou peu polymorphe des antigènes/ligands reconnus,

- Une forte capacité de réponse à des modes de stimulation (interleukine (IL)-12/IL-18 ou IL-33 ou encore mettant en jeu CD16) utilisés habituellement par les ILC (pour *innate lymphoid cell*), en particulier les NK (pour *natural killer cell*),

- Un programme de différenciation et d'expression génique propre, que nous dénommerons « *innateness* » (cf. introduction partie 1 chapitre 3) et commun à l'ensemble de ces LT innés.

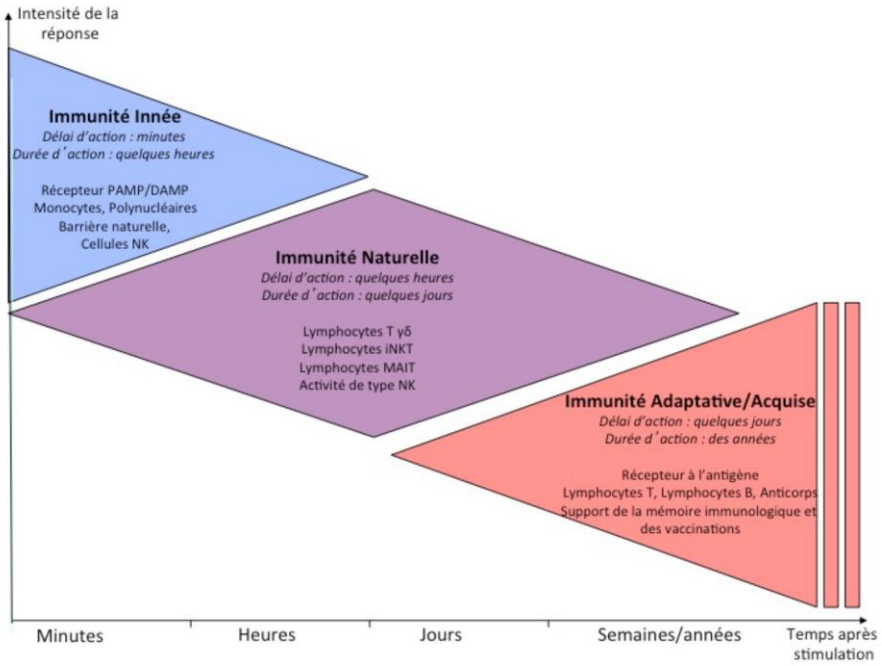


Figure 2 : Cinétique d'action des différents types d'immunité après stimulation ((Barbier, 2019) d'après (Martin & Kearney, 2001))

1. Caractéristiques et fonctions des iNKT

Les iNKT sont dénommés ainsi en raison de leur TCR semi-invariant, issu du réarrangement Vα14-Jα18 chez la souris et Vα24-Jα18 chez l'humain. Ces segments composent une chaîne α appariée à une chaîne β du TCR qui utilise préférentiellement Vβ8.2, mais aussi Vβ7 ou Vβ2 chez la souris et Vβ11 chez l'humain. Leur fréquence circulante est très faible chez l'humain, soit 0,01 à 0,1% des cellules mononucléées sanguines (CMN) (Berzins et al., 2011) alors qu'il constituent environ 10% des LT de la graisse viscérale omentale (Lynch, O'Shea, et al., 2009). Ce TCR invariant est restreint par la molécule du CMH non classique de classe Ib CD1d. CD1d est peu polymorphe ; son sillon, par son caractère très hydrophobe, permet de présenter des antigènes non peptidiques tels que des glycosphingolipides, dont l'exemple expérimental est l'α-GalCer (pour α-galactosylcéramide), lesquels sont reconnus par les iNKT (**Figure 3**). CD1d permet aussi de présenter des sulfatides reconnus par des NKT non canoniques, dits aussi de type II, ou par des LT-γδ (Bai et al., 2012; Wolf et al., 2015). De façon remarquable, l'extrême conservation de la chaîne α invariante du TCR des iNKT et de CD1d au cours de l'évolution, permet une reconnaissance sans barrière d'espèce entre l'humain et la souris (**Figure 4**). En d'autres termes, s'ils expriment CD3 et un TCR-αβ, ce

qui correspond aux caractéristiques de l'immunité acquise, les iNKT ont un répertoire monomorphe ou peu polymorphe, se rapportant à un caractère inné.

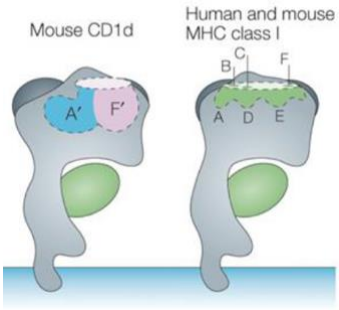


Figure 3 : Structure de la molécule CD1d avec les sites de liaison à l'antigène, en comparaison avec la molécule du CMH de classe I (Moody et al., 2005).

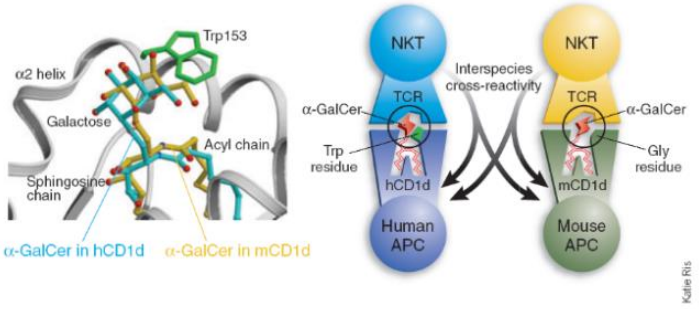


Figure 4 : Les conformations de l'α-GalCer humain et murin se superposent dans le complexe formé avec CD1d. La plasticité du TCR des iNKT permet d'observer une réactivité croisée entre l'humain et la souris, malgré l'orientation différente du galactose (Godfrey et al., 2005).

Outre ce répertoire restreint, les iNKT expriment des marqueurs des NK comme CD16, CD56, CD94 ou NKG2A chez l'humain, ou comme NK1.1, NKG2A, NKG2D et Ly49a chez la souris (Berzins et al., 2011). Ils peuvent être activés indépendamment de leur TCR par l'association IL-12 et IL-18 (Brigl & Brenner, 2010) ou par l'association IL-12 et IL-33 (Bourgeois et al., 2009), entraînant la production d'interféron(IFN)-γ.

Il a été démontré chez la souris que la sélection des iNKT dans le thymus dépend de l'expression de CD1d par les thymocytes immatures au stade DP (pour double positifs), un mode de sélection radicalement différent de celui des LT conventionnels qui sont sélectionnés positivement par les cellules épithéliales thymiques (Bendelac, 1995; Gapin et al., 2001).

Outre les interactions CD1d/ligand du soi (non identifié)/TCR invariant, le processus de sélection des iNKT par les thymocytes DP fait intervenir des interactions homotypiques mettant en jeu des molécules de la famille des SLAM (pour *signaling lymphocyte activation molecule)*. En effet, en l'absence des molécules SLAMF1 et SLAMF6 ou de l'adaptateur SAP (pour *SLAM associated protein*), un blocage précoce de la différenciation des iNKT est observé (Griewank et al., 2007). L'acquisition des caractères innés des iNKT est contrôlée par l'expression du facteur de transcription PLZF (pour *promyelocytic leukemia zinc finger*) qui est exprimé immédiatement après leur sélection positive. Chez la souris déficiente en PLZF, un blocage de la maturation des iNKT et un défaut de leur expansion intrathymique post-sélection sont mis en évidence (Savage et al., 2008). Chez l'humain, l'analyse de l'unique individu décrit avec un déficit en PLZF montre un défaut relatif du nombre d'iNKT et surtout un défaut majeur de la maturation terminale de cette population (Eidson et al., 2011).

Au cours de la sélection positive et à partir de l'acquisition de l'expression de PLZF, il existe une diversification des iNKT murins : les iNKT1 produisent l'IFN-γ et expriment le facteur de transcription T-bet, les iNKT2 qui produisent l'IL-4 et expriment fortement PLZF, les iNKT3 qui expriment l'IL-17 et dont la différenciation dépend du facteur de transcription RORγt (Kim et al., 2015; Lee et al., 2013). De façon remarquable, l'activation de ces différents iNKT peut être induite par des cytokines (signal inné) avec (Duthie et al., 2005; Sada-Ovalle et al., 2008) ou sans (Brigl & Brenner, 2010) stimulation du TCR. Les équipes de Hogquist et de Le Gros ont apporté des arguments convaincants de l'existence d'une « production innée » *in vivo* de l'IL-4 (c'est-à-dire indépendante de la mise en jeu du TCR) (Dickgreber et al., 2012; Lee et al., 2013). Cette production d'IL-4 innée est susceptible d'être associée à la différenciation des lymphocytes T CD8 « Innate-Memory » (cf. introduction partie 2 chapitre 2).

Il est probable que les iNKT post-thymiques puissent être stimulés par des antigènes. Ainsi, il a été démontré que les iNKT murins avaient une variabilité régionale et tissulaire du répertoire, une donnée conciliable avec l'hypothèse selon laquelle le TCR-β des iNKT présents dans un tissu donné soit sélectionné par les ligands spécifiques de ce tissu (Jimeno et al., 2019). De façon remarquable, des expériences d'ablation du TCR des iNKT murins après leur maturation, montrent que ceux-ci, pour peu que l'ablation ait lieu après leur migration dans les tissus lymphoïdes périphériques, survivent et répondent aux *stimuli* innés (Vahl et al., 2013).

Si les fonctions décrites des iNKT sont principalement effectrices, des propriétés régulatrices peuvent aussi leur être attribuées. L'administration d'α-GalCer, qui stimule les iNKT, permet dans plusieurs modèles animaux d'auto-immunité de prévenir le développement de la maladie (diabète de type I, lupus érythémateux disséminé) (Van Kaer, 2005). Chez l'humain, il a été observé que le nombre d'iNKT pouvait être diminué chez des patients souffrant de maladies auto-immunes (Hammond & Kronenberg, 2003). De manière similaire, le nombre d'iNKT circulant est diminué de 34% chez les patients atteints de la maladie de Crohn et de 93% chez ceux atteints de rectocolite hémorragique par rapport aux donneurs sains, avec une diminution de la production de cytokines (Grose et al., 2007). Dans un modèle murin de colite induite, le traitement par le ligand α-GalCer des iNKT réduit les symptômes de la maladie et la mortalité (Saubermann et al., 2000).

Nous ne détaillerons pas toutes les situations où les iNKT interviennent. Néanmoins, nous soulignerons le rôle des iNKT dans des fonctions de maintenance. Chez la souris, la délétion des iNKT est associée à l'apparition de troubles métaboliques, en particulier ceux induits par les régimes enrichis en graisse (Chen et al., 2019). Cette fonction est probablement conservée chez l'humain, comme le suggère l'existence d'un défaut fonctionnel et numérique des iNKT chez les patients obèses, lequel est restauré après une chirurgie bariatrique (Lynch et al., 2015). Les iNKT semblent agir au niveau des tissus adipeux sur le contrôle de la différenciation des macrophages M2. Les fonctions eutrophiques des iNKT murins dans le tissu adipeux comprennent aussi le contrôle de l'état d'activation des NK du tissu adipeux et l'élimination des macrophages M2 dysfonctionnels (Chen et al., 2019).

2. Caractéristiques et fonctions des MAIT

Les MAIT représentent seulement environ 5% des lymphocytes circulants chez l'humain (Godfrey et al., 2015) mais sont particulièrement abondants dans le foie, les poumons ou l'intestin (Legoux et al., 2017).

Ces cellules présentent de nombreux points communs avec les iNKT (**Figure 5**) ; elles expriment notamment un TCR semi-invariant composé d'une chaîne α invariante Vα7.2-Jα33, associée à des chaînes β limitées (Vβ 2, 6, 8 ou 13) (Godfrey et al., 2019). Ce TCR reconnait MR1, une molécule du CMH non classique qui présente des molécules non peptidiques issues du métabolisme de la vitamine B2 des cellules de l'hôte, des levures ou des bactéries (Patel et al., 2013). Leur mode de sélection thymique, étudié chez la souris, est

également similaire à celui des iNKT : il dépend de l'expression de MR1 par les thymocytes DP et de la mise en jeu des interactions homotypiques SLAM/SLAM (Legoux et al., 2019; Seach et al., 2013). Comme pour les iNKT, ces interactions contrôlent l'expression de PLZF dans les MAIT, l'acquisition de leurs caractéristiques de cellules « innées » ainsi que leurs diversifications phénotypique et fonctionnelle (Koay et al., 2016).

Enfin, les MAIT humains expriment des marqueurs des cellules NK : CD16, CD161, NKG2 ou encore CD94. Ils peuvent répondre à un stimulus TCR-dépendant ou TCR-indépendant (IL-12 et IL-18) (Godfrey et al., 2015), produisent des cytokines telles que l'IL-2, l'IFN-γ ou l'IL-17 et comme les iNKT, possèdent un arsenal cytotoxique (Rudak et al., 2018).

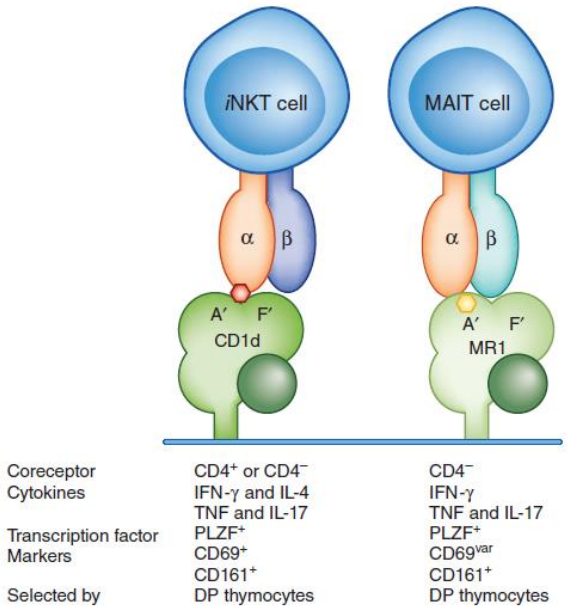


Figure 5 : Points communs entre les MAIT et les iNKT (Kronenberg & Zajonc, 2013).

Si toutes les fonctions des MAIT ne sont pas encore élucidées, on sait désormais que ces cellules sont impliquées dans l'immunité anti-infectieuse. Les MAIT sont notamment activés durant les infections virales aiguës (comme la grippe) ou chroniques (comme l'hépatite C), entraînant une production d'IFN-γ et une surexpression du granzyme B chez l'humain (van Wilgenburg et al., 2016). Les MAIT semblent également impliqués dans la réparation tissulaire. En effet, une analyse transcriptomique des MAIT a révélé, ceci après stimulation du TCR mais pas après stimulation par des cytokines, l'expression de gènes impliqués dans la réparation tissulaire, chez l'humain et la souris (Linehan et al., 2018). Ces données ont pu être

confirmées (Lamichhane et al., 2019; Leng et al., 2019). *In vivo*, chez des souris déficientes en MAIT (MR1-/-), la réparation de lésions cutanée est plus lente que chez les souris WT (pour *wild type* ou sauvage) et cette réparation peut être accélérée par la stimulation préalable du TCR des MAIT (Constantinides et al., 2019) (pour revue (Klenerman et al., 2021)).

3. Caractéristiques et fonctions des LT-γδ

Les LT-γδ possèdent un TCR composé, non pas des chaînes α et β comme les autres LT, mais des chaînes γ et δ. Chez l'humain, ils représentent environ 1 à 5 % des LT circulants et sont aussi localisés dans les épithéliums comme la peau et l'intestin (Godfrey et al., 2015). Les TCR-γδ présentent une diversité plus restreinte que les TCR-αβ avec des modes de reconnaissance de l'antigène et de sélection différents (Rock et al., 1994; Schild et al., 1994; Shin et al., 2005) (pour revue (Jensen & Chien, 2009)).

Une des prédictions du travail de Rock était que le mode de reconnaissance des antigènes par le TCR-γδ serait proche de celui utilisé par les immunoglobulines (Ig), du fait de la longueur de la région CDR3 (région hypervariable des Ig) qui est plutôt stable dans le TCR-αβ mais plus variable dans les Ig et le TCR-γδ (Rock et al., 1994). Cette hypothèse a été confirmée par les travaux de l'équipe de Chien et Davis avec l'analyse de l'interaction entre le TCR-γδ et les molécules du CMH qui, comme pour les Ig, ne sont pas indispensables à la reconnaissance du ligand (Schild et al., 1994).

A cet égard, certains travaux suggèrent l'existence de LT-γδ spécifiques d'haptènes. Ainsi, chez la souris, les LT-γδ s'affranchissent d'une CPA (cellule présentatrice d'antigène, les principales étant les cellules dendritiques (DC)), l'haptène étant reconnu lorsque couplé à une protéine porteuse. Il s'agit donc fondamentalement d'un mode de reconnaissance commun avec celui des Ig (Zeng et al., 2014). De même, chez l'humain, les LT-γδ Vγ4 semblent reconnaître l'antigène de façon similaire à celle des domaines variables des chaînes lourdes et légères des Ig, comme c'est le cas pour la reconnaissance d'EPCR (pour *endothelial protein C receptor*), une molécule qui partage une forte homologie de séquence et de structure avec les molécules du CMH de classe Ib non classique et qui est capable (comme CD1d) de présenter des lipides. Cependant, les LT-γδ Vγ4 peuvent interagir avec EPCR indépendamment de la présence de lipides, d'une manière similaire aux Ig (Willcox et al., 2012).

Des LT-γδ humains spécifiques de MR1 et de CD1d (molécules du CMH classe Ib non classiques) ont par ailleurs été décrits. Il est à noter que parmi ceux reconnaissant MR1, près d'un tiers reconnait le domaine α3 de MR1, soit un mode de reconnaissance indépendant de l'antigène (présent dans le sillon formé par les domaines α1 et α2) (Le Nours 2019) et plutôt proche de celui décrit pour la reconnaissance de l'EPCR (Willcox et al., 2012).

Les LT-γδ sanguins humains utilisent en majorité Vδ2 apparié à Vγ9, ces cellules étant activables *in vivo* et *in vitro* par des métabolites de la voie de synthèse des isoprénoïdes, l'isopentenyl-pyrophosphate, le farnesyl-pyrophosphate ou des analogues synthétiques tels que le bromohydrine-pyrophosphate. L'activation induite par ces phospho-antigènes n'implique cependant pas seulement la cellule et le phospho-antigène mais requiert un signal supplémentaire (pour revue (Born et al., 2013)). Ce sont des molécules appartenant à la famille des butyrophilines (BTN) qui peuvent apporter ce signal. Celles-ci sont apparentées à la famille des molécules de costimulation B7 (les principales étant CD80 et CD86 portées par les CPA) et, parmi elles, ce sont les butyrophilines BTN3A1 et BTN2A1 qui sont reconnues par le TCR-Vγ9-Vδ2. Les phospho-antigènes produits par des cellules tumorales ou des agents pathogènes vont pénétrer dans les cellules puis se lier aux domaines intracellulaires de BTN3A et BTN2A, induisant des modifications de leur conformation et permettant ainsi leur reconnaissance par le TCR-Vγ9Vδ2 (Harly et al., 2012; Rigau et al., 2020). En ce sens, le terme « historique » de phospho-antigènes n'est pas exact, ceux-ci n'étant par définition pas des antigènes puisqu'ils ne sont pas reconnus directement par le TCR des LT-γδ.

De nombreuses autres populations de LT-γδ, chez la souris et chez l'humain portent des TCR spécifiques de molécules de la famille des butyrophilines. Ainsi, chez la souris, certains TCR des LT-γδ de la peau, communément dénommés DETC (pour *dendritic epidermal T cell*), reconnaissent Skint1 (Barbee et al., 2011). C'est aussi le cas des LT-γδ de l'intestin humain qui sont activés par BTNL3/8 (Vantourout et al., 2018). Un point important est le fait que la reconnaissance des butyrophilines par ces TCR-γδ met dans la plupart des cas en jeu une région située dans la troisième région charpente (Framework ou FR) du domaine Vγ, aussi dénommée HV4. Dans les LT-αβ conventionnels, cette région HV4 est impliquée dans l'interaction avec les super-antigènes bactériens ou viraux. La reconnaissance des butyrophilines par les LT-γδ ressemble donc à celle d'un super-antigène, indépendamment de la spécificité du TCR. C'est ainsi que le couple BTNL3/8 est capable d'activer une lignée T-

γδ humaine spécifique d'un sulfatide présenté par CD1d et d'engager le TCR-γδ spécifique de l'EPCR (Melandri et al., 2018; Willcox et al., 2019).

En résumé, le répertoire des LT-γδ a un fort caractère inné, du fait de TCR pouvant être invariants et permettant la reconnaissance de déterminants conservés, mais aussi du fait de TCR pouvant être activés par des butyrophilines qui se comportent comme des molécules « superantigènes-like » entraînant une activation rapide et intense d'un pool de LT-γδ.

Chez l'humain, les LT-γδ expriment également des récepteurs caractéristiques des NK de l'immunité innée, comme les KIR (pour *killer-cell immunoglobulin-like receptors*) (KIR2D, KIR3D) ou les récepteurs de type lectine : CD94/NKG2A-C et NKG2D (Chien et al., 2014; Halary et al., 1997). De ce point de vue, les LT-γδ humains peuvent être activés, proliférer et produire l'IFN-γ en réponse à la stimulation de NKG2D par ses ligands MICA/B (Das et al., 2001). Cette production d'IFN-γ se fait, comme dans les LT-αβ, sous le contrôle des facteurs de transcription T-bet et Eomesodermine (Eomes) (Chen et al., 2007). De façon similaire aux iNKT, une grande partie des LT-γδ expriment le facteur de transcription PLZF, chez la souris comme chez l'humain (Chien et al., 2014). L'expression de PLZF et son lien avec la notion d'*innateness* seront traités dans le chapitre suivant. Ils possèdent également un arsenal cytotoxique comprenant des granzymes (Spencer et al., 2013) et la perforine (Dieli et al., 2001) et sont par là-même cytotoxiques dans différents modèles. Tant chez l'humain que chez la souris, ils sont producteurs non seulement d'IFN-γ mais aussi d'IL-17 (Jensen et al., 2008).

Les LT-γδ semblent également capables de produire des cytokines suppressives telles que l'IL-10 et le TGF-β (pour *transforming growth factor*), comme cela a été observé pour des LT-γδ infiltrant des tumeurs mammaires murines (Seo et al., 1999). Ces propriétés suppressives ont pu être induites *in vitro* en réponse au TGF-β (Kang et al., 2009). Les LT-γδ exprimant CD39 semblent être particulièrement suppressifs *in vitro* (Otsuka 2013) et *in vivo* dans des tumeurs colorectales humaines. Les mécanismes mis en jeu semblent très similaires à ceux des lymphocytes T régulateurs (Treg) (décrits dans la partie 3 de cette introduction). En effet, ces LT-γδ CD39(+) intra-tumoraux expriment FoxP3, CTLA-4 et CD73, produisent des cytokines régulatrices et sont capables d'inhiber *in vitro* la prolifération des LT. Le produit des réactions enzymatiques du couple CD39/CD73 est l'adénosine, indispensable à cet effet suppresseur, le blocage *in vitro* des récepteurs de l'adénosine inhibant cette fonction (Hu et al., 2017) (pour revue (Peters et al., 2018)).

Enfin, cette population exprime aussi des transcrits de gènes susceptibles d'être impliqués dans les phénomènes de réparation (Tieppo et al., 2020). Ces LT-γδ, à l'image des DETC, présentent un répertoire invariant et ont des fonctions anti-infectieuses ou anti-tumorales, mais aussi des fonctions de maintien. Ainsi, il a été montré que les DETC chez la souris, ou leurs équivalents présumés LT-αβ et γδ-Vδ1 de la peau chez l'humain, jouent un rôle important dans la cicatrisation cutanée, en particulier par la production de facteurs de croissance, tels que l'IGF-1 (pour *insulin-like growth factor*) ou le KGF (pour *keratinocyte growth factor*) (Havran & Jameson, 2010).

4. Caractéristiques et fonctions des NK : des cellules de l'immunité naturelle ?

Si les NK sont traditionnellement classés parmi les cellules de l'immunité innée, elles peuvent aussi présenter des caractéristiques de l'immunité acquise, questionnant ce classement.

Les NK sont des cellules lymphoïdes cytotoxiques spécialisées dans la lyse des cellules infectées ou anormales. Les NK reconnaissent les molécules du CMH de classe I exprimées à la surface des cellules de l'organisme, ceci grâce à différents types de récepteurs de surface qui peuvent inhiber leurs fonctions. Si les molécules du CMH de classe I sont absentes ou anormales, le signal inhibiteur n'est pas transmis et les NK sont activés, provoquant la mort de la cellule. Ce mécanisme permet la détection des virus ou des bactéries qui n'expriment pas les molécules du CMH ou encore des cellules tumorales, qui peuvent sous-exprimer les molécules du CMH. Les NK expriment aussi des récepteurs activateurs, lesquels reconnaissent des molécules d'origine microbienne ou des molécules de stress pouvant être induites par l'infection ou par le processus de transformation tumorale (Espinosa & Chillet, 2010).

Ces récepteurs inhibiteurs et activateurs sont organisés en plusieurs familles (López-Botet et al., 2000; Sivori et al., 2014). La famille des NCR (pour *natural cytotoxicity receptor*), composée de NKp44, NKp46 et NKp30, reconnaît les molécules de stress ou d'origine virale. Les récepteurs de la famille des ILT (pour *immunoglobulin-like transcript*) reconnaissent les molécules du CMH de classe I. Les récepteurs de la famille des KIR (pour *killer-cell immunoglobulin-like receptors*) peuvent être soit activateurs soit inhibiteurs. Les récepteurs de la famille des lectines peuvent être soit activateurs soit inhibiteurs en fonction de la chaine NKG2 associée (A et B sont inhibiteurs, C, D, E sont activateurs). En fonction de l'ensemble des différents signaux reçus, les NK seront activés ou inhibés (**Figure 6**).

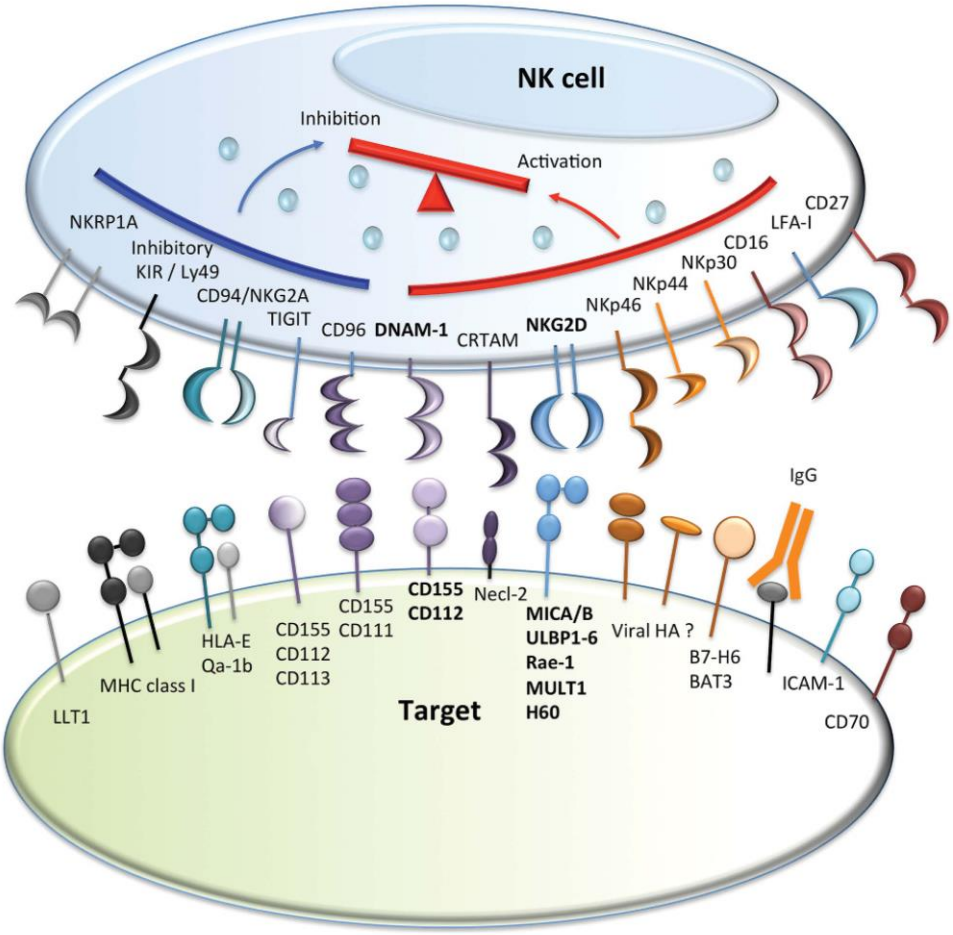


Figure 6 : Les récepteurs à la surface des NK et leurs cibles, régulant la balance activation/inhibition de ces cellules (Chan et al., 2014).

Les NK peuvent également être activés par un mécanisme indirect mettant en jeu les anticorps dénommé ADCC (pour *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). Les anticorps sont produits lors de la réponse immunitaire acquise et sont spécifiques d'un antigène. La partie variable de l'anticorps se fixe sur l'antigène tandis que la partie constante est reconnue par le CD16 à la surface de la cellule NK, ce qui entraîne son activation et la lyse de la cellule cible. Suite à leur activation, les NK, d'une part libèrent des granules contenant de la perforine et du granzyme entraînant la mort de la cellule cible, et d'autre part sécrètent des cytokines qui favoriseront l'action d'autres types cellulaires. Ils sont également capables d'induire la mort cellulaire par l'intermédiaire de récepteurs de mort (pour revue (Prager & Watzl, 2019).

Par ailleurs, les NK de la souris sont capables de produire des réponses de type régulatrices en diminuant l'ampleur de la réponse T spécifique au cours d'une réponse immunitaire

antivirale, ceci en éliminant les LT CD4 (Waggoner et al., 2011) et les LT CD8 (Crouse et al., 2014; Xu et al., 2014). Ce phénomène de rétrocontrôle négatif dépendant des NK évite ou diminue le risque de complications immuno-inflammatoires liées à l'intensité de la réponse immunitaire (Waggoner et al., 2011). Chez l'humain, une petite fraction des NK circulantes est capable de sécréter l'IL-10, associée aux fonctions régulatrices. Après stimulation par la PHA (phytohemagglutinine), environ un tiers des NK exprimant des récepteurs KIR inhibiteurs (CD158a/KIR3DL1 ou CD158b/KIR3DL2/3) sont capables de produire l'IL-10. Cette fraction représente une sous-population à part, puisque les NK sécrétant l'IL-10 ne sécrètent pas l'IFN-γ et inversement. Ces deux sous-populations représentent respectivement de 2 à 9 % et 61 à 89 % des cellules NK. *In vitro*, les NK sécrétant l'IL-10 sont capables d'inhiber la croissance de LT CD4 (Deniz et al., 2008). Une autre sous-population de NK, définie par une expression élevée de CD56, possède des propriétés régulatrices, lesquelles sont altérées chez les patients atteints de sclérose en plaque (Laroni 2016).

Les NK sont également impliqués dans la grossesse et représentent alors 70% des lymphocytes utérins humains ; ils ont des fonctions eutrophiques et régulatrices, comme l'illustre leur rôle dans le contrôle de l'hématopoïèse (Murphy et al., 1995) ou dans le maintien de la trophicité et de la bonne maturation des artères spiralées de la caduque et du placenta (pour revue (Jabrane-Ferrat, 2019)).

Cependant, si les NK sont traditionnellement considérés comme appartenant à l'immunité innée, il a récemment été rapporté qu'ils pouvaient se comporter comme des cellules mémoires. Ainsi, les NK « mémoires » présentent des caractéristiques attribuées à l'immunité adaptative comme une réponse mémoire à long terme et une possible spécificité d'antigène (Geiger & Sun, 2016; Min-Oo et al., 2013; Paust et al., 2017). De telles cellules peuvent être générées chez la souris après vaccination ou infection par MCMV (pour *murine cytomegalovirus*) (Arase et al., 2002; O'Leary et al., 2006). Elles sont alors capables de proliférer puis de résider dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes pendant plusieurs mois après une phase de contraction (rappelant les phases d'expansion clonale, de contraction et de différenciation mémoire des lymphocytes conventionnels B et T). La protection contre un pathogène donné peut être transférée à des animaux naïfs auxquels on transfert les NK mémoires spécifiques du pathogène. Au moment de la réaction secondaire, les NK mémoires libèrent rapidement granules cytotoxiques et cytokines (Sun et al., 2009). De tels NK « mémoires » spécifiques d'antigène ont été observés chez l'humain infecté par le CMV (pour

cytomegalovirus) (Lopez-Vergès et al., 2011), même si la durée de vie de ces cellules n'est pas encore établie. Chez la souris, des NK « mémoires » ont été détectés 4 à 5 mois après la stimulation (Sun et al., 2009). Chez l'humain, la revaccination par le BCG (pour *bacillus* de Calmette et Guerin, utilisé dans le vaccin contre la tuberculose) active une réponse secondaire, qui reste détectable après un an (Suliman et al., 2016). Les processus de différenciation des NK « mémoires » sont encore peu connus. Cependant, les cytokines inflammatoires semblent jouer un rôle important (*via* l'activation de l'inflammasome) (van den Boorn et al., 2016) tout comme la reprogrammation épigénétique. Ce type d'analyse a révélé qu'après infection par le CMV chez l'humain, les profils de méthylation de l'ADN des NK « mémoires » et des LT CD8 cytotoxiques sont similaires, alors qu'ils diffèrent de ceux des NK canoniques (Schlums et al., 2015). Le développement des NK « mémoires » pourrait être lié à la répression épigénétique de certains facteurs de transcription ou protéines de signalisation (comme Syk) normalement exprimés par les NK (Lee, Zhang, et al., 2015).

Chapitre 3 : Le concept de gradient d'*innateness*

Récemment, l'équipe de P. Brenner s'est intéressée aux différentes populations cellulaires présentant des caractéristiques à la fois innées et adaptatives et, sur la base d'analyses transcriptomiques, a cherché à identifier une signature phénotypique et fonctionnelle de ces cellules et à les classer en fonction de leur caractère plus ou moins inné ; les LT CD4 étant les moins innés et les NK les plus innés (Gutierrez-Arcelus et al., 2019).

Ce gradient d'*innateness* repose sur l'expression de facteurs de transcription associés à ce caractère inné, un profil de fonctions effectrices indépendantes de la signalisation du TCR, un taux élevé d'ARNm préformé permettant une expression rapide des protéines impliquées dans les fonctions effectrices (comme l'IFN-γ), une capacité prolifératives plus faible que les LT conventionnels (qui expriment fortement les gènes impliqués dans la machinerie transcriptionnelle), une plus grande sensibilité à l'IL-15 (en particulier dans le maintien de la prolifération homéostatique) et un profil métabolique faiblement oxydatif.

Ainsi, entre les LT CD4 et les NK, les populations cellulaires sont classées en un gradient croissant d'*innateness* : les LT CD4 puis les CD8, les MAIT, les iNKT, les LT-γδ (δ1 puis δ2), et enfin, les NK. Parmi les critères qui permettent de situer les cellules dans le gradient, les récepteurs KIR et le facteur de transcription PLZF sont très fortement associé à

l'*innateness*. Du point de vue fonctionnel, les principales caractéristiques sont une faible capacité prolifération (évaluée par la quantité du précurseur 47S des ARNr associé aux propriétés adaptatives) et la production d'IFN-γ en réponse à la stimulation IL-12/IL-18 (**Figure 7**).

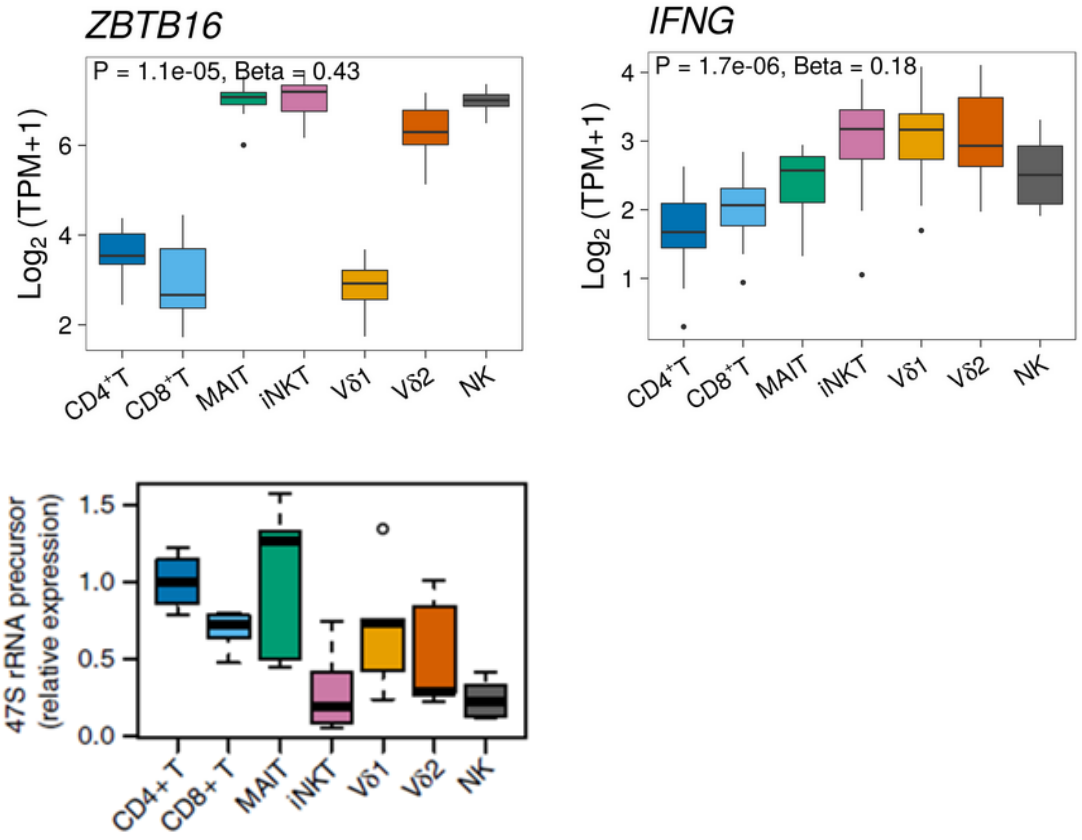


Figure 7 : Expression de l'ARNm codant PLFZ (ZBTB16), l'IFN-γ et de l'ARNr 47S (marqueur de la biogénèse ribosomale) à l'état basal dans les différents LT conventionnels et non conventionnels du gradient d'*innateness* (Gutierrez-Arcelus et al., 2019).

Deuxième partie. Les lymphocytes T CD8 innés

Si les iNKT, les LT-γδ et les MAIT sont des populations cellulaires relativement connues, il existe une quatrième population de LT non conventionnels : les LT CD8 innés. Ceux-ci ont été décrits pour la première fois dans les années 2000 dans plusieurs modèles de souris transgéniques. Ces cellules sont considérées comme des LT non conventionnels puisqu'elles présentent des caractéristiques similaires aux LT CD8 mémoires conventionnels et aux NK et qu'elles sont capables de se développer et d'exercer des fonctions indépendamment d'une stimulation antigénique.

Chapitre 1 : Mise en évidence des LT CD8 innés IM chez la souris

1. Les souris déficientes en Itk ou Rlk

Itk et Rlk sont des tyrosines kinases de la famille Tec impliquées dans la transduction du signal TCR (Andreotti et al., 2010; Prince et al., 2009). Elles sont activées par Lck et contribuent à l'activation de Erk et de la voie des MAP Kinases (L. J. Berg et al., 2005).

Chez les souris déficientes en Itk (Itk-/-), le nombre de thymocytes totaux n'est pas modifié. En revanche, en présence d'une stimulation antigénique, les LT sont peu activés et ne prolifèrent pas (Liao & Littman, 1995). On observe chez les souris déficientes en Itk et/ou Rlk (Itk-/- et Itk-/-Rlk-/-) des altérations de la différenciation des LT, avec notamment un défaut de la sélection thymique positive entraînant une diminution du nombre de thymocytes simple-positifs (SP) CD4(+). En périphérie, après stimulation antigénique des LT, il a été montré que cette mutation est associée à une altération de la mobilisation du calcium extracellulaire impliqué dans la transduction du signal TCR (Schaeffer et al., 2000).

Au contraire, le nombre et la fréquence des thymocytes SP CD8(+) ainsi que des LT CD8 en périphérie (ganglions lymphatiques, sang et rate) sont augmentés chez les souris Itk-/- et Itk-/-Rlk-/- par rapport aux souris WT. Le nombre de thymocytes SP CD8(+) est multiplié par trois par rapport aux souris WT (Atherly et al., 2006; Hu et al., 2007).

Mais ces cellules présentent un phénotype distinct de celui des thymocytes SP CD8(+) provenant des souris WT puisqu'ils expriment NK1.1 (un marqueur des NK de la souris) ainsi que des marqueurs de LT mémoires ou activés comme CD122 (la chaîne β commune des récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-15) et CD44 (un marqueur des LT mémoires murins) (Atherly

et al., 2006; Broussard et al., 2006; Hu et al., 2007). Ces cellules murines ont donc été logiquement dénommées IM (pour inné/mémoire). A ces caractéristiques est également associée une augmentation de l'expression du facteur de transcription Eomes. Cependant, les thymocytes IM n'expriment pas les marqueurs d'activation CD25 et CD69, rappelant le phénotype des LT CD8 mémoires localisés en périphérie. Ces cellules expriment un TCR-αβ, écartant l'hypothèse des LT particuliers exprimant un TCR-γδ ou un TCR-αα. Ces souris sont donc presque dénuées de LT CD8 naïfs (Atherly et al., 2006). De plus, l'expression diminuée de CD24 est conciliable avec un état plus mature des thymocytes des souris Itk-/- et Itk-/-Rlk-/- comparativement aux thymocytes des souris WT (Broussard et al., 2006).

Ces thymocytes de phénotype IM chez les souris Itk-/- sont détectables dès le 4ème jour après la naissance dans le thymus et une à deux semaines après la naissance en périphérie. De plus, des expériences de chimérisme, impliquant le transfert de moelle osseuse de souris Itk-/- et Rlk-/-Itk-/- à des animaux WT irradiés, montrent une reconstitution rapide du compartiment thymique SP CD8(+) IM. Les altérations observées ne sont donc pas liées à des anomalies dans les cellules non-hématopoïétiques des souris mutées (Atherly et al., 2006; Broussard et al., 2006). Les LT CD8 périphériques issus de souris Itk-/- et Rlk-/-Itk-/- ne présentent pas de prolifération excessive qui expliquerait leur accumulation, pas plus qu'une signature de localisation/résidence dans le thymus (Atherly et al., 2006; Broussard et al., 2006; Hu et al., 2007). Ces cellules particulières sont donc produites dans le thymus des souris Itk-/- et Rlk-/-Itk-/- puis migrent en périphérie, ce qui est confirmé par la culture *in vitro* de cellules thymiques fœtales de souris Rlk-/-Itk-/- (Broussard et al., 2006). De plus, comme les LT CD8 mémoires, les thymocytes SP CD8(+) issus des souris Itk-/- et Itk-/-Rlk-/- ont la capacité de surexprimer Bcl-xL en réponse à l'IL-15, augmentant leur survie (Atherly et al., 2006).

Etant donné que l'activation de Erk est altérée chez les souris Itk-/-, des expériences de croissement de cette souche avec une souche exprimant l'allèle hypersensible de Erk2 ont été réalisées. Les souris issues de ce croisement présentent un profil thymique partiellement corrigé, les thymocytes SP CD8 présentant une expression de CD122 et CD44 diminuée (4 à 5% des LT CD8 WT sont CD122(+) et CD44(+) *versus* 65% des LT CD8 Itk-/- *versus* 31% des LT CD8 où l'allèle Erk2 hypersensible est exprimé par la souche Itk-/-). Dans cette expérience, la restauration de la transduction du signal TCR entraîne donc un développement partiellement corrigé des LT CD8 (Broussard et al., 2006).

2. Les souris déficiences en Klf2

KLF2 (pour *kruppel-like factor 2*) est un facteur de transcription qui régule la migration des LT et pourrait réprimer l'expression de certains récepteurs de chimiokines. Chez des souris dont les cellules hématopoïétiques sont déficientes en KLF2, le développement des LT est normal mais le nombre de LT est fortement réduit en périphérie puisque leur migration hors du thymus est altérée.

Dans ce modèle, on observe la présence LT CD8 exprimant le même phénotype inné/mémoire que celui des LT issus des souris déficientes en Itk et Rlk : une expression augmentée de CD44, CD122 et d'Eomes, une absence d'expression de CD25 et CD69 et une expression diminuée de CD24.

De plus, ces cellules expriment fortement le récepteur CXCR3 de chimiokines. Cependant, cette surexpression n'a pas lieu lorsque les LT sont déficients en Eomes ou IL-4Rα. On observe dans ce modèle une surproduction d'IL-4 qui entraîne l'expression de CXCR3, qui est également un marqueur des LT mémoires chez la souris (Weinreich et al., 2010). L'effet de l'IL-4 sur les LT CD8 IM sera détaillé dans le chapitre 2, sous chapitre 3 de cette partie.

3. Autres modèles murins

On retrouve des LT CD8 exprimant ce phénotype IM dans plusieurs autres modèles murins :

- dans un modèle de souris déficientes en Id3 (pour *inhibitor of differentiation* ou *inhibitor of DNA binding*), qui est un facteur de transcription induit par la voie Erk lors de la signalisation TCR des LT (Verykokakis et al., 2010),

- dans un modèle de souris déficientes en CBP (pour *CREB binding protein*), protéine impliquée dans la co-activation transcriptionnelle de nombreux facteurs de transcription (Fukuyama et al., 2009),

- dans un modèle de souris mutées pour SLP76 (pour *Src homology 2 domain-containing leucocyte protein 76 kDa*) avec la mutation ponctuelle par substitution Y145F, une molécule adaptatrice de la transduction du signal TCR (Gordon et al., 2011).

4. Caractéristiques fonctionnelles des LT CD8 IM

Après stimulation (par PMA (pour *phorbol myristate acetate*) et ionomycine (PMA/iono)), les thymocytes IM et/ou les LT CD8 périphériques IM issus des cinq modèles murins

précédemment décrits sont capables de produire l'IFN-γ, comme les LT CD8 mémoires périphériques conventionnels. Cependant, la fréquence de cellules produisant l'IFN-γ est supérieure chez les souris mutées, comparativement aux souris WT, avec une augmentation de l'ordre d'un facteur 8 dans le modèle CBP-/- par exemple (Atherly et al., 2006; Broussard et al., 2006; Fukuyama et al., 2009; Gordon et al., 2011; Verykokakis et al., 2010; Weinreich et al., 2010).

En utilisant la combinaison d'IL-12 et d'IL-18, que l'on peut considérer comme un mode de stimulation pro-inflammatoire de type inné, les LT CD8 IM issus des modèles murins Itk-/- et KLF2-/- sont aussi capables de produire l'IFN-γ (Hu et al., 2007; Weinreich et al., 2010). Pour produire l'IFN-γ de façon rapide, les cellules IM possèdent un ARNm préformé codant l'IFN-γ à l'état basal, ce qui confirme leur caractère inné (Hu et al., 2007).

L'IFN-γ peut également être produit en réponse à d'autres *stimuli*, comme le LPS (pour lipopolysaccharide), permettant de protéger de l'infection bactérienne. Les auteurs supposent que la fréquence et le nombre plus élevés de LT CD8 IM présents dans la souche Itk-/- permettent une plus grande production d'IFN-γ. En effet, on observe une production d'IFN-γ par les LT CD8 IM des deux souches sauvage et mutée après 24h d'infection à *L. monocytogenes*. Pour déterminer l'importance respective des LT CD8 conventionnels et des LT CD8 IM dans la sécrétion d'IFN-γ, les auteurs ont réalisé un transfert de LT CD8 provenant de souris WT ou Itk-/- à des souris IFN-γ-/- (ne pouvant pas réduire l'infection bactérienne à *L. monocytogenes*). Après 3 jours d'infection (avant que la réponse primaire adaptative soit pleinement efficace), on observe une clairance bactérienne importante dans la condition où des LT CD8 Itk-/- ont été transférés, alors que dans la condition où l'on a transféré des LT CD8 WT, la quantité de bactéries intra-splénique n'est pas significativement différente de la condition sans transfert. Ces expériences montrent donc que les LT CD8 IM possèdent des fonctions innées en réponse à une infection bactérienne (Hu et al., 2007).

Dans plusieurs de ces travaux, les auteurs font également mention de la présence d'ARNm codant la perforine au sein des thymocytes IM murins, suggérant une autre fonction de type innée portée par ces cellules (Fukuyama et al., 2009; Gordon et al., 2011).

5. Des LT CD8 IM présents chez les souris WT

Si dans différents modèles murins génétiquement modifiés, les LT CD8 IM sont une population majoritaire dans le thymus et/ou les organes lymphoïdes secondaires, il est important de noter qu'ils « pré-existent » chez les souris WT, bien qu'à des fréquences plus faibles. Par exemple, Weinreich observe qu'environ 2% des thymocytes SP CD8(+) sont des cellules IM dans le fond génétique C57Bl/6 WT et que cette fréquence est d'environ 16% dans le fond génétique BALB/c WT (Weinreich et al., 2010). Concernant les splénocytes, il a été décrit des cellules exprimant CD122 et CD44(high) et décrites, de façon intéressante, comme produisant l'IFN-γ en réponse à la stimulation PMA/iono à des fréquences plus élevées que leurs équivalents thymocytes IM (Atherly et al., 2006).

6. Sélection des LT CD8 IM

6.1. La sélection thymique

Les LT conventionnels sont sélectionnés par des molécules du CMH exprimées par l'épithélium thymique.

Pour identifier les mécanismes de sélection des LT CD8 IM, Broussard et ses collaborateurs ont réalisé des expériences de transfert de moelle osseuse de souris Itk-/- ou Itk-/-Rlk-/- à des souris irradiées et délétées génétiquement de la beta-2 microglobuline (B2m-/-), un composant monomorphe commun à l'ensemble des molécules du CMH de classe I. Ces dernières ne développent donc pas de LT CD8 matures en raison de la non-expression de molécules du CMH de classe I dans l'épithélium thymique. Dans ce modèle, le transfert de moelle osseuse de souris WT ne permet la production, comme prévu, que d'un très faible nombre de LT CD8 matures tandis que celui de moelle osseuse de souris Itk-/- ou Itk-/-Rlk-/- permet la production de thymocytes CD8 SP matures (car exprimant à un niveau élevé le TCR ou TCR(high)). Il semble donc que la sélection thymique des LT CD8 IM ne soit pas dépendante des molécules du CMH de classe I exprimées par des cellules non-hématopoïétiques. On peut donc supposer qu'ils soient sélectionnés grâce à des molécules du CMH de classe II, c'est pourquoi les auteurs ont répété ces expériences en transférant de la moelle osseuse de souris WT ou Itk-/-Rlk-/- à des souris B2m-/-H2-Ab1-/- irradiées (donc déficientes en molécules à la fois du CMH de classe I et II). La moelle osseuse de souris WT, comme attendu, ne permet la production d'aucun (ou de très peu de) LT CD8 et LT CD4.

Mais de façon surprenante, la moelle osseuse de souris Itk-/- et Itk-/-Rlk-/- entraîne la production des mêmes thymocytes SP CD8 matures et de phénotype IM, montrant que la sélection des LT CD8 IM est non dépendante des molécules classiques du CMH et suggérant par là même que la sélection de ces cellules puisse être indépendante du stroma thymique. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que les molécules du CMH de sélection pouvaient être exprimées par des cellules d'origine hématopoïétique. Ils ont croisé des souris Itk-/- ou Itk-/-Rlk-/- et des souris B2m-/- afin de disposer d'un modèle de souris dont les cellules hématopoïétiques n'expriment pas les molécules du CMH de classe I. Dans cette nouvelle souche, on observe un très faible nombre de thymocytes SP CD8 matures, suggérant que les LT CD8 IM sont sélectionnés par les molécules du CMH de classe I, exprimées non pas par le thymus mais par des cellules d'origine hématopoïétique (Broussard et al., 2006)

Les auteurs ont également montré que les LT CD8 IM sont présents chez des souris Itk-/- dépourvues de molécules classiques du CMH I (Kb-/-Db-/-) qui interviennent dans la sélection des LT CD8 conventionnels. Cependant, leur nombre est réduit de deux tiers par rapport aux souris simplement Itk-/-. Cela suggère que deux tiers des LT CD8 IM sont restreints par les molécules du CMH I classique et un tiers par les molécules du CMH I non classique (Broussard et al., 2006).

6.2. La sélection par des antigènes du soi ?

Dans le modèle où les souris transgéniques possèdent un TCR dirigé contre l'antigène H-Y et sont déficientes en Itk, les auteurs ont montré que le répertoire des LT CD8 IM n'était pas auto-réactif (Schaeffer et al., 2000). En effet, dans ce modèle, le TCR transgénique anti-H-Y ou anti-mâle (reconnaissant un épitope de l'antigène de transplantation H-Y qui n'est exprimé que par les souris mâles) n'est pas censé être sélectionné car auto-réactif, là où il peut être sélectionné chez les femelles, qui n'expriment pas cet antigène H-Y. Or, les souris mâles WT et Itk-/- Rlk-/- présentent le même profil de délétion (90%) des thymocytes TCR-H-Y (Broussard et al., 2006).

D'autres études dans le modèle TCR-anti-H-Y dans un fond sauvage montrent la présence chez les souris mâles de LT CD8 exprimant ce TCR transgénique (donc ayant passé les étapes de sélection positive et négative) dans le thymus, la rate et les ganglions lymphatiques. Cependant, le seuil d'activation de ces cellules est plus élevé que celui des LT naïfs. De façon intéressante, ces cellules auto-réactives expriment les marqueurs utilisés pour identifier les LT

CD8 IM : CD44, CD122 et des marqueurs NK tels que CD94 ou CD49b (Dhanji et al., 2004). Ces cellules ont la capacité de produire l'IFN-γ, le TNF-α (pour *tumor necrosis factor*) ou le granzyme B et jouent un rôle protecteur contre l'infection à *Listeria monocytogenes* (Dhanji et al., 2006).

Ces données suggèrent donc que les LT CD8 IM pourraient avoir un répertoire auto-réactif, avec cependant un seuil d'activation élevé, tout en exerçant leurs fonctions innées.

Chapitre 2 : Différenciation des LT CD8 IM chez la souris

1. Le rôle essentiel de l'IL-15

L'analyse des souris Itk-/-IL-15-/- a démontré que les LT CD8 ayant un phénotype inné/mémoire (CD44(high) CD122(+) Eomes(+)) sont dépendant de l'IL-15 pour leur accumulation dans le thymus et leur maintien en périphérie.

En effet, chez des souris Itk-/- et IL-15-/-, le pourcentage et le nombre absolu de thymocytes SP CD8(+) est diminué, revenant à un niveau comparable à celui des souris WT. Le profil d'expression de CD44 est également similaire aux souris WT. En périphérie, il n'y a que très peu de LT CD8 (le nombre absolu de cellules est divisé par 23 par rapport aux souris WT). Le développement des LT CD8 en l'absence d'Itk est donc fortement dépendant de l'IL-15 pour son maintien dans les organes lymphoïdes secondaires (Atherly et al., 2006).

Il a été proposé que l'IL-15 agit comme inhibiteur de l'apoptose des LT CD8 CD44(high), comme l'atteste son action *in vitro* avec un nombre de cellules en apoptose diminué de 50% et aucune prolifération associée. Dans ces conditions, on observe une expression augmentée des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (Atherly et al., 2006).

2. Le rôle essentiel d'Eomesodermine (Eomes)

Lors de la différenciation des LT CD8 mémoires conventionnels, Eomes et T-bet, tous deux membres de la famille des facteurs de transcription T-box, agissent en coopération. Ils ont pour cible, entre autres, le gène codant CD122, dont nous venons de montrer l'importance dans l'homéostasie des LT CD8 IM. Ces deux facteurs de transcription ne sont cependant pas totalement redondants, même s'ils sont tous les deux impliqués dans l'expression de l'IFN-γ (Intlekofer et al., 2005; Pearce et al., 2003).

Le facteur de transcription Eomes est habituellement induit pendant la différenciation des LT CD8 naïfs en effecteur cytolytiques et est associé avec la fonction CD8 effectrice, notamment la production d'IFN-γ. Etant donné que les thymocytes SP CD8(+) et les LT CD8 périphériques des souris Itk-/- et Rlk-/-Itk-/- sont capables de produire l'IFN-γ après stimulation (PMA/iono et IL-12/IL-18), les chercheurs ont suggéré que ces thymocytes pouvaient exprimer un programme génétique similaire à celui des LT CD8 effecteurs conventionnels et se sont donc intéressés à Eomes et T-bet. Dans les thymocytes des souris WT, aux différents stades de différenciation, l'ARNm d'Eomes est faiblement exprimé. En revanche, chez les souris Itk-/- et Rlk-/-Itk-/-, on observe une augmentation de l'expression d'Eomes dans les thymocytes DP au moment de la sélection positive (augmentation d'un facteur 16 par rapport aux souris WT). Cette augmentation est encore plus intense une fois les cellules engagées dans le lignage SP CD8(+) (augmentation d'un facteur 20 à 50 par rapport aux souris WT) (Atherly et al., 2006). Dans le modèle murin KLF2, les LT CD8 IM expriment fortement Eomes (Weinreich et al., 2010) ainsi que dans les modèles Id3-/- (Verykokakis et al., 2010) et CBP-/- (Fukuyama et al., 2009).

Le rôle essentiel d'Eomes dans la différenciation des LT CD8 IM est confirmé par l'absence de cette population cellulaire lorsque les souris sont déficientes en Eomes (Sosinowski et al., 2013).

L'un des gènes cibles d'Eomes est le gène codant Bcl-2 (protéine anti-apoptotique), lequel joue un rôle déterminant dans la longue durée de vie des LT CD8 mémoires conventionnels. En effet, en l'absence d'expression d'Eomes, les LT CD8 mémoires ont une réponse d'amplitude et de durée diminuées (Zhou et al., 2010). Cela renforce l'expression de Bcl-2 associée à la signalisation du récepteur de l'IL-15, essentiel au développement et au maintien des LT CD8 IM.

T-bet, également impliqué dans la formation des LT CD8 cytotoxiques et dans la production d'IFN-γ, est très faiblement exprimé par les LT CD8 IM thymiques dans les modèles murins Itk-/- et Rlk-/-Itk-/- (Atherly et al., 2006), KLF2-/- (Weinreich et al., 2010), bien qu'il soit exprimé dans la rate à des niveaux équivalents aux LT CD8 mémoires conventionnels des souris WT (Hu et al., 2007; Weinreich et al., 2010).

La reprogrammation des thymocytes vers un phénotype IM est secondaire au recrutement d'Eomes et passe, entre autres, par une reprogrammation épigénétique. Ainsi, Eomes est

capable d'interagir avec différents facteurs, tels que Runx3 et BRG1, entraînant une remodelage de la chromatine au niveau d'éléments régulateurs de l'activité transcriptionnelle, en particulier dans les régions régulatrices des gènes *Il2rb (codant la protéine CD122)* ou *Cxcr3* (Istaces et al., 2019).

3. Un axe iNKT/IL-4/T CD8 IM ?

De nombreux travaux montrent l'importance de l'IL-4 dans le développement des LT CD8 IM murins.

L'expression de la chaîne α du récepteur de l'IL-4 est augmentée dans les LT CD8 dans le modèle Klf2 (Weinreich et al., 2010). De plus, chez les souris double-déficientes IL-4Rα-/-Id3-/-, IL-4Rα-/-Klf2-/- ou IL-4Rα-/-Itk-/-, les LT CD8 n'acquièrent pas le phénotype IM ; précisément, ils n'expriment pas Eomes et ne produisent pas l'IFN-γ (Prince et al., 2014; Verykokakis et al., 2010; Weinreich et al., 2010).

L'apport d'IL-4 exogène permet d'augmenter l'expression d'Eomes, de CXCR3 et la production d'IFN-γ dans l'ensemble des LT CD8 mémoires, y compris dans les LT CD8 IM (Ventre et al., 2012). *A contrario*, l'utilisation d'un anticorps bloquant l'IL-4 entraîne une diminution de la fréquence des LT CD8 IM (Gordon et al., 2011).

Des analyses *in vitro* confirment ces données, l'ajout d'IL-4 à des LT CD8 naïfs en culture entraînant une augmentation de la fréquence et du nombre absolu de LT mémoires exprimant CD44, CD122, Eomes et produisant l'IFN-γ (Huang et al., 2014).

Ces résultats montrent donc l'importance de l'IL-4 dans le développement de cette population de LT CD8 IM murine.

Lors de l'étude du modèle murin déficient en Klf2, les auteurs ont observé que les souris également déficientes en PLZF ne produisaient pas de LT CD8 IM. Ceci a également été confirmé dans les modèles Itk-/- et CBP-/- (Weinreich et al., 2010). De plus, dans le modèle Id3-/-, les auteurs ont observé une augmentation de la fréquence des thymocytes PLZF(+) (25 fois plus que chez les souris WT). Chez les souris Id3-/- PLZF-/-, les LT CD8 n'expriment plus le phénotype IM (Verykokakis et al., 2010).

Si ces résultats prouvent l'implication de cellules exprimant PLZF, il est difficile d'en déduire quelle population est impliquée car plusieurs populations cellulaires peuvent exprimer ce

facteur de transcription : les iNKT, des LT-γδ ou une sous-population de thymocytes SP CD4(+) qui dépend de PLZF (Gordon et al., 2011; Verykokakis et al., 2010).

Cependant certaines données suggèrent l'implication des iNKT, qui expriment PLZF et produisent l'IL-4, dans la génération des LT CD8 innés. Chez des souris déficientes en CD1d, on observe une diminution drastique de la fréquence de thymocytes PLZF(+) (comme attendu), ainsi qu'une diminution de la fréquence des thymocytes CD8 IM (Weinreich et al., 2010). Cependant, il semble y avoir des disparités entre les fonds génétiques murins puisque ces derniers résultats obtenus dans un fond BALB/c ne sont pas reproduits dans le fond C57BL/6. Cela peut s'expliquer par la différence de fréquence et phénotype des iNKT entre les souches murines, étant connu que les iNKT sont plus fréquents dans la souche BALB/c que dans la souche C57BL/6 (Huang et al., 2014).

Des données du laboratoire chez l'humain tendent à confirmer l'implication des iNKT dans la génération des LT CD8 innés (cf. introduction partie 2 chapitre 4).

4. Cellules virtuelles mémoires : différenciation possible en périphérie ?

Les LT CD8 IM que nous venons de décrire sont des thymocytes ou des LT matures issus du thymus.

Il existe cependant des cellules dites « virtuelles mémoires (VM) » qui se différencient à partir de cellules naïves en périphérie en cellule au phénotype mémoire sans stimulation antigénique, similaire à la différenciation des LT CD8 au phénotype mémoire/inné précédemment décrits (Haluszczak et al., 2009; Sosinowski et al., 2013).

En effet, Haluszczak et collègues ont observé chez des souris C57BL/6 non immunisées l'existence de LT CD8 spécifiques d'antigènes viraux. Ces LT expriment CD44 et CD122 et sont capables de produire rapidement l'IFN-γ après stimulation par le couple IL-12/IL-18 (stimulation de type inné) (Haluszczak et al., 2009), rappelant le phénotype des LT CD8 IM. Ces travaux ont été confirmés, y compris par la même équipe (Akue et al., 2012; Rudd et al., 2011), laquelle a baptisé ces cellules « virtuelles mémoires ».

Les LT CD8 VM représentent 5 à 10 % des LT CD8 circulant et 10 à 20 % des LT CD8 spléniques. Ils expriment Eomes et sont absents (comme les LT CD8 IM) des souris déficientes en Eomes (Sosinowski et al., 2013).

La génération des LT CD8 VM se déroule en périphérie dans la rate et les ganglions lymphatiques et commence dès la deuxième semaine de vie lors d'une période de lymphopénie et atteint un plateau stable dès la cinquième semaine, lequel perdure à l'âge adulte (Akue et al., 2012).

Les LT CD8 VM peuvent être induits par les IFN de type I, dont la signalisation active l'expression du gène Eomes. En l'absence de ce signal (souris déficientes en récepteurs des IFN de type I), la génération des LT CD8 VM est très diminuée comparativement à celle des souris WT ainsi que leur capacité à produire l'IFN-γ (Martinet et al., 2015).

Comme pour les LT CD8 IM, l'IL-15 joue un rôle essentiel dans la génération et l'homéostasie de cette population VM. Chez les souris déficientes en IL-15 ou en chaîne α ou β de son récepteur, la fréquence des LT CD8 VM est très diminuée par rapport à celle des souris WT. Par ailleurs, l'apport exogène d'IL-15 permet d'amplifier ce compartiment cellulaire (Prince et al., 2014; Sosinowski et al., 2013; White et al., 2016).

Ces deux populations IM et VM présentent des caractéristiques extrêmement similaires, ce qui pose la question d'une continuité entre elles : les premiers peuvent-ils être des précurseurs des seconds ? est-ce une seule et même population ? ou est-ce deux populations distinctes partageant des mécanismes communs ? Il existe au moins un marqueur pour séparer ces deux populations chez la souris : CD49d (ou intégrine α4, qui peut s'associer avec l'intégrine β7 et lier VCAM-1 et la fibronectine, permettant aux cellules d'entrer dans un tissu inflammé). CD49d est faiblement exprimé par les LT CD8 VM et fortement exprimé par les LT CD8 IM (Haluszczak et al., 2009; Sosinowski et al., 2013).

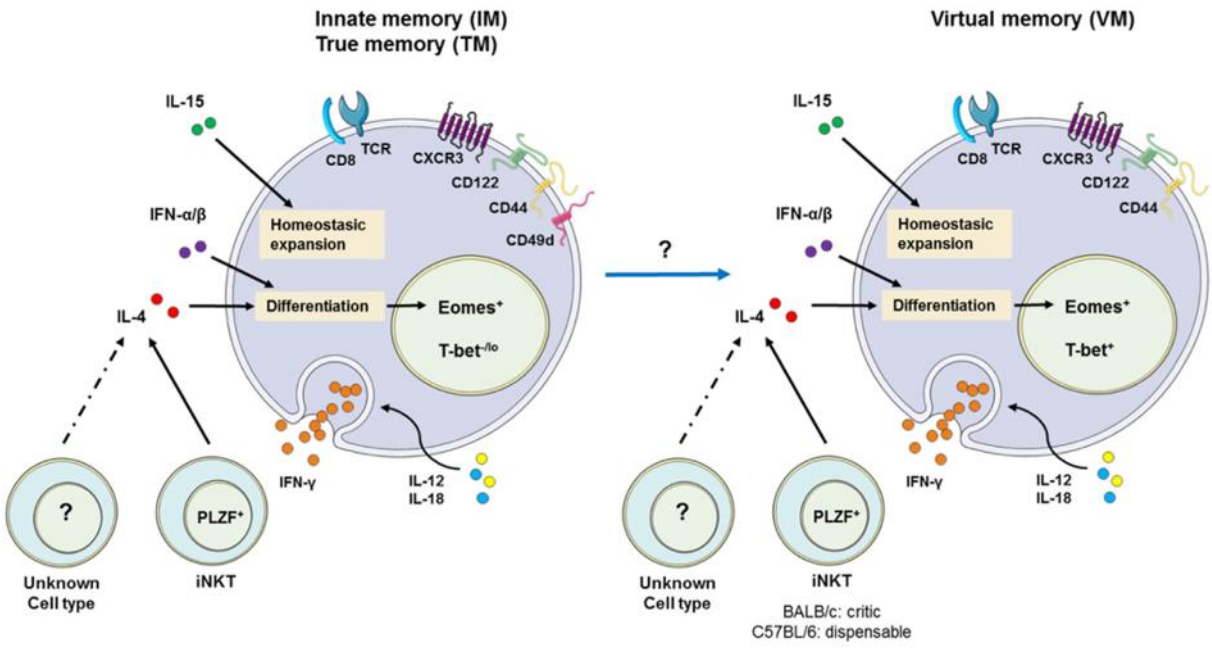


Figure 8 : Caractéristiques des LT CD8 IM et VM murins. Les LT CD8 IM et VM murins expriment CXCR3, CD122, CD44, Eomes, sont capables de produire l'IFN-γ en réponse au couple IL-12/IL-18 et leurs développement et homéostasie peuvent être régulés par l'IL-4 (produite par les iNKT) et l'IL-15. Les LT CD8 VM n'expriment pas CD49d, à la différence des LT CD8 IM (Barbarin, Cayssials, et al., 2017).

Chapitre 3 : Mise en évidence des LT CD8 innés chez l'humain

1. Dans le sang périphérique de donneurs sains

En parallèle de la description des LT CD8 IM chez la souris, plusieurs études ont documenté l'existence de cellules avec un phénotype approchant, mais sans décrire leurs fonctions, chez l'humain. Il s'agit de LT CD8 exprimant des marqueurs de cellules NK tels que KIR2D, KIR3D et NKG2 (Huard & Karlsson, 2000; van der Veken et al., 2009; Warren et al., 2006). Leur fréquence est d'environ 5% des LT CD8 circulants (Bjorkstrom et al., 2012; Warren et al., 2006).

Le phénotype a ensuite été affiné par l'équipe de Björkström et collègues, qui ont montré que les LT CD8 exprimant des marqueurs NK présentaient un phénotype EMRA (pour *effector memory* RA(+)) (CCR7(-) CD45RA(+)). Ils ont également analysé le répertoire TCR de ces LT CD8 KIR(+), qui utilisent un nombre plus restreint de chaînes Vβ du TCR que les LT CD8 totaux ou que les LT CD8 conventionnels EMRA(+) KIR(-). Cela suggère qu'une pression antigénique pourrait jouer un rôle dans l'acquisition de ce phénotype. De plus, la réponse à une stimulation TCR est moindre chez les LT CD8 KIR(+) que chez les LT CD8

KIR(-) en termes de production de cytokines (IFN-γ, TNF-α) ou de dégranulation. Plus les cellules expriment un nombre élevé de KIR, moins elles sont capables de répondre à une stimulation TCR (Bjorkstrom et al., 2012).

L'origine de ces cellules, centrale ou périphérique, reste cependant débattue.

2. Dans le sang de cordon

En 2006, une population similaire de LT CD8 KIR(+) NKG2A(+) a été identifiée dans le sang de cordon humain, représentant environ 1,7% des LT CD8. Ces cellules ont un phénotype mémoire EMRA (CCR7(-) CD45RA(+)) et sont capables de produire rapidement l'IFN-γ après stimulation (PMA/iono). Les échantillons ont été obtenus sans contexte d'infection virale ou de pathologie placentaire, ce qui laisse supposer qu'aucune stimulation antigénique exogène ne participe à la génération de ces cellules, ce qui confirmerait leur caractère inné (Warren et al., 2006).

Des LT CD8 exprimant des marqueurs des NK ont été identifiés également dans thymus et la rate de fœtus humains. Le phénotype identifié est Eomes(+) CD45RA(+) CD161(+) CD122(+). Ces cellules sont fonctionnelles puisque capables de produire l'IFN-γ après stimulation (PMA/iono) (Min et al., 2011).

Le laboratoire a également observé l'existence de ces cellules dans le sang de cordon humain, avec un phénotype Eomes(+) panKIR/NKG2A(+) et enrichi en cellules EMRA. Ces cellules sont capables de produire l'IFN-γ après stimulation par PMA/iono ou par le couple IL-12/IL-18 (Jacomet et al., 2015).

Ces données confirment que les fonctions innées de ces cellules seraient acquises avant exposition à des antigènes dans les organes lymphoïdes périphériques, comme observé chez la souris.

3. Phénotype Eomes(+) panKIR/NKG2A(+)

Il n'y a pas encore de consensus international pour identifier les LT CD8 innés.

Notre laboratoire a fait le choix d'utiliser les marqueurs Eomes et panKIR (KIR2D, KIR3DL1/2)/NKG2A. En effet, sur les 7% de LT CD8 exprimant les marqueurs panKIR/NKG2A, 55% d'entre eux expriment Eomes. Parallèlement, 24% seulement des LT CD8 panKIR/NKG2A(-) expriment Eomes et 26% seulement des LT CD8 totaux, ce qui est

cohérent avec les données obtenues chez la souris. La majorité des LT CD8 innés humains (60%) sont enrichis en cellules EMRA et expriment le facteur de transcription T-bet, partenaire habituel d'Eomes dans le compartiment mémoire.

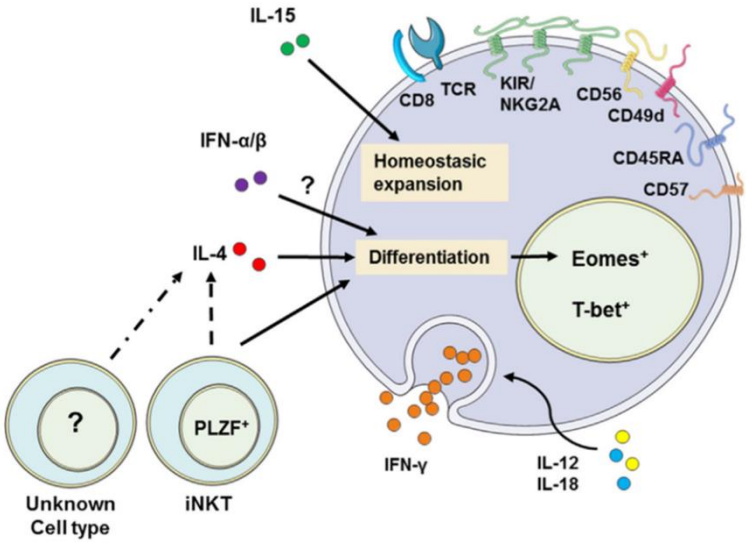


Figure 9 : Caractéristiques des LT CD8 innés humains. Les LT CD8 innés humains expriment panKIR/NKG2A, CD56, CD57, CD45RA, CD49d, Eomes et T-bet, sont capables de produire l'IFN-γ en réponse à IL-12 + IL-18 et leurs développement et homéostasie peuvent être régulés par l'IL-4 (possiblement produite par les iNKT) et l'IL-15 (Barbarin, Cayssials, et al., 2017).

Surtout, cette fraction cellulaire CD8(+) Eomes(+) panKIR/NKG2A(+) est capable de produire l'IFN-γ après une stimulation de type inné par le couple IL-12/IL-18, à l'image de ce qui avait été précédemment décrit pour des LT CD8(+) CD56(+) (Guia 2008). Cette propriété n'est pas mise en évidence dans la fraction CD8(+) Eomes(+) panKIR/NKG2A(-), qui correspond à des LT CD8 mémoires conventionnels. En revanche, lors d'une stimulation de type adaptatif par des billes anti-CD3/CD28, les LT CD8 Eomes(+) produisent l'IFN-γ, à une fréquence équivalente, et ce, qu'ils expriment ou non panKIR/NKG2A. Cela confirme le caractère « inné/mémoire » des LT CD8 Eomes(+) panKIR/NKG2A(+). Les LT CD8 innés partagent aussi avec les NK des fonctions cytolytiques (expression du marqueur de dégranulation CD107a après stimulation *via* CD16 ou par des cellules K562) (Jacomet et al., 2015).

Chapitre 4 : Les fonctions des LT CD8 innés

Les fonctions des LT CD8 innés, tant chez la souris que chez l'humain, restent peu documentées. On présume néanmoins qu'elles sont impliquées dans les réponses immunitaires anti-infectieuse et anti-tumorale.

1. Immunité anti-infectieuse chez la souris

Chez l'animal, des rôles anti-bactérien (en particulier contre *Listeria monocytogenes*), anti-viral et anti-parasitaire (contre *Trypanosoma cruzi* de façon indépendante de l'antigène (Baez et al., 2019)) des LT CD8 innés IM ou VM ont pu être décrits et analysés.

1.1. Immunité anti-bactérienne

Des souris WT et Itk-/- (donc enrichies en LT CD8 IM) ont été infectées par la bactérie *Listeria monocytogenes* et leurs rates ont été analysée trois jours après. L'analyse du nombre de bactéries dans la souche WT a révélé une prolifération (environ 1,5 fois plus de CFU (pour unité formant colonie) que la dose initiale). Au contraire, dans la souche Itk-/-, la quantité de bactéries a diminué de moitié, suggérant que cette souche murine soit plus apte à contrecarrer cette infection que les souris WT (3 jours n'étant pas suffisant pour induire pleinement une réponse adaptative primaire). Cependant, lors de l'analyse sept jours après l'infection, aucune bactérie n'est détectable dans aucune des deux souches murines, ce qui signifie que les souris WT sont seulement moins rapides à résoudre l'infection. L'avantage de la souche Itk-/- réside donc dans sa réponse précoce contre la bactérie, suggérant une fonction innée (mobilisable en quelques heures) supérieure à la souche WT.

Dès les 24 premières heures d'infection, les LT CD8 CD44(high) produisent l'IFN-γ dans les deux souches murines. Du fait du nombre augmenté de LT CD8 IM chez les souris Itk-/-, leur taux sérique d'IFN-γ est aussi augmenté. La clairance des bactéries implique les macrophages, qui sont plus nombreux à sécréter le TNF-α dans la souche Itk-/-. Les auteurs supposent que la fréquence et le nombre plus élevés de LT CD8 IM présents dans la souche Itk-/- permettent une plus grande production d'IFN-γ et donc une stimulation très efficace des macrophages. Dans le péritoine, où il y a moins de LT que dans la rate, aucune variation de production de TNF-α par les macrophages n'est observée entre les deux souches WT et Itk-/-, suggérant un rôle des LT CD8 IM dans la stimulation des macrophages et leur production de TNF-α.

Dans cette situation, les LT CD8 sont essentiels puisque la déplétion des LT CD8 chez les souris WT et Itk-/- empêche les souris de réduire l'infection, indiquant que ces cellules sont essentielles pour lutter contre l'infection bactérienne. Pour déterminer la part respective des LT CD8 conventionnels et des LT CD8 IM dans la sécrétion d'IFN-γ et la réponse antibactérienne, les auteurs ont réalisé un transfert de LT CD8 provenant de souris WT ou Itk-/- à des souris IFN-γ-/- (ne pouvant pas réduire l'infection bactérienne à *L. monocytogenes*). Le transfert de LT CD8 totaux issus des souris Itk-/- (mais pas des souris WT) à des souris IFN-γ-/- leur permet de diminuer le nombre de bactéries *Listeria monocytogenes* dans la rate. Le transfert de LT CD8 CD44(high) (donc enrichis en LT CD8 IM) issus des souris WT ou Itk-/- à des souris IFN-γ-/- permet de réduire drastiquement le nombre bactéries *Listeria monocytogenes* dans la rate, sans différence entre les deux souches. C'est donc la concentration en LT CD8 IM qui offre un avantage à la souche Itk-/-. Ces expériences, qui ont pu être reproduites en triant les LT CD8 IM sur la base de leur expression de CXCR3 (Oghumu et al., 2015), montrent donc que les LT CD8 IM possèdent des fonctions innées en réponse à une infection bactériennes (Hu et al., 2007).

1.2. Immunité anti-virale

Avec l'âge, les souris développent des LT CD8 VM, même chez les souris non-immunisées. Parmi ces cellules, ont été identifiées des LT CD8 VM spécifiques d'antigènes viraux (protéine B8R des poxvirus et protéine NS4b du virus du Nil occidental), ce qui suggère un rôle de ces cellules dans la réponse anti-virale (Renkema et al., 2014). Des LT CD8 IM CD44(high) NKG2D(+) CD25(-) murins sont capables, de façon non spécifique d'antigène, de lutter contre le virus de la grippe (Sckisel et al., 2014).

Les LT CD8 IM jouent également un rôle dans le contrôle des infections virales chroniques par le LCMV (pour *lymphocytic choriomeningitis virus*). Dans le modèle murin utilisé ($CIITA^{Tg}$ où les thymocytes expriment des molécules du CMH de classe II), le thymus est enrichi en LT CD8 IM (Eomes(+) CXCR3(+) IL-4Rα(+) CD122(+) CD44(+)). Les LT CD8 IM reconnaissant des épitopes viraux sont plus nombreux chez les souris mutées que chez les souris WT et associés à une diminution plus rapide de la virémie. La restimulation *in vitro* des LT CD8 par des épitopes viraux entraîne une augmentation de la fréquence de cellules produisant l'IFN-γ et le TNF-α. Cette fonction est dépendante d'une stimulation par l'IL-4

puisque chez les souris CIITA^{Tg} déficientes en IL-4, la fréquence des LT CD8 IM est diminuée, ainsi que leur production de cytokines (Lee, Park, et al., 2015).

2. Immunité anti-tumorale

2.1. Chez la souris

Tietze et collègues ont observé chez la souris une augmentation de l'expression du récepteur NK NKG2D par les LT CD8 spléniques après immunothérapie (anticorps agonistes anti-CD40 et IL-2 recombinante humaine). L'absence de surexpression de CD25 suggère que l'activation de ces splénocytes est indépendante du TCR et des expériences de stimulation dépendante ou indépendante du TCR ont confirmé cette hypothèse. Ces cellules expriment également le granzyme B après immunothérapie et acquièrent la capacité de lyser les cellules tumorales cibles, confirmant leur caractère inné. Après tri cellulaire, les auteurs attribuent cette capacité lytique aux cellules CD44(high), dont une proportion élevée exprime NKG2D. Ces LT NKG2D(+) CD25(-) ont également une localisation intra-tumorale et sont associés à une diminution (voire une disparition) du volume tumoral (cellules de carcinome rénal et de mélanome B16). L'utilisation d'un modèle murin OT-I confirme que l'effet anti-tumoral de ces cellules est indépendant de la spécificité d'antigène (Tietze et al., 2012).

Ces mêmes cellules sont aussi impliquées dans la lutte anti-tumorale contre le myélome multiple, après induction par une IL-15 superagoniste complexée à son récepteur. Les auteurs mettent en évidence le rôle essentiel de NKG2D et de l'IFN-γ dans une lyse anti-tumorale non spécifique d'antigène (Xu et al., 2013).

Nous avons décrit précédemment que les LT CD8 IM produisent l'IFN-γ en réponse à une stimulation de type inné (couple IL-12/IL-18). Une étude chez la souris a montré que l'injection de cellules tumorales B16 induit des tumeurs dans le foie et les poumons, et que l'induction de l'expression de l'IL-12 seule ou avec l'IL-18 (par injection des ADNc) induit une disparition des tumeurs hépatiques et pulmonaires, non retrouvée chez les souris contrôles non traitées par les ADNc. L'induction de l'expression de ces deux cytokines est associée à une augmentation du taux sérique d'IFN-γ (Rodriguez-Galan et al., 2009). Chez ces souris, on observe une augmentation de la fréquence des LT CD8(+) VM dans la rate, les ganglions drainant la tumeur et parmi les LT infiltrant la tumeur (Savid-Frontera et al., données personnelles non publiées).

2.2. Chez l'humain

Les chercheurs ayant étudié le rôle anti-tumoral des LT CD8 IM NKG2D(+) CD25(-) chez la souris ont confirmé que ce phénotype était également présent dans des biopsies de mélanome humain et pouvait être induit *in vitro* par la stimulation avec l'IL-2 (sans stimulation du TCR) ou avec le traitement d'immunothérapie utilisé contre le mélanome dans lequel est observé une augmentation de la fréquence des LT CD8 mémoires CD25(-). Ces LT exprimant déjà NKG2D, contrairement à la souris, on n'observe pas de surexpression de ce facteur. La fréquence de ces cellules n'a cependant pas été mise en corrélation avec la rémission ou non des patients (Tietze et al., 2012).

Dans le laboratoire, les LT CD8 innés Eomes(+) panKIR/NKG2A(+) ont été étudiés chez l'humain dans le cadre de la leucémie myéloïde chronique (LMC), une hémopathie maligne qui se traduit par une augmentation de la prolifération des progéniteurs myéloïdes dans la moelle osseuse. Chez les patients atteints de LMC, les LT CD8 innés ont une fréquence diminuée par rapport à celle des donneurs sains, ainsi qu'une capacité réduite à exprimer la perforine et l'IFN-γ après stimulation par le couple IL-12/IL-18. De façon intéressante, chez les patients en rémission sous traitement anti-leucémique, la fréquence des LT CD8 innés et leur capacité à produire l'IFN-γ sont partiellement restaurées. Il avait été précédemment démontré que les patients atteints de LMC présentaient une altération numérique et fonctionnelle des iNKT qui était corrigée chez les patients en rémission (Rossignol et al., 2012) ; une corrélation directe entre l'expression de PLZF dans les iNKT et l'expression d'Eomes dans les LT CD8 innés avait alors pu être mise en évidence. De plus, *in vitro*, la stimulation par l'IL-4 entraîne une augmentation de la fréquence et du nombre absolu des LT CD8 innés de donneurs sains, soutenant l'hypothèse de l'existence d'un axe iNKT/IL-4/LT CD8 innés chez l'humain (Jacomet et al., 2017). Les patients LMC présentaient donc une altération numérique et fonctionnelle des iNKT et des LT CD8 innés au diagnostic, corrigée chez les patients en rémission. Ces deux populations cellulaires semblent donc être des cibles d'immuno-subversion par la tumeur, impliquant donc qu'elles jouent bien un rôle dans l'immuno-surveillance anti-tumorale (Jacomet et al., 2017). Enfin, chez les patients après deux ans d'arrêt de traitement et sans rechute de la maladie, la fréquence des LT CD8 innée est augmentée par rapport aux autres patients (au moment du diagnostic ou en rémission sous traitement) et même par rapport aux donneurs sains. Leurs capacités fonctionnelles (expression de la perforine et production d'IFN-γ après stimulation par le couple IL-12/IL-18)

sont similaires à celles de donneurs sains (Cayssials et al., 2019). Cette supranormalisation semble indiquer un gain de fonction essentiel pour ces patients. Cela suggère que le rôle de ces LT CD8 innés est de contrôler la maladie résiduelle, permettant aux patients de ne pas rechuter et de pouvoir se passer du traitement anti-tumoral et de ses effets indésirables, confirmant l'hypothèse que les LT CD8 innés pourraient être des cibles d'immuno-subversion par la tumeur et/ou impliqués dans l'immuno-surveillance et le contrôle de la LMC, en participant au maintien en rémission après arrêt des traitements.

Les LT CD8 innés ont également été étudiés dans deux types de cancer solide, les cancers du sein et de l'ovaire. Dans le cas du cancer du sein, ils sont présents dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur. Dans le cancer de l'ovaire, ils sont présents au sein de la tumeur mais aussi dans le liquide d'ascite (accumulation de liquide dans la cavité péritonéale) et la carcinose péritonéale (envahissement du péritoine par des cellules malignes secondaires). Dans ces deux modèles, comme dans la LMC, on observe une corrélation entre l'expression d'Eomes des LT CD8 innés et de PLZF des iNKT dans les CMN circulantes et dans la tumeur (Barbarin, Herbelin, et al., 2017).

Ces données confirment le rôle potentiel des LT CD8 innés et de l'axe iNKT/IL-4/T CD8 innés dans le contrôle de la croissance tumorale.

Chapitre 5 : Les LT CD8 innés pourraient-ils être issus d'une reprogrammation ?

Depuis les premières descriptions des LT CD8 innés chez la souris et leur extension chez l'humain, de nouveaux aspects de la biologie de ces cellules ont vu le jour, en particulier en lien avec leur ontogenèse. L'un de ces aspects concerne l'hypothèse d'une reprogrammation des LT CD8 en faveur de sa composante innée en réponse à une/des stimulation(s) chronique(s), directement ou indirectement, liée(s) à l'âge. Un autre concerne la compréhension de la biologie des LT CD8 innés en y intégrant une approche métabolique et l'organisation de ces cellules avec les autres LT conventionnels dans un gradient d'*innateness*.

1. L'immuno-sénescence et les LT CD8 innés

Chez l'animal et l'humain, le vieillissement est associé à une accumulation globale des dommages à l'ADN et à un raccourcissement des télomères des cellules de l'organisme. Il est en plus associé à un déclin général des fonctions du système immunitaire, contribuant à une augmentation du risque d'infection, de cancer ou de maladie auto-immune chez les sujets âgés. Cela résulte d'un remodelage du système immunitaire au cours de l'âge, que l'on dénomme immunosénescence. Concernant les LT, au cours du temps, se produit une involution du thymus, qui entraîne une diminution de la production de LT naïfs (George & Ritter, 1996; Lynch, Goldberg, et al., 2009). En compensation, les LT différenciés s'accumulent (Boyman et al., 2009). Par conséquent, l'immunité contre les pathogènes est altérée en réponse à divers types d'infection (virale, bactérienne...). Les LT CD8 sont particulièrement susceptibles à la sénescence (Goronzy & Weyand, 2019). L'immunosénescence impacte les propriétés fonctionnelles des LT CD8, dont la capacité à proliférer en réponse à un antigène, l'amplitude de la réponse spécifique à l'antigène, la production de molécules effectrices et la capacité de lyse cellulaire (Nikolich-Žugich et al., 2012).

Chez la souris, l'analyse de la distribution de l'expression de l'IL-15 dans les organes lymphoïdes a permis d'identifier une expression splénique de l'IL-15 qui augmente avec l'âge. Les auteurs remarquent que l'IL-15, en tant que facteur essentiel de l'homéostasie des LT CD8 mémoires, pourrait expliquer l'augmentation de leur nombre avec l'âge (Cui et al., 2014). Il est tentant d'étendre cette hypothèse à nos cellules d'intérêt, les LT CD8 innés humains (IM ou VM chez la souris) dont les fonctions et l'homéostasie dépendent également de l'IL-15. En effet, une étude dans laquelle les LT CD8 VM sont définis sur la base de l'expression de CD45RA, panKIR/NKG2A et Eomes rapporte une augmentation de leur fréquence parmi les splénocytes avec l'âge (White et al., 2016). Au cours du vieillissement, la fréquence des LT CD8 VM murins circulants augmente progressivement ainsi que la fréquence globale des LT CD8 produisant l'IFN-γ, même chez les souris non-immunisées (Renkema et al., 2014). Ces données sont confirmées par plusieurs autres études (Chiu et al., 2013; Quinn et al., 2016, 2018).

Chez les sujets humains âgés, Fagiolo et collègues ont documenté une inflammation systémique de bas-grade comprenant une capacité augmentée des CMN à produire des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF-α...) (Fagiolo et al., 1993). En effet, de nombreux gènes de l'inflammasome ont une expression corrélée à l'âge (41 des 109 modules

géniques identifiés par les auteurs). Ces gènes sont impliqués dans la sécrétion de cytokines (dont l'IL-1-β) et sont exprimés par de nombreux types cellulaires (monocytes, macrophages, polynucléaire neutrophiles) (Furman et al., 2017). Ce concept a été dénommé *inflammaging*.

En parallèle de la production augmentée de cytokines, on observe une perte de l'expression des récepteurs de co-stimulation CD27 et CD28, qui sont aujourd'hui considérés comme la principale signature phénotypique permettant d'identifier les LT sénescents chez l'humain ; celle-ci est souvent associée à l'expression de CD45RA, KLRG1 (pour *killer cell lectin-like receptor subfamilly G member 1*) ou CD57 qui sont des marqueurs de différenciation terminale (Henson et al., 2009, 2012). Certains auteurs considèrent également l'expression de marqueurs NK par les LT CD8 comme des marqueurs de sénescence (Michel et al., 2016; Pereira & Akbar, 2016).

Les LT CD8 innés (CD45RA(+) CD27(+) panKIR/NKG2A(+)), qualifiés de VM par les auteurs, s'accumulent également avec l'âge chez l'humain. Chez le sujet âgé, ils expriment un phénotype sénescent, du fait de leur faible capacité prolifération et de leur résistance à l'apoptose (liée à l'expression de facteur de la famille Bcl-2), qui n'est pas associée à l'exhaustion, l'expression des transcrits de Pdcd1, Klrg1 ou Lag3 étant moins élevée dans les LT CD8 VM que dans les LT CD8 naïfs (Quinn et al., 2018).

Les cellules aux caractéristiques NK-like sont cependant fonctionnelles puisque l'analyse des LT CD8 CD28(-) a permis de mettre en évidence une surexpression des gènes codant des récepteurs de cytokines, des protéines impliquées dans la cytotoxicité et des facteurs de transcription (comme Eomes) chez les sujets âgés par rapport aux sujets jeunes (Fann et al., 2005).

L'âge ne serait donc pas synonyme exclusivement de perte de fonction des LT conventionnels mais aussi, potentiellement, de gain de fonction. Cependant, cette reprogrammation est-elle induite par l'âge directement ou (aussi) par l'accumulation d'évènements de stimulation chronique liés à l'âge ?

2. La stimulation chronique, la sénescence et les LT CD8 « NK-like »

Les LT CD8, au stade terminal de différenciation CD27(-) CD28(-) CD45RA(+) CD57(+), s'accumulent chez les sujets âgés (associés à une stimulation chronique par les antigènes du soi ?) (Henson et al., 2009), mais aussi durant les infections virales chroniques, au cours des malades inflammatoires chroniques et des cancers.

L'un des facteurs de l'environnement connu comme contributeur majeur de l'immuno-sénescence est le CMV, présent chez la majorité des adultes. Peu importe l'âge, l'infection latente à CMV est associée à une diminution du nombre de LT naïfs et à une augmentation des LT effecteurs et mémoires (Kuijpers et al., 2003). Une méta-analyse des LT chez des individus âgés révèle une augmentation de la fréquence des LT CD8 au phénotype EMRA, une augmentation de l'expression de CD57 et une diminution de l'expression de CD28 chez les patients séropositifs pour le CMV, confirmant une augmentation de la sénescence liée au CMV (Weltevrede et al., 2016).

Chez des patients infectés par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), comparativement à des donneurs sains de même âge, on observe aussi une augmentation du nombre de LT CD8 VM exprimant les fonctions caractéristiques des NK (expression d'IFN-γ, de granzyme B et de perforine) (Jin et al., 2020). S'agissant des maladies inflammatoires chroniques, il a été documenté dans la spondylarthrite ankylosante une augmentation de la fréquence des LT CD8 CD28(-) circulants, comparativement à des donneurs sains du même âge. Ces cellules sont capables de produire la perforine et l'IFN-γ (Schirmer et al., 2002). Enfin, chez des patientes atteintes de cancer du col de l'utérus (lié au papilloma virus humain ou HPV), on observe une augmentation de la fréquence dans le sang des LT CD8 CD28(-), des LT CD8 EMRA et des LT CD8 exprimant les marqueurs NK CD16 et CD56, comparativement aux donneuses saines et aux femmes infectées par l'HPV mais sans cancer (Pita-Lopez et al., 2014).

3. Le métabolisme énergétique, une reprogrammation spécifique des LT CD8 innés ?

La différenciation des LT entraîne une reprogrammation des fonctions métaboliques. Les LT naïfs sont caractérisés par un état de quiescence métabolique, pour lequel la principale source d'énergie est la phosphorylation oxydative. La différenciation vers la fonction effectrice après la stimulation du TCR nécessite une augmentation rapide de l'apport énergétique, qui est fournie par une augmentation de la glycolyse aérobie (Pearce et al., 2013). Il semble que CD28 soit impliqué dans ce processus de *shift* métabolique, en facilitant l'oxydation des acides gras (Klein Geltink et al., 2017). Les LT mémoires, bien qu'aussi dans un état quiescent, ne se trouvent pas dans le même état métabolique que les LT naïfs, la masse mitochondriale étant augmentée et donc la capacité d'oxydation des acides gras également (van der Windt et al., 2013).

Les rôles et les mécanismes de régulation des voies métaboliques dans la régulation de la survie, de la différenciation et de la fonction des LT de manière générale restent encore largement méconnus. Mais ces travaux posent également la question de l'utilisation de ces différentes voies métaboliques par les LT CD8 innés, qui présentent des caractéristiques mémoires mais n'ont pas été stimulés par leur antigène spécifique et qui peuvent engager une réponse immune sans stimulation du TCR.

4. LT CD8 innés, quelle place dans le gradient d'*innateness* ?

Les auteurs ayant développé le concept d'*innateness* (cf. introduction partie 1 chapitre 3) ont analysé le contenu transcriptomique des MAIT, des LT-γδ, des iNKT, des NK et des LT CD4 et CD8. Cependant, si les auteurs ont bien analysé l'expression de marqueurs innés au sein de la population T CD8 globale, ils n'ont pas séparé les LT CD8 innés des LT CD8 conventionnels, laissant ouverte la question de la place des LT CD8 innés dans ce gradient d'*innateness* (Gutierrez-Arcelus et al., 2019).

Les données disponibles en ligne peuvent néanmoins nous fournir un élément de réponse, puisqu'on observe que les marqueurs que nous utilisons pour identifier les LT CD8 innés (Eomes et panKIR (NKG2A, KIR2D, KIR3DL1/2)) contribuent à ce gradient (**Figure 10**). Nos cellules d'intérêt pourraient ainsi se situer entre des LT CD8 conventionnels et les MAIT.

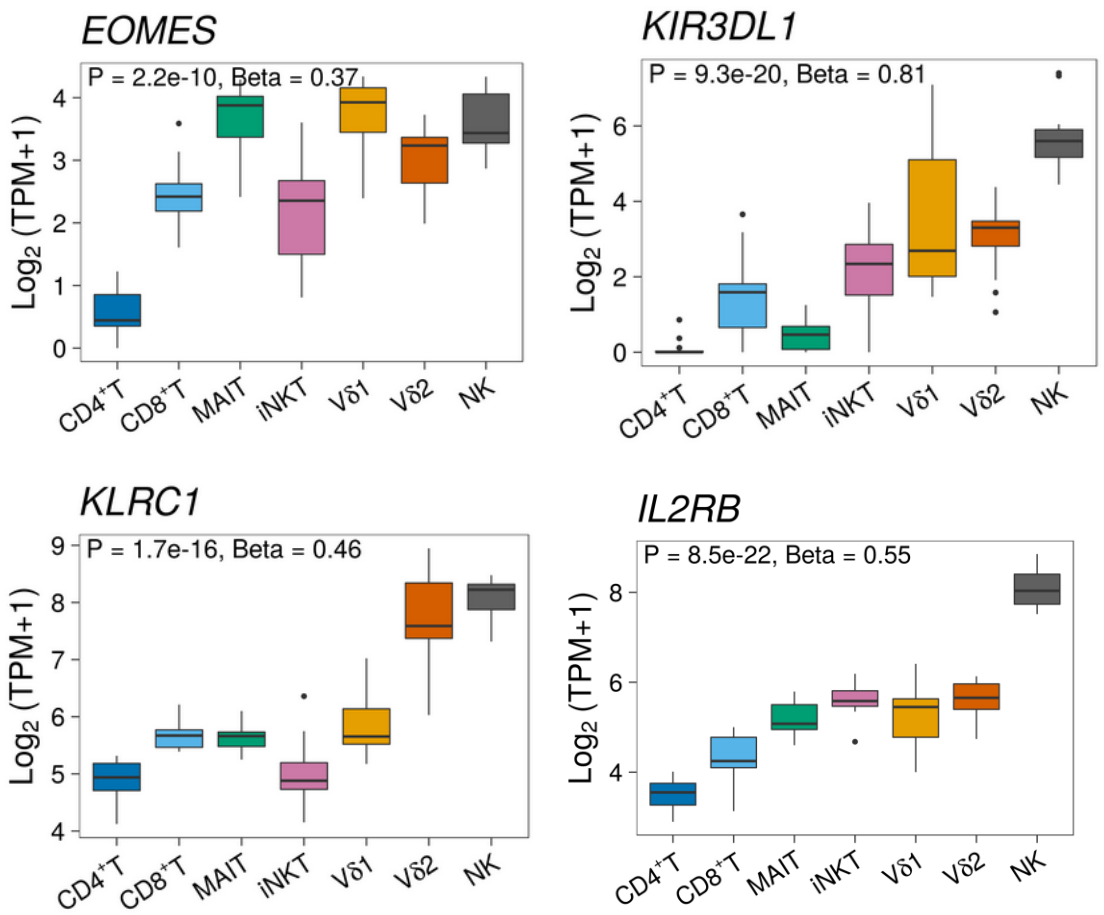


Figure 10 : Expression de l'ARNm codant Eomes, KIR3DL1, NKG2A (KLRC1) et CD122 (IL2RB) à l'état basal dans les différents LT conventionnels et non conventionnels du gradient d'*innateness* (Gutierrez-Arcelus et al., 2019).

Troisième partie. Transplantation rénale, tolérance et LT non conventionnels

Chapitre 1 : La réaction allo-génique et la transplantation d'organe

La théorie du soi et du non soi a été développée par Burnet au milieu du XXème siècle (Burnet & Fenner, 1949). Selon celle-ci, un organisme déclenche une réaction immunitaire contre toute entité qui lui est étrangère (non-soi), alors qu'il tolère toute entité qui lui est propre (soi). Si la compréhension du système immunitaire a évolué par la suite, cette théorie s'applique parfaitement à la question de la transplantation d'organe.

Les allo-antigènes sont des antigènes présents chez les individus d'une espèce et qui peuvent provoquer une réponse immunitaire chez d'autres individus de la même espèce, génétiquement différents. En transplantation humaine, c'est la reconnaissance des allo-antigènes, et en particulier ceux du CMH, qui est le point de départ d'une réponse immune dirigée contre le greffon, laquelle peut entraîner rejet et/ou perte de fonction. Il a été démontré chez la souris que la réponse immune impliquant la reconnaissance d'allo-antigènes est principalement localisée au niveau des organes lymphoïdes secondaires (Lakkis et al., 2000; Zhou et al., 2003).

1. Les différentes types de présentation des allo-antigènes

La réponse immunitaire adaptative aux allo-antigènes est mise en place dès le début de la transplantation, les CPA du donneur présentes dans le greffon étant capables de migrer dès le déclampage vers les organes lymphoïdes du receveur. Ce type de reconnaissance est dénommé présentation directe. Il existe deux autres mécanismes de reconnaissance des allo-antigènes : indirecte et semi-directe (**Figure 11**).

1.1. La présentation directe

Cette voie de présentation est une exception au principe de restriction par le CMH puisque les LT du receveur sont capables de reconnaître des molécules du CMH du donneur, présentée par une CPA du donneur. Cette réaction est possible grâce à des phénomènes de réactivité croisée entre les molécules du CMH des deux individus. En effet, lors de la sélection thymique, les complexes CMH-peptides sélectionnent des répertoires peu auto-réactifs mais

potentiellement allo-réactifs ; le TCR allo-réactif reconnaît des polymorphismes au niveau du CMH. De plus, en comparaison du TCR non allo-réactif, le TCR allo-réactif reconnaîtra ses ligands présents à une plus grande densité, s'agissant de molécules du CMH de classe I. En résumé, la réponse allo-génique liée à la présentation directe est intense, rapide et polyclonale. Elle peut concerner jusqu'à 10% du répertoire des LT humains (pour revue (Siu et al., 2018)).

L'importance de ce mode de présentation a été étudié chez l'animal : au onzième jour de la greffe dans les organes lymphoïdes du receveur, plus de 90% des cellules allo-réactives interagissent avec des molécules du CMH du donneur (voie directe) contre seulement 1 à 5% de cellules qui interagissent avec des molécules du CMH du soi (voie indirecte) (Benichou, 1999). L'importance et la précocité de ce mode de reconnaissance ont été confirmées dans des modèles murins (Pietra et al., 2000) et chez l'humain (Hornick et al., 1998; Mason et al., 1996; van Besouw et al., 2005). Cependant, la réponse immunitaire liée à la présentation directe diminue dans les semaines suivant la greffe (Baker et al., 2001). Cela suggère que ce mode de présentation prédomine dans les jours qui suivent la transplantation d'organe puis diminue avec le temps post-transplantation.

1.2. La présentation indirecte

Ce mode de présentation correspond au processus classique de présentation des antigènes. Les allo-antigènes auront été phagocytés puis présentés sous forme de peptide par les CPA du receveur aux LT du receveur (Benichou et al., 1992; Gallon et al., 1995; Sayegh & Carpenter, 1996; Waaga et al., 1998).

Ce mode de présentation a été démontré dans les rejets aigus et chroniques chez la souris (Auchincloss et al., 1993; Fangmann et al., 1992) et l'humain (Baker et al., 2001; Z. Liu et al., 1996). Par exemple, l'implication de la présentation indirecte dans le rejet de greffe a été démontrée dans un modèle de greffe de peau. Les souris donneuses sont déficientes en molécules du CMH de classe II et les souris receveuses rejettent le greffon, confirmant que la présentation des allo-antigènes est réalisée par les molécules du CMH du receveur et non du donneur (Auchincloss et al., 1993). Depuis, ce mécanisme a été associé aux rejets de greffon rénal, cardiaque ou pulmonaire chez l'humain (Ballet et al., 2006).

1.3. La présentation semi-directe

Cette voie de reconnaissance a été proposée suite à l'observation de l'activation de LT CD8 par les CPA, également capables d'activer les LT CD4 *via* la présentation d'allo-antigènes par les molécules du CMH de classe II. Ce mode présentation implique l'acquisition de molécules du CMH du donneur chargées de peptides allo-géniques par les CPA du receveur. Ce transfert permet à la fois la présentation des peptides allo-géniques par les molécules du CMH de classe II du receveur aux LT CD4 et la présentation des peptides allo-géniques par les molécules du CMH de classe I du donneur aux LT CD8, induisant ainsi l'activation et la prolifération des deux types de LT CD4 et CD8 du receveur (Herrera et al., 2004).

Le rôle de la présentation semi-directe dans le développement de rejet après transplantation reste cependant controversé.

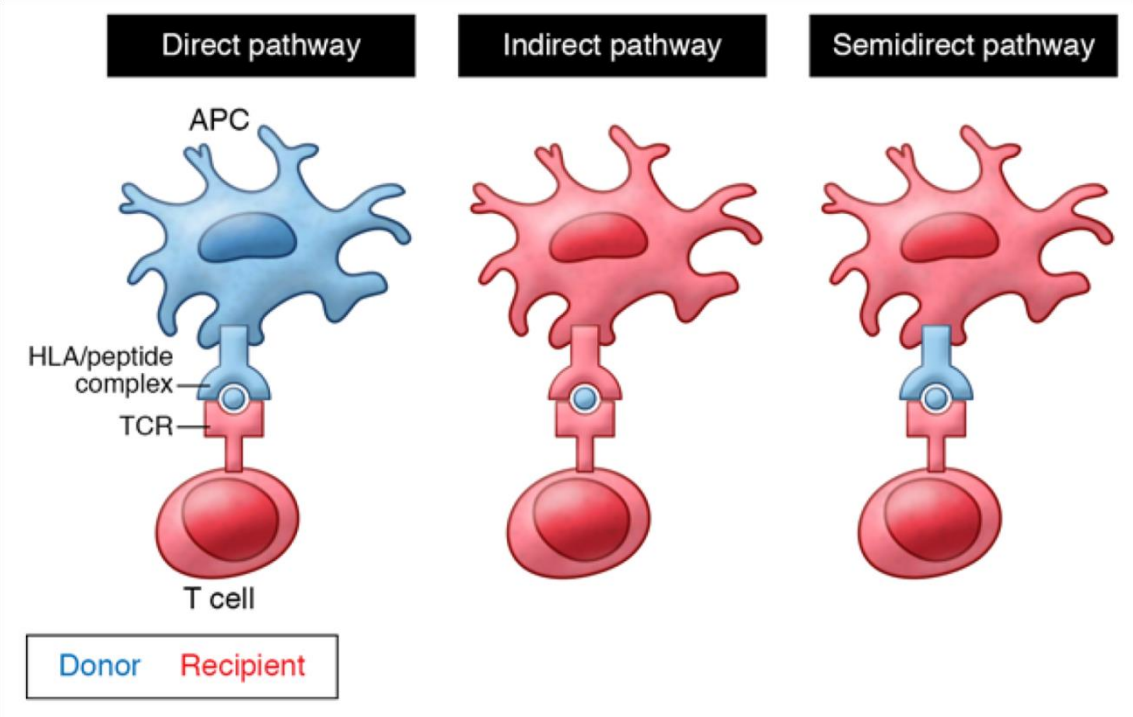


Figure 11 : Les différentes voies de présentation des allo-antigènes (DeWolf & Sykes, 2017)

2. Les différents types de rejet

En fonction du temps post-transplantation, on distingue plusieurs types de rejet.

Le rejet hyper-aigu intervient dans les premières heures après la transplantation. Il est causé par la présence d'anticorps qui ciblent les antigènes du système sanguin ABO (pour revue (Cai & Terasaki, 2005). Ces anticorps induisent l'activation rapide du système immunitaire et

la nécrose de l'organe, entraînant la perte fonctionnelle du greffon. Ce type de rejet est aujourd'hui exceptionnel, grâce à la biovigilance et au test de comptabilité ABO réalisé juste avant la greffe.

Le rejet aigu intervient au cours de la première année de greffe. On distingue deux types de rejet aigu : le rejet humoral et le rejet cellulaire. Le rejet humoral est médié par l'apparition d'anticorps spécifiques du greffon (ou DSA) *de novo* dirigés contre les cellules du greffon et notamment contre les molécules du CMH du donneur (pour revue (Loupy & Lefaucheur, 2018)). Le rejet cellulaire est médié par les LT, aboutissant à l'activation et la prolifération des LT du receveur spécifiques des antigènes de donneur (pour revue (Cozzi et al., 2017)).

Le rejet chronique apparaît plus tardivement et se caractérise par une altération lente et progressive, souvent irréversible, des tissus et de la fonction du greffon.

Les LT CD8 sont impliqués dans les phénomènes de rejet. En effet, les patients transplantés rénaux enclins au rejet aigu présentent avant la transplantation une fréquence plus élevée que les patients stables de précurseurs des LT CD8 allo-réactifs (van de Berg et al., 2012). Lors du rejet aigu, les LT CD8 exercent leur fonction cytotoxique à l'encontre du greffon (Cai & Terasaki, 2010). Des transcrits codant l'arsenal cytotoxiques peuvent même être retrouvés dans les urines de patients en rejet (pour revue (Anglicheau & Suthanthiran, 2008)). De plus, les patients en rejet chronique présentent une augmentation de la fréquence des LT CD8 effecteurs circulants, comparé à des patients en état de tolérance opérationnelle (Baeten et al., 2006).

Chapitre 2 : Les immunosuppresseurs et leur action sur les cellules immunitaires

Pour éviter le rejet de greffe, les patients transplantés bénéficient d'un traitement immunosuppresseur afin d'inhiber la réponse immunitaire allogénique et donc le rejet. Le principe général de l'immunosuppression est d'agir sur les différents signaux d'activation du LT allo-réactif (**Figure 13**).

1. Les différents traitements immunosuppresseurs

Les traitements réduisent l'efficacité du système immunitaire de façon générale pour l'empêcher de réagir contre le greffon. La plupart des agents immunosuppresseurs ciblent les

LT allo-réactifs, en les déplétant ou en bloquant leurs voies de signalisation, d'activation, leur prolifération ou leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires.

1.1. Traitement d'induction

Le traitement d'induction est administré dans les premiers jours de la transplantation et son intensité est adaptée au risque immunologique du patient par les cliniciens (immunisation préalable, transplantation antérieure, existence de DSA...). Il est constitué d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux pour diminuer la réponse immune du receveur et ainsi éviter le rejet précoce de l'organe. Le principe est d'instaurer une immunosuppression forte au moment où le risque de rejet est le plus élevé. Deux traitements sont principalement utilisés : le sérum anti-lymphocytaire (Thymoglobuline®) ou les anticorps monoclonaux anti-CD25 (basiliximab). Le sérum anti-lymphocytaire est produit chez le lapin, lesquels sont immunisés par exposition à des cellules thymiques humaines. Les anticorps produits vont donc cibler les LT humains. Les anticorps monoclonaux anti-CD25 (basiliximab) vont se fixer à la chaîne α du récepteur de l'IL-2, empêchant l'IL-2 de s'y fixer et donc d'agir comme facteur de croissance des LT activés (Hertig & Rondeau, 2006).

1.2. Traitement d'entretien

Le traitement d'entretien est le traitement que prend le patient au long cours.

Plusieurs familles principales d'immunosuppresseurs existent : les corticoïdes, les inhibiteurs de la calcineurine (CNI), les anti-métabolites et les inhibiteurs de mTOR. Le « *gold standard* » dans les pays développés a longtemps reposé sur une trithérapie composée d'un antimétabolite, d'un corticoïde et d'un CNI (Ekberg et al., 2007).

1.2.1. Les inhibiteurs de la calcineurine (CNI)

La calcineurine est une phosphatase impliquée dans la signalisation du TCR et ses deux principaux CNI utilisés en transplantation rénale sont la ciclosporine A (CsA) et le tacrolimus.

1.2.1.1. Mécanismes d'action dépendants de la calcineurine

La CsA a été isolée du champignon *Hypocladium inflatum* et a été utilisée dès la fin des années 1970 dans le traitement contre le rejet de greffe. Sa synthèse chimique a permis de l'utiliser plus largement et d'éviter la myélosuppression induite par l'azathioprine. Si le

tacrolimus et la CsA n'ont pas la même structure chimique, leur mécanisme d'action est malgré tout similaire.

Les CNI ne se lient pas directement à la calcineurine mais à des molécules associées. Le tacrolimus (ou FK506) se lie à FKBP12 (pour *FK binding protein*) et la CsA se lie à la cyclophiline A. Ces deux complexes sont capables de se lier à la calcineurine et d'inhiber son activité enzymatique, ce qui empêche la translocation de NFAT dans le noyau et donc l'expression de l'IL-2 (**Figure 12**) (Stepkowski, 2000).

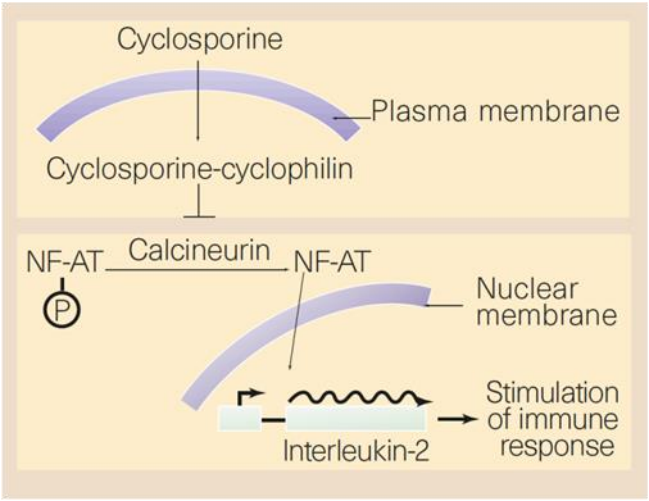


Figure 12 : Mécanisme d'action principal de la CsA (Nabel, 1999)

La calcineurine est également impliquée dans l'activation du facteur de transcription NF-κB, en induisant indirectement la dégradation de l'inhibiteur IκB. L'inhibition de la calcineurine est donc également associée au maintien de l'inhibition de NF-κB (pour revue (Barbarino et al., 2013)).

1.2.1.2. Mécanismes d'action indépendants de la calcineurine

Il existe trois sous-groupes de MAPK : ERK, JNK et p38. La CsA et le tacrolimus sont capables, indépendamment de la calcineurine, d'inhiber les voies JNK et p38, ce qui entraîne l'inhibition de l'activation d'AP-1 (pour revue (Barbarino et al., 2013)).

La force de ces CNI est qu'une seule molécule cible l'expression des trois facteurs de transcription clefs de l'activation des LT : NFAT, NF-κB et AP-1.

1.2.2. Les antimétabolites

Les principaux antimétabolites sont l'acide mycophénolique et l'azathioprine. Ils ont pour fonction d'inhiber la synthèse d'ADN.

L'acide mycophénolique est un inhibiteur de l'inosine monophosphate déshydrogénase qui est impliquée dans la synthèse *de novo* de la GMP (guanosine monophosphate) (Hulin, 2008).

L'azathioprine, dont le principe actif est la 6-mercaptopurine, est un analogue des bases puriques de l'ADN et de l'ARN capable de s'intégrer dans l'ADN et d'inhiber les étapes précoces du métabolisme de ces bases azotées. Cette molécule entraîne l'inhibition de la phosphoribosyl-pyrophosphate synthase, empêchant la production d'adénosine monophosphate (AMP) et de GMP (Hulin, 2008). L'absence de ces molécules de base empêche la synthèse d'ADN.

L'activation des LB et des LT implique une expansion clonale et nécessite donc la synthèse de nucléotides, d'ADN et d'ARN. L'inhibition de cette synthèse inhibe la prolifération des lymphocytes.

Ces antimétabolites sont cependant susceptibles de provoquer des effets indésirables de type hématotoxicité, hépatotoxicité et toxicité digestive.

1.2.3. Les inhibiteurs de mTOR

Les principaux inhibiteurs de mTOR utilisés en transplantation rénale sont le sirolimus et l'éverolimus. Ces deux molécules se lient à l'immunophiline FKBP12 et ce complexe inhibe mTOR. Dans les LT, mTOR est une sérine/thréonine kinase, laquelle une fois activée *via* le TCR ou les récepteurs de cytokines, conduit *in fine* à la prolifération, la différenciation et la survie des cellules (Zeng & Chi, 2013). Le sirolimus et l'éverolimus empêchent ainsi le cycle cellulaire de passer de la phase G1 à la phase S, inhibant donc la prolifération des LT. Ces molécules sont considérées comme des inhibiteurs du signal 3 car ils empêchent la transduction du signal induit par les cytokines.

1.2.4. Les corticoïdes

Les glucocorticoïdes sont capables de se fixer sur leur récepteur cytoplasmique. Le complexe ainsi formé migre vers le noyau et peut se fixer sur l'ADN sur des GRE (pour *glucocorticoid response element*) et ainsi réguler la transcription de gènes. Ils vont ainsi inhiber la

transcription des gènes immuns, comme l'IL-2. Le complexe est également capable d'interagir avec des facteurs de transcription comme NF-κB, dont l'inhibition empêche la transcription de gènes de l'IL-2 et d'autres cytokines pro-inflammatoire.

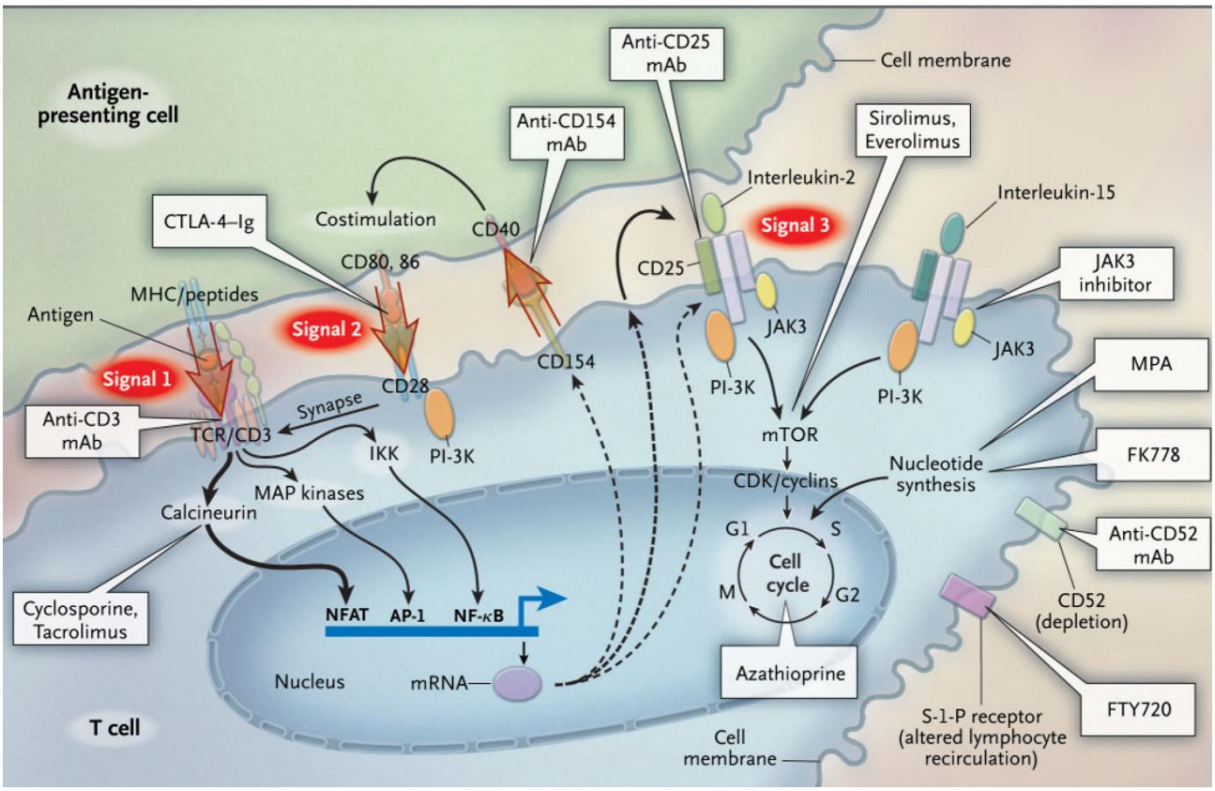


Figure 13 : Sites d'action des différentes molécules immunosuppressive dans la signalisation des LT (Halloran, 2004).

2. Immunosuppression et cancer

L'exposition chronique aux molécules immunosuppressives est associée à une augmentation du risque de cancer. Par exemple, une analyse chez les patients transplantés aux USA entre 1987 et 2008 (tous organes confondus) a permis de révéler un risque deux fois plus élevé que la population générale de développer un cancer (tous types de cancers confondus) (Engels et al., 2011).

Les molécules immunosuppressives peuvent avoir un effet pro-tumoral intrinsèque, comme l'azathioprine, qui entraîne l'accumulation de 6-thioguanine pouvant créer des dommages à l'ADN ou les CNI qui, en inhibant l'ADN polymérase β, diminuent la capacité des cellules à réparer leur ADN (Ahlers et al., 1999).

Cependant, si ces modes d'action des immunosuppresseurs ne sont pas négligeables, le fait même de diminuer les réactions du système immunitaire, impactant l'immuno-surveillance

des cancers et la capacité à éliminer les cellules tumorales de l'organisme, est aussi à l'origine du développement de cancer.

Ce phénomène peut s'expliquer par l'immuno-édition des cancers. Cette théorie est née dans les années 1950 et a été affinée par R. Shreiber et son équipe dans les années 2000. Ce processus est décomposé en trois phases, les « trois E de l'immuno-édition » : élimination, équilibre, échappement. Lors de la phase d'élimination, les cellules anormales sont décelables et éliminées par le système immunitaire, inné comme adaptatif. Il peut arriver que ce processus ne soit pas complètement efficace et que le système immunitaire échoue à détruire toutes les cellules tumorales. Cependant, celui-ci est capable de contenir la croissance de ces cellules : c'est la phase d'équilibre, laquelle peut durer plusieurs années. Cependant, cette pression constante du système immunitaire induit la sélection de cellules aptes à échapper à la détection ou à l'élimination par le système immunitaire. Celui-ci est dépassé et perd le contrôle de la progression tumorale : c'est la phase d'échappement, la tumeur devenant alors cliniquement décelable (Dunn et al., 2004). Divers exemples cliniques ont permis d'observer l'existence de ces trois phases, en particulier de la phase d'équilibre. Ainsi deux patients transplantés ayant reçu les reins d'un même donneur ont développé des mélanomes métastatiques bien qu'aucune tumeur primaire n'ait pu être détectée. Les cellules cancéreuses provenaient du donneur, qui avait développé un mélanome quinze ans avant le don d'organe. (MacKie et al., 2003). De plus, des patients immunodéprimés sans traitement immunosuppresseur, comme les patients atteints du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise), présentent, de façon similaire aux patients transplantés, une augmentation de l'incidence des cancers, en particulier des cancers viro-induits, dont la réplication et l'oncogenèse sont favorisés par l'immunosuppression.

Certains cancers sont spécifiquement augmentés chez les patients transplantés, comme les cancers de la peau non-mélanome (NMSC pour *non melanoma skin cancer*), les cancers viro-induits et les lymphomes malins non-hodgkinien. Les données présentées dans le **Tableau 1** montrent dans une étude britannique l'incidence augmentée de cancers chez des patients transplantés rénaux (Sherston et al., 2014). Parmi les cancers viro-induits, on peut citer les lymphomes non Hogkiniens liés à EBV (virus Epstein-Barr), le sarcome de Kaposi lié à HHV8 (virus de l'herpès humain 8) ou les cancers de la cavité orale ou du col de l'utérus lié à HPV (Grulich et al., 2007). En plus d'une augmentation du risque de développer des cancers,

les patients transplantés présentent une croissance tumorale et métastatique plus rapide que la population générale (Sherston et al., 2014).

Le traitement immunosuppresseur doit donc être adapté à chaque patient, afin de maintenir un équilibre entre la tolérance du greffon et le risque de cancer.

Tableau 1 : Rapport standardisé d'incidence (SIR, pour *standardized incidence ratio*) pour les cancers les plus fréquents chez les patients transplantés rénaux au Royaume-Uni, adapté de (Sherston et al., 2014)

Cancer	SIR (Royaume-Uni)
Lèvre	65,6
Sarcome de Kaposi	17,1
NMSC	16,6
Lymphome non-Hodgkinien	12,5
Anal	10,0
Rein	7,9
Myélome	3,3
Mélanome	2,6
Voies urinaires	2,4
Foie	2,4
Col de l'utérus	2,3
Colorectal	1,8
Pancréas et voies biliaires	1,5
Appareil respiratoire	1,4
Prostate	1,1
Sein	1,0

Chapitre 3 : La tolérance en transplantation rénale

1. Du concept de tolérance immunologique à la définition clinique de tolérance

Le concept de tolérance découle des travaux d'Owen dès 1945 chez des jumeaux bovins (tolérance néonatale) puis développé par Burnet en lien avec la théorie du soi et du non soi. Ainsi Burnet postule que la tolérance permet au système immunitaire de maintenir l'intégrité du soi en empêchant une auto-réactivité destructrice pour l'individu.

Puis Medawar et son équipe décrivirent dans les années 1950 l'induction de tolérance, caractérisée par une inhibition spécifique de la réponse immunitaire induite lorsqu'un individu est confronté durant sa vie fœtale à des cellules allo-géniques (Billingham et al., 1953). Cette tolérance repose sur des phénomènes de délétion des cellules immunes allo-réactives,

principalement au sein du thymus (tolérance centrale), ou de régulation par l'intermédiaire de cellules immunorégulatrices produites dans le thymus ou dans les organes périphériques et agissant en périphérie (tolérance périphérique).

Sur le plan clinique, plusieurs définitions de la tolérance en transplantation d'organe peuvent être proposées, décrites dans le sous-chapitre 5 de ce chapitre. En bref, il s'agit de la tolérance immunitaire « vraie » qui se définit par l'absence de réponse immunitaire délétère pour le greffon, chez un individu immunocompétent ; la tolérance opérationnelle se définit quant à elle plus « cliniquement » par l'absence de rejet de greffe en l'absence de prise de traitement immunosuppresseur. Pour les patients immunocompétents qui présentent une survie et une fonction du greffon stable avec un traitement immunosuppresseur d'entretien minimisé, on parle de « pseudo-tolérance ».

Notons qu'il est difficile à ce jour de relier chacune de ces définitions immuno-cliniques de la tolérance en transplantation à l'implication de mécanismes biologiques précis de tolérance (centrale, périphérique).

2. La tolérance centrale

L'acquisition de la tolérance centrale des LT aux antigènes du soi se déroule dans le thymus au cours des sélections positive et négative. Les TCR sont formés par de multiples réarrangements aléatoires des gènes qui les composent, créant un très large répertoire T (10^{10} combinaisons possibles de récepteurs).

Lors de l'étape de sélection positive, seuls survivent les thymocytes dont le TCR est capable de reconnaitre un antigène présenté par les molécules du CMH du soi présentées par des cellules épithéliales thymiques (Merkenschlager et al., 1997).

La sélection négative permet de contre-sélectionner les TCR qui interagissent fortement avec les auto-antigènes. Les antigènes du soi sont présentés aux thymocytes par des cellules dendritiques et des cellules épithéliales thymiques. Ces dernières ont la particularité d'exprimer de façon ectopique des antigènes tissulaires sous le contrôle du facteur de transcription AIRE (pour *auto-immune regulator*) (Derbinski et al., 2001). Certaines mutations du gène codant AIRE et rendant la protéines dysfonctionnelle conduisent chez l'humain à un syndrome auto-immun nommé « auto-immune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy » (APECED) (Mathis & Benoist, 2007) (pour revue (Lopes et al., 2015). Selon l'affinité du TCR pour le complexe CMH/peptide du soi, trois situations sont

possibles. Une faible affinité sélectionne des LT « classiques », une forte affinité entraîne la délétion des thymocytes auto-réactifs, et une affinité intermédiaire génère des LT régulateurs (Jordan et al., 2001), lesquels contribuent à la tolérance dite active en périphérie (cf. sous-chapitre 4).

La tolérance centrale peut être utilisée pour induire la tolérance de greffe. Un des mécanismes utilisés en transplantation pour induire la tolérance spécifique est la greffe de cellules souches hématopoïétiques du donneur au receveur en plus de l'organe d'intérêt. Dans les premiers modèles animaux, cette technique a permis de prolonger la survie de greffe et d'induire une tolérance spécifique d'îlots pancréatiques (Panijayanond & Monaco, 1974) ou de peau (Ildstad & Sachs, 1984). Les animaux ainsi générés tolèrent le greffon mais sont réactifs contre les antigènes d'un autre donneur. En effet, les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse du donneur vont, comme les cellules souches du receveur, produire des précurseurs des LT et DC qui vont coloniser le thymus. Le processus de sélection négative entraîne une délétion centrale des LT reconnaissant les antigènes du donneur (pour revue (Zuber & Sykes, 2017)).

3. La tolérance périphérique

Malgré les étapes de sélection dans le thymus, certains LT auto-réactifs peuvent subsister et générer alors des maladies auto-immunes. Des mécanismes périphériques permettent de minimiser ce risque. Ces mécanismes comprennent l'anergie, la délétion clonale, l'ignorance, la déviation immune et la tolérance active, qui met en jeu des éléments cellulaires suppresseurs/régulateurs.

L'anergie correspond à une inactivation fonctionnelle face à un antigène. Les cellules en question sont incapables de proliférer, par exemple lors d'un engagement du TCR (signal 1) en l'absence de signal de costimulation (signal 2) (Schwartz, 2003). Ces cellules conservent cependant leurs capacités fonctionnelles et pourront être pleinement activées ultérieurement.

La délétion clonale périphérique entraîne l'élimination des LT, permettant de contrôler les réponses T non appropriées afin d'éviter les phénomènes d'auto-immunité. Deux formes d'apoptose peuvent être mises en œuvre : la mort « passive » (par privation de facteurs de croissance) ou la mort « active » (lorsque la stimulation répétée du TCR fait intervenir les voies Fas/FasL et du récepteur au TNF) (Van Parijs et al., 1996). Une activation incomplète des LT par manque de signaux de costimulation peut entraîner l'activation de la délétion

clonale (Ferber et al., 1994; Li et al., 1999). Les leucocytes présents dans le greffon au moment de la transplantation pourraient induire une délétion clonale périphérique des clones allo-réactifs, par les mécanismes ci-avant mentionnés (Morris et al., 2015; Wekerle et al., 2001).

L'ignorance a été décrite en 2000 chez des souris déficientes en organes lymphoïdes secondaires qui acceptaient une greffe de peau ou de cœur sans rejet à cause d'une incapacité des LT à être activés par les antigènes du donneur (Lakkis et al., 2000). Ce phénomène peut être induit lorsque la quantité d'antigène n'est pas suffisante pour induire une réaction ou lorsque l'antigène et les LT sont physiquement séparés (cas des organes privilégiés comme la cornée) (pour revue (Simpson, 2006)).

La déviation immune est une réorientation de la réponse immunitaire, induisant une alternative non pathogène. Par exemple, l'injection à des souris de cellules Th1 spécifiques du peptide 139-151 de la PLP (pour *proteolipid protein peptide*) induit une encéphalomyélite auto-immune expérimentale. Cependant, la co-culture préalable de ces cellules avec des LT spécifiques du peptide APL (pour *altered peptide ligand*) prévient le développement de la maladie par une déviation de la réponse de type Th1 vers une réponse de type Th2 (Young et al., 2000).

La tolérance active est induite par un contact préalable de LT dits régulateurs/suppresseurs avec un antigène et peut être transmise à un animal naïf par le transfert de ces cellules spécifiques dudit antigène (Morgan et al., 2005; Scalapino et al., 2006; Tarbell et al., 2007; Xingmin Zhang et al., 2004). Cette tolérance est principalement assurée par les LT CD4 régulateurs (Treg).

4. Les LT CD4 régulateurs

4.1. Les Treg, description

La fonction principale des Treg est d'inhiber la réponse et les autres populations immunitaires. Ainsi, ils jouent un rôle clef dans la tolérance des antigènes du soi, le contrôle de la réponse inflammatoire et le maintien de l'homéostasie immunitaire. Mais ils sont également impliqués dans d'autres fonctions telles que l'homéostasie et la réparation tissulaires.

Les Treg ont été isolés pour la première fois en 1995 lorsque S. Sakaguchi et ses collègues s'intéressent aux LT CD4 CD25(+) murins, capables de prévenir les lésions d'auto-immunité provoquées par des LT CD4 effecteurs (CD25(-)) (Sakaguchi et al., 1995). Ces cellules sont caractérisées par l'absence de prolifération après stimulation du TCR et la capacité d'inhiber *in vitro* la prolifération des LT CD4 et CD8 après stimulation du TCR ou en présence de CPA (Takahashi et al., 1998; Thornton & Shevach, 1998). Ces Treg CD4(+) CD25(+) ont par la suite été décrits chez l'humain en 2001 (Dieckmann et al., 2001; Jonuleit et al., 2001; Levings et al., 2001).

Dans les années 2000, le gène codant le facteur de transcription FoxP3, qui contrôle le développement et la fonction suppressive des Treg, a permis de mieux restreindre cette population chez la souris (Brunkow et al., 2001) et l'humain (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003; Roncador et al., 2005). La mutation de ce gène induit une maladie auto-immune, le syndrome IPEX (pour Immunodérégulation, Polyendocrinopathie, Entéropathie lié au chromosome X), létal pendant l'enfance (Bennett et al., 2001; Wildin et al., 2001).

Les Treg peuvent être générés par des auto-antigènes dans le thymus (Jordan et al., 2001) ; on les dénomme alors t(*thymic*)Treg ou n(*natural*)Treg. Ils peuvent aussi résulter de la stimulation de LT naïfs par des antigènes étrangers, mais non dangereux tels que les antigènes bactériens du microbiote ou les allergènes de l'alimentation ou de l'environnement (pour revue (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009)) ; on les dénomme alors p(*peripheral*)Treg. Il existe également des i(*induced*)Treg (Chen et al., 1994; Groux et al., 1997).

4.2. Les Treg, mécanismes d'action

Les Treg utilisent plusieurs mécanismes d'action pour réguler la réponse immunitaire et inhiber la croissance des effecteurs de cette réponse (**Figure 14**).

4.2.1. Mécanismes d'actions régulateurs intrinsèques des Treg

Via les molécules de costimulation, les Treg sont capables de moduler les fonctions des CPA. Par exemple, les Treg humains sont capables d'induire une diminution de l'expression des molécules CD80 et CD86 des CPA, altérant leur capacité à proliférer et à présenter efficacement un antigène (Misra et al., 2004).

Les Treg sont capables de sécréter des cytokines qui participent à leur fonction régulatrice. Trois cytokines principales sont décrites : l'IL-10, le TGF-β et l'IL-35. Le récepteur de l'IL-10 est exprimé à un niveau basal par la majorité des cellules immunitaires. L'activation de ce récepteur entraîne l'activation de kinases aboutissant à l'activation du facteur de transcription STAT3, ce qui induit l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α, l'IL-6 ou l'IL-1-β (Shouval et al., 2014). Le TGF-β est produit par les Treg après la stimulation de leur TCR et est impliqué dans leur fonction suppressive. Des expérience de co-culture en *transwell* suggèrent que le TGF-β n'est pas sécrété mais est exposé à la membrane des Treg (Nakamura et al., 2001). Ces données *in vitro* ont été confirmée *in vivo* (Green et al., 2003). En 2007, une nouvelle cytokine exprimée de façon constitutive par les Treg mais pas par les LT effecteurs est découverte : l'IL-35. Elle est composée des chaînes IL-12α et IL-27β ; de façon intéressante, cette dernière se trouve sous le contrôle du facteur de transcription FoxP3. Les Treg déficients en l'une de ces deux chaînes présentent une activité régulatrice diminuée *in vitro* et ne parviennent pas à contrôler les inflammations auto-immunes de l'intestin *in vivo* (Collison et al., 2007). Si le mécanisme d'action de l'IL-35 n'est pas encore compris, l'induction de l'expression de cette cytokine chez la souris est associée à une augmentation de la fréquence des Treg et à une augmentation de la survie après allogreffe cardiaque (Guo et al., 2013).

Les Treg, grâce à leur forte expression de CD25, sont capables d'internaliser de grandes quantité d'IL-2, induisant un effet de compétition pour les autres populations lymphocytaires vis-à-vis de ce facteur de croissance (Barthlott et al., 2005; Scheffold et al., 2005). Or, en cas de privation en cytokines, les LT sont susceptibles d'entrer en apoptose, notamment *via* la protéine Bim, les LT murins déficients en Bim étant protégés de l'apoptose induite par la privation en cytokines causée par les Treg (Bouillet et al., 1999; Pandiyan et al., 2007).

Les Treg sont aussi capables, grâce à l'expression des ectoenzymes CD39 et CD73 de transformer l'ATP (pour *adenosine triphosphate*), un signal de danger, en AMP (CD39) puis en adénosine (CD73), une molécule immunosuppressive. Cette fonction est bien caractérisée chez la souris, CD39 étant constitutivement exprimé par les Treg murins et son expression induite par FoxP3 (Borsellino et al., 2007). Cependant, chez l'humain, si CD39 est majoritairement exprimé par les Treg, son expression varie en fonction des individus. De plus, si la majorité des Treg murins co-expriment CD39 et CD73, ce n'est pas le cas chez l'humain, où l'expression de CD73 est bien plus variable (Antonioli et al., 2013; Borsellino et al., 2007).

Les Treg sont aussi capables de communiquer directement avec les LT effecteurs par des contacts cellulaires à travers les jonctions gap. Les Treg contiennent des concentrations importantes d'AMPc (pour *adenosine monophosphate cyclique*), un second messager qui est un puissant inhibiteur de la prolifération et de la synthèse d'IL-2 pour les LT, qu'ils peuvent ainsi transférer aux LT effecteurs (Bopp et al., 2007). Il semble que les Treg soient également capables de produire la perforine et des granzymes, selon un mécanisme semblable aux LT CD8 mémoires et aux NK chez l'humain (Grossman et al., 2004) et la souris (Gondek et al., 2005; Zhao et al., 2006).

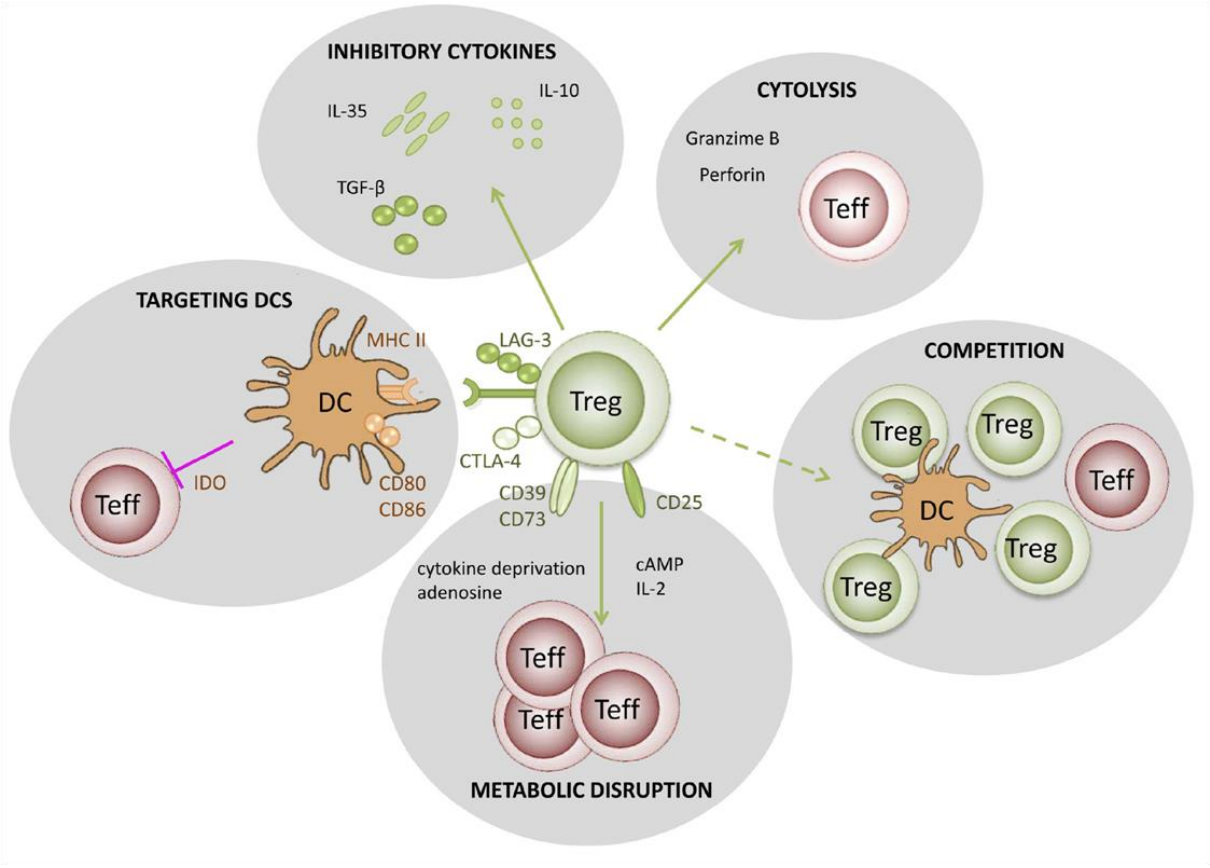


Figure 14 : Mécanismes d'action des Treg (Caridade et al., 2013)

4.2.2. Coopération avec d'autres cellules

Les Treg peuvent coopérer avec d'autres populations cellulaires qui exerceront à leur tour la fonction de régulation des Treg.

Ainsi, il a été observé que les Treg humains étaient capables de modifier les propriétés des CPA et de les rendre régulatrices et non plus activatrices. Des travaux indiquent que ce mécanisme passerait par l'induction de l'expression de B7-H4 (membre de la famille B7 à

laquelle appartiennent CD80 et CD86) à la surface des CPA (Kryczek et al., 2006). Cette capacité a également été observée dans des monocytes qui présentent, après incubation avec des Treg, un phénotype M2 et une capacité réduite à produire des cytokines pro-inflammatoires (Romano et al., 2018; Tiemessen et al., 2007), ainsi que dans des polynucléaires neutrophiles qui produisent alors plus d'IL-10 et de TGF-β après incubation avec des Treg (Lewkowicz et al., 2013). Des travaux récents confirment que des monocytes humains mis en culture en présence de Treg et de T *helper* sont capables de se différencier en cellules dendritiques régulatrices (DCreg) capables de générer des Treg à partir de LT naïfs. Ce mécanisme a été observé *in vivo* dans des échantillons tumoraux humains et pourrait contribuer à la tolérance immunitaire dans les tissus (Xiangyue Zhang et al., 2020).

Les Treg peuvent aussi coopérer avec des cellules qui possèdent déjà des propriétés régulatrices telles que les iNKT, qui sont aussi impliqués dans la tolérance active périphérique. Si ces deux populations sont le plus souvent étudiées séparément, certaines données suggèrent un *cross-talk* entre elles, les iNKT activés pouvant moduler quantitativement et qualitativement la fonction des Treg par des mécanismes faisant intervenir l'IL-2 tandis que les Treg peuvent réguler la fonction des iNKT par un contact cellulaire. Par exemple, dans un modèle murin de maladie auto-immune, les iNKT et les Treg coopèrent et participent ensemble au maintien de la tolérance du soi (R. Liu et al., 2005). Les Treg et iNKT partagent des voies de signalisation qui pourraient expliquer leurs réponses concertées (pour revue (La Cava et al., 2006)).

4.2.3. Fonctions dites « non immunitaires » des Treg

Outre leur rôle dans la régulation de la réponse immune, les Treg sont aussi impliqués dans d'autres fonctions telle que la réparation tissulaire.

Après une lésion tissulaire, la réponse inflammatoire associée conduit au recrutement de cellules impliquées dans la réparation. Divers modèles ont permis de mettre en évidence l'implication des Treg dans ce processus. Par exemple, dans l'infarctus du myocarde chez la souris, les Treg limitent les lésions tissulaires et promeuvent la régénération. La délétion des Treg est associée à une inflammation cardiaque plus importante et une fonction cardiaque altérée. De plus, les Treg inhibent la dégradation de la matrice extracellulaire par les métalloprotéases (empêchant ainsi d'aggraver la lésion) et produisent des cytokines (TGF-β1, IL-13, IL-10) qui vont induire le phénotype M2 des monocytes/macrophages, favorisant la

réparation (Weirather et al., 2014). Cette fonction a été démontré dans divers modèles, tels que la réparation des muscles squelettiques (Burzyn et al., 2013; Castiglioni et al., 2015), du foie, du rein, des poumons ou de l'intestin ainsi que dans le maintien de l'homéostasie énergétique du tissu adipeux viscéral (pour revue (Zhang et al., 2017)).

Les mécanismes de réparation peuvent faire intervenir des enzymes comme CD39 et CD73 (Ehrentraut et al., 2013; Xia et al., 2015). Cependant, le mécanisme majeur de réparation des Treg tissulaires met en jeu la production d'amphiréguline, un facteur de croissance impliqué dans la réparation de la muqueuse intestinale, de l'épithélium pulmonaire ou du muscle squelettique (pour revue (Zhang et al., 2017)).

Enfin, les Treg sont susceptibles d'être impliqués dans la réparation suite aux lésions d'ischémie-reperfusion après transplantation d'organe. Chez l'animal, il a été montré que les Treg étaient recrutés dès 24 heures après la reperfusion et persistaient entre 3 à 10 jours (Gandolfo et al., 2009). Dans des modèles animaux, le transfert adoptif de Treg avant une séquence d'ischémie-reperfusion rénale protège les animaux contre les lésions rénales (Cho et al., 2010; Kinsey et al., 2010) tandis que le transfert adoptif de Treg après la séquence d'ischémie-reperfusion diminue la production d'IFN-γ et accélère la réparation tissulaire (Gandolfo et al., 2009).

5. Tolérance et immunosuppression

Même s'il est plus rare dans les autres organes que le foie, un état de tolérance opérationnelle a été décrit chez des patients transplantés rénaux (Brouard et al., 2012; Burlingham et al., 1995; Fischer et al., 1996; Orlando et al., 2010; Roussey-Kesler et al., 2006; Strober et al., 2000). Dans la plupart des cas, l'arrêt du traitement n'est pas prescrit par le médecin mais résulte d'un défaut d'adhésion du patient aux traitements immunosuppresseurs.

Les mécanismes qui sous-tendent la tolérance opérationnelle ne sont cependant pas encore complètement élucidés. Ainsi un micro-chimérisme a été observé pour un patient au niveau des lymphocytes du sang et de la peau, la tolérance semblant être maintenue grâce à des cellules régulatrices et à l'anergie (Burlingham et al., 1995). Dans un autre cas, les cellules du receveur réagissaient faiblement contre les cellules du donneur (son père), avec une faible production de cytokines (IL-2) (Christensen et al., 1998). Dans une étude de Fudaba et collègues, la transplantation combinée de rein et de moelle osseuse semble induire un chimérisme transitoire sans réponse spécifique anti-donneur chez 3 des 6 patients (Fudaba et

al., 2006). Une analyse transcriptionnelle des LT circulants montre que chez les patients tolérants opérationnels, peu ou pas de transcrits de cytokines pro-inflammatoire sont produits, suggérant une diminution de la réponse immunitaire par rapport aux patients en rejet chronique (Brouard et al., 2005).

Enfin citons une autre situation décrite depuis une vingtaine d'année, celle de « pseudo-tolérance » (concept de *prope tolerance*) pour les patients immunocompétents qui présentent une survie et une fonction stable du greffon avec un traitement immunosuppresseur d'entretien minimisé (Calne, 2004; Cortesini & Suciu-Foca, 2004). Les premiers travaux décrivant la pseudo-tolérance ont été réalisés chez des patients à l'immunosuppression minimisée par une approche de monothérapie par CsA à faible dose (Calne et al., 1998). Le bénéfice clinique attendu est la diminution des effets secondaires délétères de l'immunosuppression (y compris de l'incidence des cancers).

Depuis ces premiers résultats, plusieurs équipes, dont la nôtre, ont étudié différentes approches de minimisation de l'immunosuppression dans différents types de transplantation d'organe (Knechtle et al., 2003; Shapiro et al., 2003; Starzl et al., 2003; Swanson et al., 2002; Thierry et al., 2016), avec souvent des résultats encourageants chez des patients à faible risque immunologique. Cependant, s'il est possible de cibler des patients éligibles à une minimisation des traitements, il n'existe pas de marqueurs prédictifs de tolérance opérationnelle.

Chapitre 4 : Les LT non conventionnels en transplantation rénale

L'étude des LT CD8 innés en transplantation n'a pas encore été réalisée. Cependant, les autres populations de LT non conventionnels ont pu l'être et ouvrent des perspectives quant à la place des LT CD8 innés en transplantation.

L'étude des iNKT dans le domaine de la transplantation s'intéresse principalement à leur rôle dans les temps précoces de la transplantation, en particulier au cours des lésions d'ischémie reperfusion qui ont lieu au moment où l'organe est reperfusé dans l'organisme du receveur (Barbier, 2019; Ferhat et al., 2018), et aussi à leur rôle au cours de la GVHD (pour *graft versus host disease*) après greffe de cellules souches hématopoïétiques (Chaidos et al., 2012) (pour revue (Mavers et al., 2017)). Quant aux MAIT, ils sont très peu étudiés en

transplantation. Selon les quelques résultats disponibles, ils ne semblent jouer aucun rôle particulier dans ce domaine (Baron et al., 2014; Terpstra et al., 2020).

Le rôle des LT-γδ est un peu mieux connu dans le domaine de la transplantation, même s'ils peuvent avoir différents rôles favorables ou délétères envers la tolérance du greffon, rendant peu compris l'effet global de ces cellules (pour revue (Sullivan et al., 2019)). Ils sont impliqués dans le contrôle de l'infection au CMV, par un mécanisme indépendant du TCR, limitant ainsi la multiplication du virus (Couzi et al., 2012), virus qui est associé à une augmentation de la mortalité et de la morbidité après transplantation et à une diminution de la survie du greffon (Hodson et al., 2005). Les LT-γδ pourraient également avoir une fonction anti-tumorale. En effet, chez des patients transplantés rénaux, le pourcentage médian des LT-γδ est significativement diminué chez les patients ayant développé un cancer après la transplantation comparativement aux patients n'en ayant pas développé (Couzi et al., 2010). Cependant, les LT-γδ peuvent aussi avoir un rôle délétère chez les patients transplantés. Il a ainsi été démontré que ces cellules pouvaient être impliquées dans les lésions d'ischémie-reperfusion chez l'animal, dans la génération de GVHD après greffe de cellules souches hématopoïétiques ou dans des dysfonctions du greffon rénal (pour revue (Sullivan et al., 2019)).

Concernant la tolérance de l'allogreffe, les LT-γδ semblent contribuer à l'issue favorable de la transplantation *via* la suppression de la réponse immune, une sous-population de LT-γδ CD8(+) régulateurs ayant été retrouvée diminuée chez des patients transplantés rénaux en rejet (Malan Borel et al., 2003). De façon complémentaire, un nombre plus élevé de LT-γδ CD8(+) régulateurs est associé à une meilleure survie dans un modèle de transplantation rénal chez le rat (Zhou et al., 2008).

Quatrième partie. Hypothèses de travail et objectifs

La transplantation d'organe s'est développée avec la découverte des traitements immunosuppresseurs induisant pharmacologiquement la tolérance des greffons. L'un des défis de la transplantation aujourd'hui est de parvenir à cibler spécifiquement les cellules immunitaires impliquées dans le rejet ou la tolérance du greffon, ce d'autant plus que les traitements immunosuppresseurs sont associés à des effets indésirables. Au fur et à mesure de leur découverte, de nouvelles populations immunitaires sont testées pour leur possible rôle dans la tolérance/rejet d'organe. Si plusieurs études ont déjà été dédiées aux trois populations T non conventionnelles les plus connues (iNKT, MAIT, LT-γδ), il reste que le statut immunitaire et le rôle physiopathologique de notre nouvelle population T CD8 innée n'a encore jamais été évalué en transplantation d'organe. De plus, certains auteurs associent les LT CD8 exprimant des marqueurs NK à l'immunosénescence. Or, un autre des défis actuels de la transplantation d'organe est l'âge croissant des donneurs et des receveurs à la transplantation, ce qui pose la question de l'évolution du statut de la réponse immunitaire vis-à-vis du greffon au cours du vieillissement. Malgré le rôle essentiel des LT CD8 dans le rejet et leur propension particulière à devenir sénescentes, ces éléments du compartiment T CD8 ne sont pas à notre connaissance encore documentés en transplantation d'organe.

Notre hypothèse est que la transplantation rénale est susceptible d'entraîner une (re)programmation des LT CD8 innés (*via* la stimulation antigénique chronique ?). En effet, il a été démontré que des stimulations antigéniques chroniques (virales par exemple) pouvaient induire l'expression de marqueurs de cellules NK par les LT CD8, qui présentent alors des similitudes phénotypique et fonctionnelles avec nos LT CD8 innés d'intérêt, et souvent associés à la sénescence. Or, en transplantation, les antigènes du greffon sont présents pendant une longue période de temps, de l'ordre de plusieurs décennies.

Le premier objectif de cette étude pilote est d'étudier le phénotype de sénescence et de différenciation terminale ainsi que le caractère effecteur des LT CD8 innés chez les patients transplantés rénaux. Pour cela, nous utiliserons des CMN issues de patients transplantés rénaux stables que nous analyserons par cytométrie en flux. Les critères d'inclusion des patients sont les suivants : une transplantation rénale datant de plus de dix ans, une fonction rénale stable, une absence de signe de rejet et un traitement immunosuppresseur minimisé : la CsA en monothérapie et à faible dose. Ce traitement nous permet de ne considérer que des

patients en état de pseudo-tolérance et ainsi de nous affranchir le plus possible d'effets intrinsèques des traitements immunosuppresseurs.

Le deuxième objectif, parallèle, est de mieux comprendre la biologie et la fonction des LT CD8 innés de manière générale, la situation « pathologique » apportant par contraste des connaissances sur le rôle et le fonctionnement normaux de ces cellules encore peu connues.

RESULTATS

Allotransplantation is associated with exacerbation of CD8 T-cell senescence the particular place of the innate CD8 T-cell component

Lauren Daniel, Marion Tassery, Clara Lateur Antoine Thierry, Jean-Marc Gombert, André Herbelin, Alice Barbarin

Publié dans Frontiers in Immunology ; Research Topic « Immune Aging: Implications for Transplantation ».

La première partie de ce manuscrit comprend un résumé et une discussion des données de la littérature relatives à l'effet du vieillissement du système immunitaire sur les LT, en particulier les LT CD8, avec notamment une perte de l'expression de molécules de co-stimulation, des modifications du métabolisme énergétique et la diminution de la signalisation du TCR, suggérant que les LT CD8 vieillissants passent d'une activation de type adaptative à une activation de type inné.

Les LT CD8 exprimant des marqueurs NK sont généralement associés à la sénescence et à des fonctions effectrices. Cependant, l'expression de marqueurs NK et de marqueurs de sénescence peut aussi être induite par d'autres *stimuli* que le vieillissement, comme la stimulation chronique (en particulier par des virus).

Les LT CD8 exprimant les marqueurs panKIR/NKG2A et Eomes, que nous avons dénommés LT CD8 innés, lesquels sont capables de produire l'IFN-γ en réponse à une stimulation innée (couple IL-12/IL-18), doivent être considérés comme pouvant exercer des fonctions anti-tumorales. Cependant, leur fréquence n'est pas corrélée à l'âge des sujets. Nous avons voulu évaluer la fréquence de ces cellules en réponse à la stimulation chronique que constitue la transplantation d'organe.

Dans la seconde partie du manuscrit, prenant appui sur nos propres données expérimentales, nous discutons l'effet du vieillissement, de la stimulation chronique par les antigènes du greffon et du CMV sur l'augmentation du phénotype sénescent et du phénotype de différenciation terminale sur les LT CD8 innés chez des patients transplantés rénaux depuis plus de 10 ans.

frontiers in Immunology

ORIGINAL RESEARCH
published: 21 July 2021
doi: 10.3389/fimmu.2021.674016

Allotransplantation Is Associated With Exacerbation of CD8 T-Cell Senescence: The Particular Place of the Innate CD8 T-Cell Component

Lauren Daniel[1,2], *Marion Tassery*[3], *Clara Lateur*[4], *Antoine Thierry*[1,2,3], *André Herbelin*[1,2*†], *Jean-Marc Gombert*[1,2,4†] *and Alice Barbarin*[1,5†]

[1] Inserm U1082, Poitiers, France, [2] Université de Poitiers, Poitiers, France, [3] Service de Néphrologie, Hémodialyse et Transplantation, CHU de Poitiers, Poitiers, France, [4] Service d'Immunologie et Inflammation, CHU de Poitiers, Poitiers, France, [5] CHU de Poitiers, Poitiers, France

OPEN ACCESS

Edited by:
John R. Greenland, University of California, San Francisco, United States

Reviewed by:
Moisés Evandro Bauer, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil
Joanna M. Schaenman, UCLA David Geffen School of Medicine, United States

***Correspondence:**
André Herbelin
andre.herbelin@inserm.fr

†These authors have contributed equally to this work and share senior authorship

Specialty section:
This article was submitted to Alloimmunity and Transplantation, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: *28 February 2021*
Accepted: *30 June 2021*
Published: *21 July 2021*

Citation:
Daniel L, Tassery M, Lateur C, Thierry A, Herbelin A, Gombert J-M and Barbarin A (2021) Allotransplantation Is Associated With Exacerbation of CD8 T-Cell Senescence: The Particular Place of the Innate CD8 T-Cell Component. Front. Immunol. 12:674016. doi: 10.3389/fimmu.2021.674016

Immunosenescence is a physiological process that is associated with changes in the immune system, particularly among CD8 T-cells. Recent studies have hypothesized that senescent CD8 T-cells are produced with chronologic age by chronic stimulation, leading to the acquisition of hallmarks of innate-like T-cells. While conventional CD8 T-cells are quite well characterized, CD8 T-cells sharing features of NK cells and memory CD8 T-cells, are a newly described immune cell population. They can be distinguished from conventional CD8 T-cells by their combined expression of panKIR/NKG2A and Eomesodermin (E), a unique phenotype closely associated with IFN-γ production in response to innate stimulation. Here, we first provided new evidence in favor of the innate character of panKIR/NKG2A(+) E(+) CD8 T-cells in normal subjects, documenting their position at an intermediate level in the innateness gradient in terms of both innate IFN-γ production and diminished mitochondrial mass. We also revealed that CD8 E(+) panKIR/NKG2A(+) T-cells, hereafter referred to as Innate E(+) CD8 T-cells, exhibit increased senescent (CD27(-) CD28(-)) phenotype, compared to their conventional memory counterparts. Surprisingly, this phenomenon was not dependent on age. Given that inflammation related to chronic viral infection is known to induce NK-like marker expression and a senescence phenotype among CD8 T-cells, we hypothesized that innate E(+) CD8 T-cells will be preferentially associated with exacerbated cellular senescence in response to chronic alloantigen exposure or CMV infection. Accordingly, in a pilot cohort of stable kidney allotransplant recipients, we observed an increased frequency of the Innate E(+) CD8 T-cell subset, together with an exacerbated senescent phenotype. Importantly, this phenotype cannot be explained by age alone, in clear contrast to their conventional memory counterparts. The senescent phenotype in CD8 T-cells was further increased in cytomegalovirus (CMV) positive serology transplant recipients, suggesting that transplantation and CMV, rather than aging by itself, may promote an exacerbated senescent phenotype of innate CD8 T-cells. In conclusion, we proposed that kidney transplantation, *via* the setting of inflammatory *stimuli* of alloantigen

exposure and CMV infection, may exogenously age the CD8 T-cell compartment, especially its innate component. The physiopathological consequences of this change in the immune system remain to be elucidated.

Keywords: innate memory CD8(+) T-cells, NK-like T-cells, allotransplantation, senescence, immune memory, innateness gradient

INTRODUCTION

Human Innate CD8 T-Cells: Phenotypic and Functional Definition

During the 2000s, a population of T-cell receptor (TCR)αβ(+) CD8(+) thymocytes with a mature phenotype was described in mice (1–10). They expressed phenotypical markers (CD44(+) CD62L(-)) of immunological memory and produced IFN-γ in response to innate stimulation by the combination of cytokines IL-12 and IL-18 (8), while their differentiation depended on the transcription factor Eomesodermin (Eomes). This new pool of TCRαβ(+) CD8(+) cells has been referred to as innate-memory (IM) CD8 T-cells because of their antigen-inexperienced memory-phenotype together with the property of responding to innate stimuli. On a parallel track, a counterpart of this unique thymic TCRαβ(+) CD8(+) IM cell population, called "virtual memory (VM)" CD8 T-cells, has been described in peripheral lymphoid organs, particularly the spleen. As in IM CD8 T-cells, the differentiation of VM CD8 T-cells depends on Eomes. Moreover, an entire set of arguments in unimmunized mice has shown that this peripheral population possesses characteristics of antigen-inexperienced cells, phenotypic and functional features of memory cells (11), as well as rapid IFN-γ production after exposure to proinflammatory cytokines (11). The frequency of the VM CD8 T-cell population has been shown to increase with age while retaining effector anti-infectious functions (12–14).

At the same time, in humans, numerous studies have identified a population of TCRαβ(+) CD8(+) lymphocytes expressing NK receptors (NKR), such as KIR and NKG2A/C (15–19). Interestingly, these cells have a preferentially EMRA (CD45RA(+) CCR7(-) CD57(+)) phenotype along with weaker TCR signalling than that observed for the CD8(+) KIR/NKG2A/C(-) population in terms of IFN-γ and TNF-α expression and degranulation process (20). However, human TCRαβ(+) CD56(+) T-cells (enriched in KIR(+) cells) have been characterized by their unique propensity among the CD8 T-cell pool to produce IFN-γ in response to innate stimulation by the combination of IL-12 and IL-18 (21). The physiopathologic role of CD8(+) KIR/NKG2A(+) T-cells has remained unclear. They have been associated with loss of immune response efficiency during cancer, and also with greater immune response efficiency in some infection conditions. Indeed, Lies Boelen et al. showed that CD8(+) KIR(+) T-cells were preferentially present in "Elite Controller" patients during human immunodeficiency virus (HIV) infection. In this work, the authors provided arguments suggesting that the expression of NKR specific to self-MHC molecules plays a role in protecting the effector functions of HIV-specific CD8 T-cells (22).

In addition, several studies have shown that a large majority of KIR/NKG2A(+) CD8 T-cells express Eomes (23–26) and that Eomes expression is essential for innate functions such as IFN-γ expression after innate stimulation by IL-12/IL-18 or degranulation after CD16 stimulation (24, 25) (**Figures 1A, B**). Interestingly, IFN-γ-expressing KIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8 T-cells in response to IL-12/IL-18 have been found in fetal thymus/cord blood in humans (23–25), attesting to their education by a foreign antigen-independent differentiation. In addition, their enrichment in EMRA cells indicates that the acquisition of this phenotype is accompanied (from the selection phase) by characteristics of terminal differentiation (24).

This population has also been found in non-lymphoid tissues, cancerous lesions (27) and in normal liver with a threefold higher frequency than observed among peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (25).

A positive correlation between the frequency of splenic KIR(+) Eomes(+) CD8 T-cells and subject age has been described, suggesting that at least part of this cell population is differentiated or accumulates with age (25). This population was called "VM" by White et al. (25) while we have used the expression "innate CD8 T-cells" (24, 27). On the basis of co-expression of KIR and NKG2A among EMRA cells, Quinn et al. identified a cell population that they also call "VM" (28, 29). The authors showed a positive correlation between frequency of this blood VM CD8 T-cell population and subject age.

In summary, in humans there exists an efflux of peripheral innate CD8 T-cells that appear very early in life and are likely to be maintained throughout life and, in addition, a probable contingent of innate CD8 T-cells appearing during a lifetime (**Figure 1C**).

Remarkably, in adulthood the CD8 T-cells generated during the neonatal period in mice maintain a greater potential response to the antigen or to a stimulation by IL-12/IL-18 (30). This observation is in line with the general and attractive hypothesis that, in humans and mice, fetal or neonatal T-cells could have more marked innate characteristics than adult T-cells (31). Specifically, these cells are able to produce IL-8 (32, 33), antimicrobial peptides (34), or have a propensity to respond more effectively to stimulation by IL-12/IL-18 (30, 31, 34).

Figure 1D illustrates data obtained from PBMC of healthy subjects showing the decisive role of Eomes in the acquisition of the IFN-γ response to stimulation by IL-12/IL-18 among panKIR/NKG2A-expressing CD8 T-cells. Indeed, on close examination, we noted the quasi-absence of IFN-γ expression by panKIR/NKG2A(+) Eomes(-) CD8 T-cells. This figure further demonstrates that the innate-dependent IFN-γ expression of panKIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8 T-cells is positioned with

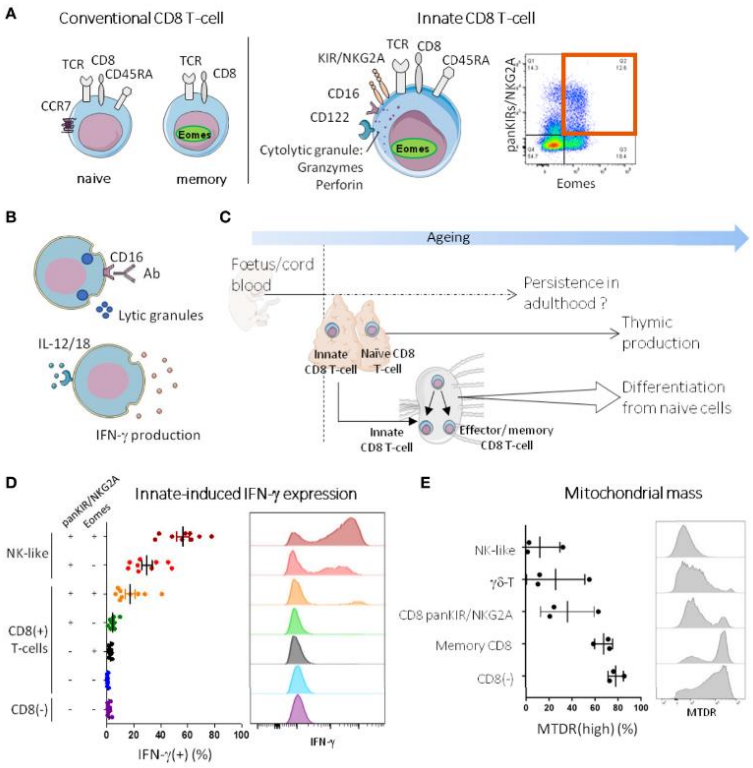


FIGURE 1 | Innate T-cells in humans: current state of knowledge. **(A, B)** Innate T-cells are memory phenotype CD8 T-cells with innate functions. In humans, as their conventional memory counterparts (panel **A**, left), innate CD8 T-cells (panel **A**, middle) express TCRαβ and CD8, and have memory characteristics, as attested notably by Eomes expression and EMRA phenotype (CD45RA(+) CCR7(-)). They also share with NK cells some innate immune receptors such as KIR (KIR2D and KIR3DL1/2), NKG2A, CD122 and CD16. Co-expression of Eomes and KIR/NKG2A brings together the major fraction of CD8 T-cells able to free lytic granules in response to CD16 stimulation with antibodies (ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity) and to produce IFN-γ upon innate-like stimulation by IL-12/IL-18 [(24) panel **B**]. As a result, CD8 T-cells co-expressing Eomes and KIR/NKG2A are identified as innate CD8 T-cells. A representative dot plot graph of Eomes(+) KIR/NKG2A(+) cells among CD8(+) CD3(+) PBMC from a healthy adult analyzed by flow cytometry is shown in panel **A** (right). **(C)** Ontogeny of innate CD8 T-cells. Innate CD8 T-cells have been evidenced in human cord blood, and like other fetal immune cells, they may be able to persist in adulthood. In mice, it is well-documented that they are produced in the thymus not only during the first stages of life but throughout a lifetime. With ageing, naive cells from the periphery differentiate into T-cell expressing innate features without antigen-stimulation. **(D, E)** Innate CD8 T-cells are part of the innateness gradient. PBMC from healthy donors were stained after 24h stimulation *in vitro* with IL-12/18 **(D)** or *ex vivo* **(E)**, and analyzed by flow cytometry for innate-induced IFN-γ expression and mitochondrial mass (MTDR), respectively. Each point represents one healthy adult donor. A representative histogram is shown for each cell population. For detailed gating strategy, see **Figure S1**.

an intermediate profile between the two extremes of the spectrum ranging from "conventional" adaptive T-cells (CD4 T-cells) to NK cells (i.e. the archetype of the innate lymphoid cells, which also include "ILC"). The fact that in the control NK-like cell population, the proportion of IFN-γ expressing cells was 2-fold increased among Eomes-expressing cells, confirms the role of Eomes in the acquisition of innate IFN-γ expression.

Akbar et al. provided convincing arguments suggesting that EMRA CD8 T-cells expressed a metabolic reprogramming signature, evidenced by a decrease in mitochondrial biomass, resulting from decreased glucose and fatty acid absorption (35). The same group (35, 36) as well as Quinn et al. (28, 29), highlighted the senescent character of VM CD8 T-cells expressing NK markers (KIR and/or NKG2A), and thereby raised the question of a possible convergence between the senescent phenotype and the acquisition of an innate phenotype.

From this standpoint, it is interesting to note that the metabolic activity of resting NK cells is weakly oxidative (37–39). That is why we analyzed the mitochondrial biomass of innate CD8 T-cells (**Figure 1E**) and compared it to that of NK cells, at one end of the gradient, and adaptive CD4 T-cells, at the other end. We included γδ-T cells as a hallmark example of innate T-cells. Interestingly, the mitochondrial biomass of innate CD8 T-cells defined by the expression of panKIR/NKG2A and CD45RA was found to be low, equivalent to that of NK cells and γδ-T cells (**Figure 1E** and data not shown). So it is that in addition to innate-dependent IFN-γ production, metabolic status is another element visualizing the existence of a phenotypic

gradient ranging from adaptive lymphocytes to innate lymphocytes with panKIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8 T-cells in between.

The Innateness Concept

Hayday and his colleagues were pioneers in the description of innate functions carried out by T-cell populations and in their proposal to conceptualize/generalize this phenomenon (40). Previous works had suggested that unconventional T-cells, such as invariant natural killer T (iNKT) cells, have innate functions, including cytotoxicity independent of TCR engagement, IFN-γ expression in response to stimulation by IL-12/IL-18 or IL-12/IL-33 but without associating these functions with a significant decrease in TCR signalling (41–44).

Brenner et al. (45), using an RNA-seq analysis, described the existence of a phenotypic and functional signature common to innate lymphoid cells (NK cells and some ILC) and innate T-cells (MAIT, iNKT cells and γδ-T cells). This approach made it possible to conceptualize and globalize the notion of "innate stimulation", which is based on the expression of a pool of transcription factors associated with the character of innateness, a profile of effector functions independent of TCR signalling, a high level of preformed transcripts encoding cytokines including IFN-γ, a weaker proliferative response to TCR stimulation than "conventional" T-cells, greater sensitivity to IL-15, particularly in the maintenance of homeostatic proliferation, and lastly, a "weakly oxidative" metabolic profile (**Figure 2**). Remarkably, a fraction of CD8 T-cells possess criteria bringing them closer to NK cells and innate T lymphocytes. Among the criteria of the innateness profile defined by RNA-seq analysis, KIR and NKG2 receptors and the transcription factors T-bet, HOXP, ZEB2 and PLZF are the most strongly associated with innateness, while Eomes is enriched in the innate compartment but at a lower level. When considering functional criteria, the most characteristic is IFN-γ response to IL-12/IL-18 stimulation and the sensitivity in this system to the action of IFN-γ which makes it possible to visualize the gradient of innateness from NK cells to CD8 T-cells (**Figure 1D**) (45). Another remarkable point is the relative independence of innate T-cells from TCR engagement, particularly with regard to proliferation (45), as illustrated by the dispensable character of TCR in the maintenance and survival of iNKT lymphocytes. Indeed, at steady-state, the level of Nur77 expression (a marker of TCR engagement) was lower in splenic iNKT cells than in conventional CD4 T-cells (46) while iNKT cells maintained functions and survival after *in vivo* ablation of their TCR (47). Another unique feature of innate T-cells is their sensitivity to IL-15, which is explained by increased expression of CD122, the IL-2/IL-15 receptor β chain (45), allowing IL-15 to maintain homeostatic expansion of iNKT cells (48–50) along with stable T-bet expression (49).

A final element contributing to the definition of innateness is metabolic status, more precisely, a low mitochondrial biomass

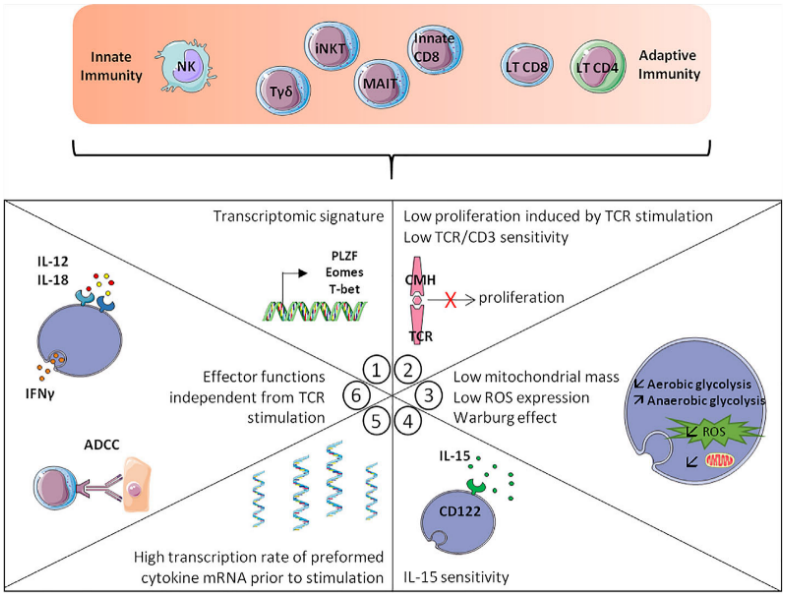


FIGURE 2 | Hallmarks of innateness gradient. The more T-cells are close to innate cells like the NK-cells, the more they display the following hallmarks: 1/ Transcriptomic signature with transcription factors expression such as PLZF, Eomes or T-bet. 2/Low TCR/CD3 sensitivity and low proliferation induced by TCR stimulation. 3/Metabolic changes with lower mitochondrial mass, lower ROS production and the Warburg effect. 4/IL-15 sensitivity, with increased CD122 expression. 5/A higher transcription rate of preformed cytokine mRNA prior to stimulation. 6/Effector functions independent from TCR stimulation such as ADCC and IFN-γ production after IL-12/IL-18 stimulation. Adapted from Gutierrez-Arcelys et al. (45).

(51, 52). At steady-state, the decreased mitochondrial biomass (51, 52) found in innate lymphocytes as compared to adaptive lymphocytes is correlated to lower glucose uptake (51) as well as lower reactive oxygen species production (45). At this stage, it seems important to consider that within the gradient of innateness, each of the "classic" populations can be sub-distributed on the basis of an individual signature, thereby demonstrating that within innate cells, a metabolic shift can be associated with the acquisition of adaptive traits. Indeed, human CD57(bright) NK cells, which partially consist in adaptive memory cells, display a higher mitochondrial biomass and more intense oxidative metabolism than their CD57(dim) counterparts (37, 53). Likewise, type 1 iNKT (iNKT1) cells, which preferentially express IFN-γ after TCR or IL-12/IL-18 stimulation, and whose phenotype closely depends on T-bet expression, exhibit a low mitochondrial biomass, in contrast to iNKT2 or iNKT3 cells, which present a higher mitochondrial mass and glucose uptake along with more intense oxidative metabolism (51, 54–56). With regard to these data, metabolic conversion of iNKT cells depends on mTOR (Mammalian Target of rapamycin) recruitment (51, 54–57).

Phenotypic and Functional Characteristics of Senescent T-Cells

Age-related changes in immune responses make older people vulnerable to new infections or pathogens or may facilitate reactivation of latent bacterial or viral pathogens. The term used to describe this phenomenon is immunosenescence or senescence of the immune system. One of the hallmarks of immunosenescence is the gradual decrease of the naive lymphocyte cell pool, with a loss of potential/capacity for self-renewal.

In humans, CD8 T-cells are generally considered to be the Achilles' heel of immune homeostasis (58), due to the early and significant erosion of their naive CD8 T-cell component with age and accumulation/replacement by terminally differentiating/VM CD8 T-cells (28, 29). This phenomenon is accompanied by contraction of the TCR repertoire. The CD8 T-cell compartment exhibits approximately 10^8 different TCR in (young) adult humans, while this diversity decreases by 3-to-5- fold in the elderly (59), it remains sufficient to respond to new antigens (58, 59). However, in situations of chronic stimulation of the immune system, including autoimmune or inflammatory diseases or infection by cytomegalovirus (CMV), erosion of CD8 T-cell repertoire diversity is more rapid (60–63). Age-related diversity erosion of the TCR repertoire is particularly marked in terminal differentiating memory (EMRA) CD8 T-cells, but it is also observable, albeit at a lower level, in the pools of effector-memory (EM) and naive CD8 T-cells (59). In humans, several profiles or markers are associated with an immunosenescence phenotype of CD8 T-cells: accumulation of EMRA phenotype cells, CD57 and NK receptor expression such as KIR, NKG2A/C and NKG2D (**Figure 3A**) (36, 58).

Senescent CD8 T-cells maintain a level of homeostatic proliferation that depends on IL-15 at the expense of IL-7, which is also a key cytokine controlling CD8 T-cell homeostatic proliferation. Indeed, age-related loss of sensitivity to IL-7, caused by decreased accessibility of the IL-7R gene to transcription should be taken into account (64). It is as if a shift were taking place in favor of a privileged proliferation of more differentiated CD8 T-cells expressing a higher level of CD122 (29). In addition, CD122 expression is increased by CD8 T-cells in elderly compared to young subjects (29). Finally, a decreased proliferative response to TCR stimulation, in addition to decreased TCR signalling, has also been proposed as a possible mechanism for differentiation/senescence programming, which would lead to an innate-type effector function gain (36). Another marker associated with terminal differentiation is a complex cytotoxic arsenal, in which perforin and granzymes (Gz) are

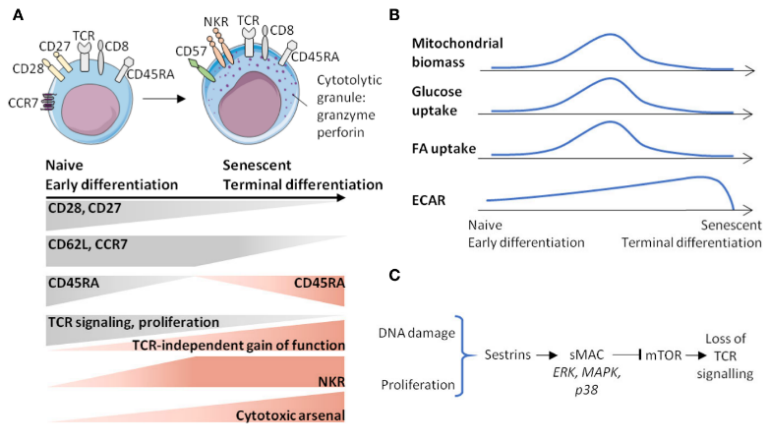


FIGURE 3 | Senescence of CD8 T-cells is associated with phenotypic and metabolic changes. **(A)** Gradient of activation or function marker expression from naive (early differentiated) to senescent (terminal differentiated) cells. **(B)** Age-related metabolic changes of CD8 T-cells. **(C)** Events and signalling factors leading to the loss of TCR sensitivity that accumulate with age. ECAR, extracellular acidification rate; FA, fatty acid; NKR, NK receptors; sMAC, Sesn-MAPK activation Complex.

highly expressed (36). A last phenotypic criterion associated with both terminal differentiation and immunosenescence of CD8 T-cells is the loss of CD27 and CD28 expression (**Figure 3A**) (36).

At steady-state, the mitochondrial biomass of EMRA CD8 T-cells is lower than that of effector memory (EM) CD8 T-cells and equivalent to that of naïve CD8 T-cells (65). The maximal mitochondrial respiration (by measuring OCR (Oxygen-Consumption-Rate) under decoupling conditions) is similar in EMRA and naive CD8 T-cells and lower than in EM CD8 T-cells (65). However, the part of mitochondrial metabolism devoted to ATP production is higher in the EMRA CD8 T-cell compartment, with higher amounts of preformed ATP (65). Moreover, EMRA CD8 T-cells also express many genes either associated with metabolic functions, including glucose uptake (Glut1), fatty acid uptake (carnitine palmitoyl transferase, CPT1A), lactic acid transport (SLC16A3) or which are involved in the pentose pathway (glucose-6-phosphate deshydrogenase, G6PD) (65). Finally, comparison of VM CD8 T-cells, defined by KIR/NKG2A expression and EMRA phenotype, in young or elderly subjects has shown that the VM CD8 T-cells of elderly subjects present superior maximal OCR, indicating active mitochondrial metabolism (29) (**Figure 3B**). All of these elements suggest a very active metabolism of EMRA CD8 T-cells, likely associated with increased IL-15 sensitivity (29, 65). Moreover, it can be assumed that senescent T-cells bring together a set of metabolic modifications distinct from those described in metabolic exhaustion during cancers or chronic infections (66, 67), thereby attesting to a specific senescence signature of senescent or terminal differentiation CD8 T-cells.

Sestrins (Sesn), which are evolutionarily-conserved stress-inducible proteins, have brought new knowledge about the molecular mechanisms involved in senescence and/or EMRA phenotype acquisition. They counteract oxidative stress, regulate mTORC1 (mTOR Complex 1) functions by mechanisms involving AMPK (an AMP-activated protein kinase) and Rag GTPases (68), and have anti-aging functions (68). Interestingly, Sesn expression is increased among senescent CD8 T-cells defined on the basis of CD27(-) CD28(-) phenotype (69). In these cells, Sesn interfere with p38, ERK, JNK and MAPKs (Mitogen-activated protein kinases), which will form a Sesn-MAPK activation Complex (sMAC) associated with cell survival, mTOR blocking and TCR signalling decrease (**Figure 3C**). Indeed, it has recently been suggested that Sesn2, one on the three Sesn family members, induces NKG2D expression and NK-like functions in senescent-like CD8 T-cells (70). In other words, senescent-like CD8 T-cells are not defective cells in end of terminal differentiation, but actively reprogrammed cells, raising the question of the role of Sesn2 in programming innate functions. Is Sesn2 expression and/or action restricted to senescent or terminally differentiating CD8 T-cells or also involved in innateness acquisition? Some of the response is provided by the public data associated with the work of Gutierrez-Arcelus et al. (45), which reveals that Sesn2 is significantly associated with innateness gradient (Beta 0.27; $p < 10\text{-}13$).

One consequence of senescence is a low-grade systemic inflammation, also defined as inflammaging, with a chronic production of cytokines and pro-inflammatory molecules, such as TNF-α, IL-6, IL-1 or C-Reactive-Protein leading to a pro-inflammatory state which is predictive of death (71). This profile, called Senescence-Associated-Secretory-Phenotype (SASP) (71), is similar to that observed from senescent fibroblasts (63, 71) and should be considered as a warning signal for the immune system. In the elderly, T-cells, particularly CD8 T-cells, contribute to the production of cytokines involved in SASP. Different elements produced by CD8 T-cells are likely to be involved in the genesis of inflammation: TNF-α, cytokines of the IL-1 family, as well as molecules belonging to the cytotoxic arsenal (72). GzB is one of the factors likely to be involved in inflammation, through its activity on molecules of the extracellular matrix (Extracellular molecules) and on the activation of IL-1 or IL-18 (72). Another element of the cytotoxic arsenal likely involved in SASP is GzK, which is highly expressed by a population of CD8 T lymphocytes, TOX(+) Eomes(+) T-bet(low) PD-1(+) (73). GzK has the particularity of being able to induce SASP production *in vivo* (73, 74).

It has been reported that chronic stimulation can induce senescence together with NKR expression in CD8 T-cells in several pathologic situations, such as viral infection (75), chronic inflammatory disease (76) or cancer (77). Considering that allo-transplantation is also a condition of chronic stimulation, i.e., in response to continued exposure to allo-antigens, we then analyzed the senescence/NKR-expression status of the CD8 T-cell pool, with particular attention given to its innate contingent, in long-term stable kidney transplant patients (mean 20 years) treated with cyclosporine A (CsA) monotherapy. To this aim, we first investigated in normal subjects, among CD8 T-cells, whether there is or not a particular association between innate (panKIR/NKG2A(+) Eomes(+)) CD8 T-cells and senescence and/or age. Then, we explore the phenotype of conventional and innate CD8 T-cells in allotransplant patients, particularly those associated with positive cytomegalovirus (CMV) serology.

MATERIALS AND METHODS

PBMC

The study protocol was approved by the ethics committee at Poitiers University Hospital (Ethics Committee Ouest III, Poitiers, France, registration number 16.10.42), and the study was conducted in compliance with Good Clinical Practice guidelines. All participants gave written informed consent before inclusion in the trial. This clinical trial was registered in the international clinical trial registry ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT03227965. PBMC were isolated from blood samples by density gradient centrifugation (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, US), resuspended in 90% Fetal Bovine Serum (FBS) (10270106, Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) with 10% DMSO (D2650, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, US), and frozen at -80°C and then transferred in liquid nitrogen until use.

Frozen PBMC from 23 healthy donors (HD) (median age 46 years, range: 21363, sex ratio: 11/12) were obtained from the French Blood Institute (EFS, Lyon, France).

See **Table 1** for cohort description. Briefly, inclusion criteria are: delay of kidney transplantation >10 years, stable renal function, treatment with cyclosporine A (CsA) monotherapy.

Cell Culture

For *ex vivo* pro-inflammatory stimulation, after thawing, PBMC from patients and HD were cultured ($1x10^6$ cells/mL) 24 well plate in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and antibiotics with IL-12 and IL-18 for 2 days (20 ng/mL of each cytokine, R&D Systems (Minneapolis, MN, US) and MBL International (Woburn, MA, US) respectively). For assessment of IFN-γ secretion, Golgistop (BD 554724, Becton, Dickinson & Compagny, Franklin Lake, NJ, US) was added for the last 5 h of culture.

Flow Cytometry

Phenotypic analysis of PBMCs was performed by flow cytometry either *ex vivo* or after cell culture. Expression of different markers was assessed by staining with appropriate combinations of antibodies. A detailed list of the antibodies used to stain cells is provided in **Supplementary Table**. panKIR/NKG2A referred to staining with a mixture of the three following antibodies from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) KIR2D, KIR3DL1/KIR3DL2 (CD158e/k) and NKG2A (CD159a). Briefly, dead cells were excluded by using the Zombie NIR™ Fixable Viability Kit (BioLegend) stained for membranous markers and fixed permeabilized with the FoxP3/Transcription Factor Staining kit (eBioscience™) before intranuclear staining. Flow data were acquired on a FACsVerse flow cytometer (Becton, Dickinson & Compagny) with FACSuite™ software (Becton, Dickinson & Compagny) and analyzed using FlowJo™ v10 (Becton, Dickinson & Compagny).

Statistical Analysis

Data are expressed in mean +/- SEM. The statistical significance of differences in mean values was analyzed by the Mann–Whitney or Wilcoxon non-parametric test. The Pearson correlation test was used to test the association between cell frequencies and age. Results were considered to be statistically significant when $p<0.05$. *$p<0.05$; **$p<0.01$; ***$p<0.001$, ns not significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software). Significant outliers were identified using the Grubbs' test and excluded from analysis.

TABLE 1 | Patient and healthy donor characteristics.

	AlloTx	HD
Participants (n)	46	23
Sex		
Women (n)	15	11
Men (n)	31	12
Age (yr)	66 (46-85)	46 (22-63)
Time after transplantation (yr)	18 (10-29)	/
Cancer (n)	14	/
CsA trough level (ng/ml)	93 (67-129)	/

HD, healthy donors; AlloTx, kidney-transplant patients.

RESULTS

PanKIR/NKG2A(+) Eomes(+) and panKIR/NKG2A(+) Eomes(-) CD8 T-Cells Share Innate Functions and a Senescent/Inflammaging-Like Signature

From a cohort of healthy donors (HD), we showed that the expression of panKIR/NKG2A among TCRαβ(+) CD8(+) peripheral blood cells (for gating strategy, see **Figure S1**) is associated with senescence (CD27(-) CD28(-)) (**Figure S2A**), EMRA (CD45RA(+) CCR7(-)) (**Figure S1**) and inflammaging (based on our work on high expression of perforin, which is an element of the cytotoxic arsenal as well as a surrogate for granzymes involved in inflammaging; **Figure S2B**; **Figure 4A** top panels) phenotypes. Similarly, when considering expression of the transcription factor Eomes, enrichment of the same phenotypic criteria was observed, in a less pronounced but still significant manner (**Figure 4A** bottom panels).

From these data, we decided to systematically analyze the four CD8 T-cell compartments defined by the expression of panKIR/NKG2A and Eomes, our objective being to determine the respective contributions of these two factors to the acquisition of innate functions as well as EMRA, senescence and inflammaging signatures (**Figures 4B, C**). As expected, among the four CD8 T-cell compartments, panKIR/NKG2A(+) Eomes (+) CD8(+) T-cells, in accordance with their recently described innate-like functional features (24), displayed the most pronounced expression of CD122 as well as the unique property of producing IFN-γ in response to innate-like stimulation (IL-12/IL-18) (**Figure 4B**; **Figures S2C, D**) for this innate-like function. As for the cell compartment panKIR/NKG2A(+) with no expression of Eomes, it produces significantly smaller amounts of IFN-γ in the same experimental setting, thereby indicating that both NKR and Eomes are required for optimal achievement of this innate function. Quite differently, the signature of senescence (CD27 (-) CD28(-)-expressing cells) was predominantly associated with innate (panKIR/NKG2A(+)) CD8 T-cells, regardless of whether or not Eomes was co-expressed (**Figure 4C** left panel). On the other hand, Eomes expression by panKIR/NKG2A(+) cells was required for the acquisition of EMRA phenotype (**Figure 4C** middle), given the fact that panKIR/NKG2A(+) Eomes(+) CD8 (+) T-cells, hereinafter referred to as Innate E(+), are mostly EMRA (24) (**Figure S4** top left panel), while their Eomes(-) counterparts, hereinafter referred to as Innate E(-) cells (**Figure S4** top right panel), consist mainly of effector memory cells. As for perforin expression (**Figure 4C** right), a declining gradient was observed, starting from panKIR/NKG2A(+) cells with Eomes expression, then without Eomes expression and finally with Eomes-expressing cells harboring panKIR/NKG2A, suggesting that Eomes and NKR work as additional/independent factors for the acquisition of their cytotoxic

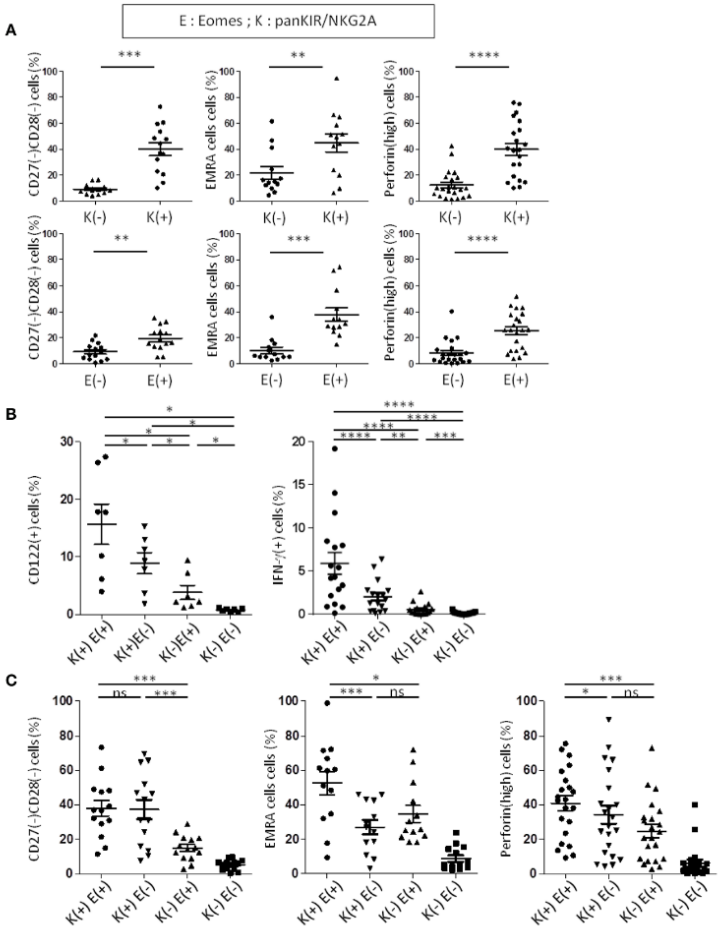


FIGURE 4 | PanKIR/NKG2A(+) Eomes(+) and panKIR/NKG2A(+) Eomes(-) CD8 T-cells share innate functions and a senescent/inflammaging-like signature. Flow cytometry analysis of TCRαβ(+) CD8(+) circulating live lymphocytes from healthy donors. **(A)** CD8 T-cells expressing panKIR/NKG2A or Eomes markers preferentially harbor a senescent signature and a terminal effector phenotype. The frequencies of senescent (CD27(-) CD28(-)) (n=14), EMRA (CD45RA(+) CCR7(-)) (n=13) and perforin(high)-expressing cells (n=22) among CD8 T-cells expressing panKIR/NKG2A (upper panel) or Eomes (lower panel) were analyzed. **(B)** panKIR/NKG2A and Eomes markers define two innate CD8 T-cell subsets besides their conventional memory and naive counterparts: evidence for an innateness gradient. CD122-expressing cells (n=7) *ex vivo* (left panel) and IFN-γ-producing cells (n=17) (right panel) frequencies after 48h stimulation with IL-12/IL-18 among the four CD8 T-cell subpopulations defined by panKIR/NKG2A and Eomes markers. Representative plots are shown in **Figure S2**. **(C)** Innate CD8 T-cell subsets are enriched in senescent/terminal effector cells. Frequencies of senescent (CD27(-)CD28(-)) cells (n=14) (left panel), EMRA cells (n=13) (middle panel) and perforin(high)-expressing cells (n=22) (right panel) among the four CD8 T-cell subpopulations defined by panKIR/NKG2A and Eomes markers. Differences between E(-)K(-) and the other three cell populations, although significant, are not shown. Data are presented as mean ± SEM. Two-tailed Wilcoxon non-parametric test. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001; ns, not significant. For detailed gating strategy, see **Figure S1**.

arsenal, a feature that is also considered to be associated with inflammation, and possibly with age. The data from **Figure 4C** are conciliable with the conclusion that Innate E(+) CD8 T-cells co-associate senescence and inflammaging signatures. However, the innate phenotype of CD8 T-cells gathering Eomes and panKIR/NKG2A receptors is associated with an EMRA phenotype, while the senescent phenotype based on the loss of expression of CD27 and CD28 is associated with NKR expression. In addition, in the present report, we have identified a second innate-like subset E(-) compartment exhibiting intermediate/low CD122 expression and IL-12/IL-18-stimulated IFN-γ production, which is also enriched in senescent and inflammaging cells.

As mentioned above, a general consensus exists in the literature on the existence of an association between CD8 T-cell senescence and age (28, 29). However, when considering

innate-CD8 T-cell populations individually, the studies are not concordant. In our report, Innate E(+) and Innate E(-) cell frequencies in HD do not appear to vary with age (**Figure S3**). In clear contrast, and as expected, panKIR/NKG2A(-) Eomes(+) CD8 T-cells, which primarily harbor an effector/memory phenotype, ((24); **Figure S4** bottom left panel), and that we hereinafter refer to as conventional Conv E(+) cells, are positively correlated with age, whereas their Conv E(-) counterpart, which primarily harbors a naive phenotype (**Figure S4** bottom right panel), as in a balance, is negatively correlated (**Figure S3**).

Long-Term Allogeneic Kidney Transplantation Promotes the Generation of Innate CD8 T-Cell Subsets Together With Their Senescent/Inflammaging Signature

One element associated with the appearance of senescent immune cells and the appearance of innate CD8 T-cells in humans and modelling in mice is the effect of chronic immune/antigen stimulation (58, 63). From this standpoint, allogeneic kidney transplantation is a remarkable situation insofar as it results in stimulation by an allogeneic (and therefore foreign) antigen over several years or decades. In this context, we analyzed the senescent, terminal differentiation and inflammaging phenotypes of innate CD8 T-cells in a cohort of patients with more than 10 years of transplantation without rejection under CsA monotherapy (AlloTx group) (**Table 1**) (78).

Remarkably, in this cohort of transplant patients, as compared to HD, frequencies of the two Innate E(+) and E(-) CD8 T-cell compartments appeared to be significantly increased, while that of Conv E(+) CD8 T-cells remained unmodified. As a result, Conv E(-) CD8 T-cell frequency appeared to be substantially reduced (**Figure 5B** and **Figure S5**).

Moreover, markers of senescence (CD27(-) CD28(-)) (**Figure 5B**), terminal differentiation (EMRA phenotype) (**Figure 5C**) and inflammaging (perforin(high) expression) (**Figure 5D**) appeared to be exacerbated in innate CD8 T-cells, particularly in the Innate E(+) subpopulation of the AlloTx group. However, this phenomenon did not appear to be restricted to innate CD8 T-cell compartments, as since a similarly increased profile likewise occurred in the Conv E(+) CD8 T-cell compartment, thereby raising the question of a partial decoupling between acquisition of the innate-like phenotype and acquisition of a senescent inflammaging and/or EMRA phenotype.

Lastly, as is the case for HD, there is no correlation between frequency of innate CD8 T-cells and age, a finding once again contrasting with the significantly positive correlation frequently found with Conv E(+) CD8 T-cells (**Figure S5**). To definitively ensure that there is no age-related bias in our comparison between the HD and AlloTx groups, we matched the subjects of the two groups according to age. Even so, in AlloTx groups, the selective increase in the frequency of Innate E(+) and Innate E(-) CD8 T-cells remained nearly intact, as did the exacerbation of their senescent character (CD27(-) CD28(-)) and their perforin(high) expression, both of which appear to suggest inflammaging (**Figure S6**).

All of these data argue in favour of reprogramming CD8 T-cell populations, particularly its innate components independently of Eomes expression, under the influence of chronic stimulation linked to kidney transplantation rather than inherent to age.

Chronic Stimulation by CMV in Renal Transplant Patients Is Associated With General Exacerbation of the Senescent/Inflammaging-Like Signature in the CD8 T-Cell Compartment

CMV infection is another event associated with accelerated ageing of the immune system, particularly the CD8 T-cell compartment. During kidney transplantation, CMV infection is associated with an increased risk of rejection and long-term complications of the transplant (79, 80). Interestingly, in our cohort, there was no difference in the frequency of Innate E(+) or E(-) CD8 T-cells or Conv E(+) cells, a finding suggesting that stimulation by CMV did not impact the generation of innate CD8 T-cells (**Figure 6A**). On the other hand, we observed a significant decrease in Conv E(-) CD8 T-cells, a compartment mainly represented by naive cells. This phenomenon could result from an increase in the global E(+) compartment (data not shown). All in all, among innate CD8 T-cell compartments, patients with positive CMV serology showed a further significant increase in frequency of senescent (CD27(-) CD28(-)) and perforin(high) expressing phenotypes (**Figures 6B, C**). However, while the exacerbated inflammaging signature (perforin(high)) associated with chronic CMV stimulation appears to selectively impact innate CD8 T-cells, this is not the case with senescence, which in fact impacts the four compartments defined by panKIR/NKG2A and Eomes expression.

On the whole, matters proceed as if chronic stimulation by allo-antigens and CMV possesses the quality of inducing/increasing a senescence/inflammaging signature in conventional CD8 T-cell populations and of exacerbating them in innate CD8 T-cell populations. In addition, events associated with the long-term status of the transplantation, including chronic stimulation by allo-antigens or even immunosuppressive treatment, could well be responsible for the increased numerical representation of innate CD8 T-cells.

The increased senescent phenotype is a global phenomenon in CD8 T-cells, which cannot be attributed to only one sub-population. From our results in AlloTx patients, we expected that, as is the case for cell frequencies, senescent and inflammaging phenotypes would be related to age in Conv T-cells, but not in innate CD8 T-cells. This assumption is confirmed by positive correlations between age of AlloTx patients and CD27(-) CD28(-) and perforin(high) frequencies among Conv CD8 T-cells (although not significant for perforin ($p=0.08$)), but not their Innate counterpart, as illustrated in **Figure S7**. As a result, Conv CD8 T-cells are affected by aging, as previously documented (58, 63), whereas innate CD8 T-cells are impacted by chronic stimulation rather than age.

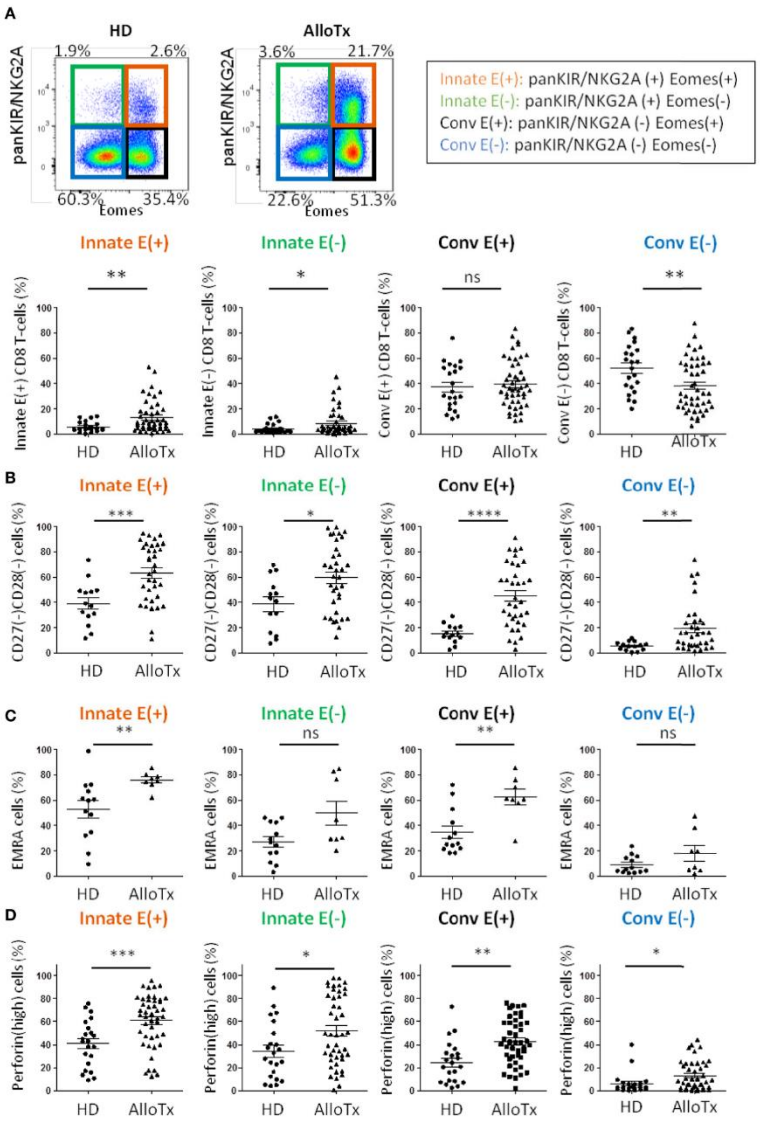


FIGURE 5 | Chronic allo-antigenic stimulation promotes the generation of innate CD8 T-cell subsets and a senescent/inflammaging signature. **(A)** Frequencies of innate CD8 T-cell subpopulations are selectively increased in long-term kidney allograft recipients. Frequencies of CD8 T-cell subpopulations according to panKIR/NKG2A and/or Eomes expression among TCRαβ(+) CD8(+) live lymphocytes in healthy donors (HD, n=22) and long-term kidney allograft recipients (AlloTx, n=47). Representative plots are shown for one HD and one AlloTx recipient. **(B–D)** Senescent, EMRA and perforin(high) CD8 T-cell frequencies are increased in long-term kidney allograft recipients. Frequencies of senescent (CD27(-)CD28(-)) cells (HD n=15, AlloTx n=35) **(A)**, EMRA (CD45RA(+) CCR7(-); HD n=13, AlloTx n=8) **(B)** and perforin(high)- expressing cells (HD n=22, AlloTx n=45) **(C)** in CD8 T-cell subpopulations. In the Conv E(-) cell pool from AlloTx patients, the increased frequency of EMRA cells (**Figures 5** and **S4**) could explain the relatively high frequency of senescent cells (19% *vs* 12% in healthy controls). Representative plots are shown for one HD and one AlloTx recipient in **Figure S2**. Each dot represents one HD or AlloTx recipient. Two-tailed Mann-Whitney non-parametric test. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$; ****$p < 0.0001$; ns, not significant. For detailed gating strategy, see **Figure S1**.

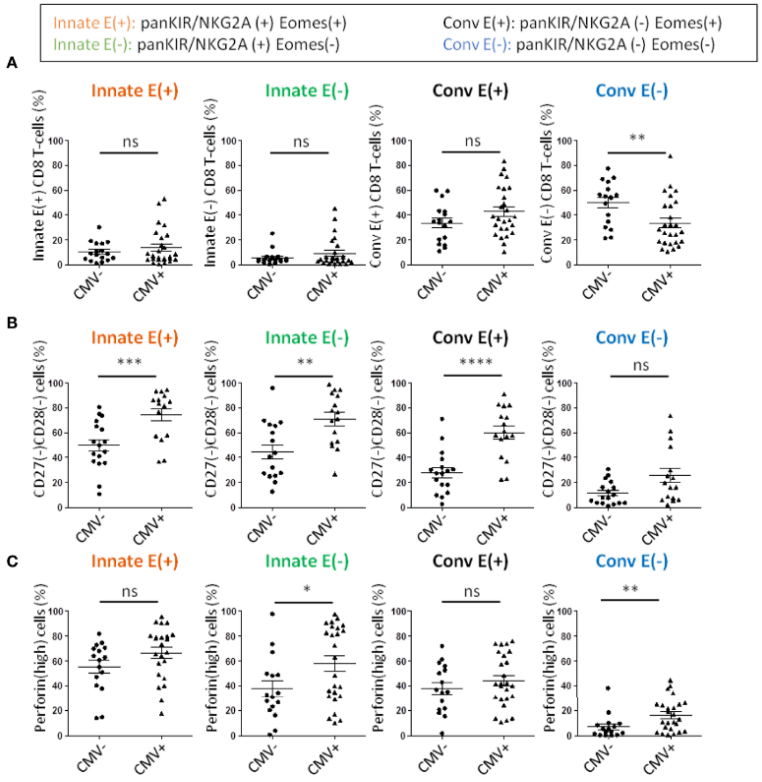


FIGURE 6 | Frequencies of senescent and perforin(high) CD8 T-cells are increased in long-term kidney allograft with a CMV positive serology. **(A)** Frequencies of CD8 T-cell subpopulations according to panKIR/NKG2A and/or Eomes expression among TCRαβ(+) CD8(+) live lymphocytes in CMV(-) (n=17) or CMV(+) (n=26) long-term kidney allograft (AlloTx) recipients. **(B)** Senescent (CD27(-)CD28(-)) cells (CMV(-) n=17; CMV(+) n=16) and **(C)** perforin(high)-expressing cells (CMV(-) n=16; CMV(+) n=25) in CD8 T-cell subpopulations in AlloTx recipients. Two-tailed Mann-Whitney non-parametric test. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$; ****$p < 0.0001$; ns, not significant.

DISCUSSION

It is well-documented that conventional CD8 T-cells are highly susceptible to senescence with chronologic age (58). This phenomenon is associated with a decrease in the naive CD8 T-cell pool together with accumulation of memory/terminally differentiated CD8 T-cells (28, 29).

Here, we postulated that organ transplantation is likely to alter the age-related senescence program of CD8 T-cells. Since some CD8 T-cells expressing innate markers have a propensity to display a senescent phenotype, we focused on innate (panKIR/NKG2A(+)) CD8 T-cells, which preferentially harbor a terminally differentiated phenotype.

We were thereby able to demonstrate for the first time that renal allotransplantation is accompanied by an increased frequency of Innate E(+) CD8 T-cells together with an exacerbated senescent phenotype (CD27 (–) CD28(-)), which is also apparent in the conventional CD8 T-cell pool, although to a lesser degree.

Since studies about T-cells in healthy subjects have shown that aging can trigger expression of NK-cell markers on CD8 T-cells (28, 70), we analyzed the influence of age in the generation and senescent phenotype of Innate E(+) CD8 T-cells in AlloTx recipients. Intriguingly, neither the generation nor the exacerbated senescent status of Innate E(+) CD8 T-cells could be explained by age alone, as evidenced by the significant differences that remained between patients and age-matched healthy controls. In addition, as expected, and in clear contrast with the Innate E(+) CD8 T-cell subset, its conventional memory counterpart was positively correlated with age in the same transplant recipients, in terms of both frequency and senescence. Lastly, we documented that this phenomenon preexists in healthy controls. Indeed, frequency of Innate E(+) CD8 T-cells was apparently not related to age, corroborating findings from Kasakovski et al. obtained with a larger healthy cohort aged from 6 to 84 years (81). Moreover, the healthy control Innate E(+) CD8 T-cell population appeared more enriched in senescent cells compared to its conventional memory counterpart, whose senescent phenotype increased with age.

All in all, these data suggest that in healthy controls, Innate E(+) CD8 T-cells acquire their senescent phenotype as part of their own differentiation program, and that in AlloTx patients, the increased frequency and exacerbated senescent phenotype of innate E(+) CD8 T-cells may be attributed to chronic allogeneic stimulation rather than to chronological age. The notion that T-cell senescence increases after kidney transplantation was previously evidenced by measuring telomerase activity, which was lower in transplant recipients five years after kidney transplantation (82). In the future, it would be interesting to compare AlloTx recipients and healthy subjects for telomerase activity in the CD8 T-cell compartment, and particularly its Innate E(+) contingent.

During the physiological aging that occurs in the elderly, a low grade of systemic inflammation is generally observed, referred to as inflammaging. Since it is well-recognized that chronic inflammation occurs from the first few months after kidney transplantation (83), we raised the possibility of an inflammaging phenotype (defined by perforin(high) expression) in the CD8 T-cell compartment from AlloTx recipients, and its conceivable association with senescence. Our observation of the increased frequency of perforin(high)-expressing cells in the four innate and conventional CD8 T-cell compartments in AlloTx patients led us to suggest that inflammaging occurs in AlloTx patients by impacting the whole CD8 T-cell compartment. However, senescence and inflammaging appeared at least partially non-interdependent in AlloTx patients. Indeed, when considering patients with positive CMV serology, even though a further increase of senescence frequency was found in all CD8 T-cell subsets as compared to patients with CMV negative serology, perforin(high), expressing cell frequency appeared increased in Innate E(-) CD8 T-cells but not in their Innate E(+) counterparts. These findings suggest that CMV and allogeneic chronic stimulations do not seem to have the same target cells and probably use different mechanisms, affecting Innate E(-) and E(+) CD8 T-cells differently. Further studies using a more direct marker of inflammaging, such as GzK (73, 74), are needed to definitively validate this assumption. Although CMV is one of the most widely studied viruses in transplant patients, other viruses may be implicated and should be analyzed, as infection is a major issue in transplantation, particularly as regards oncogenic viruses (84, 85).

An important issue that remains to be explored is the physiopathologic significance in AlloTx recipients of our observation of increased senescence and inflammaging among CD8 T-cells, particularly in Innate CD8 T-cells. We presume that this "age-like" phenotype is related to alterations in immune system competence. Considering innate CD8 T-cells, we categorized them as an NK-like CD8 T-cell subset that constitutively expresses CD122 and can rapidly produce IFN-γ on innate triggering (24) (**Figure 4B**), two elements of the innateness gradient described by Gutierrez-Arcelus et al. (45). In this respect, we confirmed *via* metabolic analysis that in the innateness gradient (45) innate CD8 T-cells represent an intermediate category between NK cells and adaptive CD4 T-cells. Further studies are needed to determine whether one or more elements of the innateness gradient (for details, see **Figure 2**) are lost in this unique CD8 T-cell subset in AlloTx recipients.

At the clinical level, one limitation of our pilot study is the absence of association between the CD8 T-cell subtypes described and clinical phenotypes of rejection, which is due to the fact that inclusion criteria of the AlloTx cohort were delay of kidney transplantation exceeding 10 years, and stable renal function. In spite of that, when considering a possible link between senescent Innate E(+) CD8 T-cells and graft rejection/tolerance, a recent study reported that higher frequency of EMRA CD8 T-cells at one year post-transplantation was associated with poor prognosis and graft failure (86). Given that Innate E(+) CD8 T-cells are enriched in the EMRA phenotype (24), and that this signature is exacerbated in AlloTx recipients, a prospective study monitoring innate CD8 T-cells with regard to clinical signs of rejection, infection or altered vaccine response, merits special consideration.

This study raises the possibility *in fine* that monitoring of innate CD8 T cells could represent an innovative approach for evaluation of transplant recipients, with major potential implications for management of immunosuppression. With this in mind, the data obtained in our pilot cohort should first be confirmed by extending our exploration in patients receiving immunosuppressive drugs other than CsA, especially tacrolimus, mycophenolic acid and glucocorticoids, which are frequently used in renal allotransplant recipients. Another limitation of our study is the small cohort size and young age of healthy controls.

In conclusion, we propose that kidney transplantation, *via* the setting of inflammatory stimuli of alloantigen exposure and CMV infection, may exogenously age the CD8 T-cell compartment, especially Innate E(+) CD8 T-cells. It would also be interesting to investigate whether this new hypothesis applies to other pathological situations of chronic immune stimulation such as autoimmunity or cancers.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Comité de protection des personnes Ouest III (assay number: ELITE, protocole number: 16.10.42, identification number: 2016-A01508-43). CHU de Poitiers, Pavillon administratif, entrée numéro 3 porte 213, 2 rue de la Milétrie, CS 90577, 86 021 Poitiers Cedex, France. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LD designed the experiments, performed the experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript.

MT and CL contributed to sample preparation from patients and healthy controls, designed the experiments, performed the experiments, and analyzed and interpreted the data. AT provided clinical samples and contributed to the interpretation of data. AB, AH, and J-MG together were responsible for the overall study design, supervised the project, and took primary responsibility for writing the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was supported by Ligue contre le Cancer du Grand Ouest (Comités départementaux de la Vienne, de la Charente, de la Charente Maritime) and Sport and Collection. This study was supported by INSERM, CHU de Poitiers, Université de Poitiers.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are especially indebted to Jeffrey Arsham for editing the English of their manuscript. They thank Image UP (Université de Poitiers) flow cytometry core facilities. Illustrations used elements from Servier Medical Art: www.servier.fr/servier-medical-art.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.674016/full#supplementary-material

REFERENCES

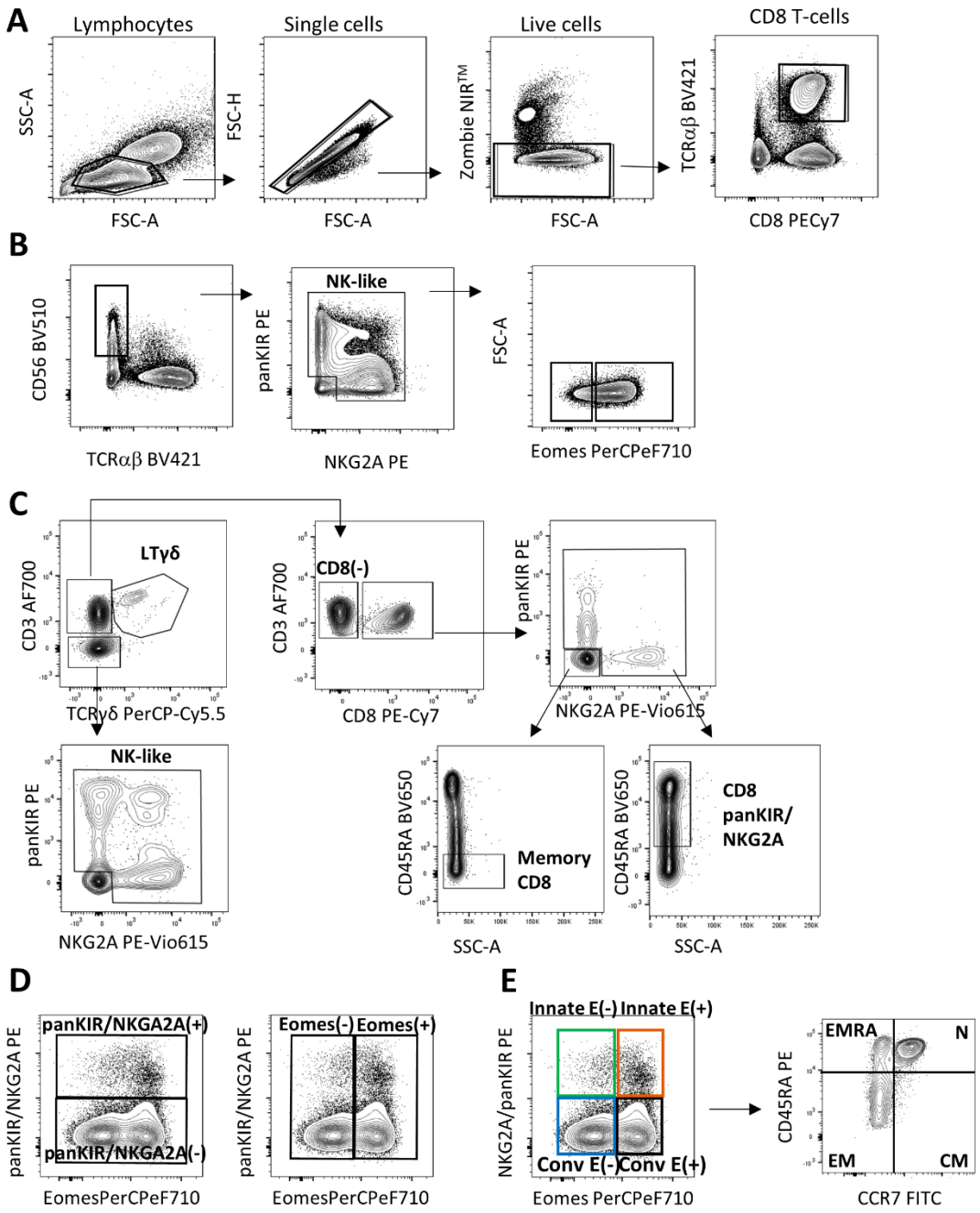
1. Atherly LO, Lucas JA, Felices M, Yin CC, Reiner SL, Berg LJ. The Tec Family Tyrosine Kinases Itk and Rlk Regulate the Development of Conventional CD8+ T Cells. *Immunity* (2006) 25(1):79–91. doi: 10.1016/j.immuni.2006.05.012
2. Hu J, Sahu N, Walsh E, August A. Memory Phenotype CD8+ T Cells With Innate Function Selectively Develop in the Absence of Active Itk. *Eur J Immunol* (2007) 37(10):2892–9. doi: 10.1002/eji.200737311
3. Broussard C, Fleischacker C, Fleischecker C, Horai R, Chetana M, Venegas AM, et al. Altered Development of CD8+ T Cell Lineages in Mice Deficient for the Tec Kinases Itk and Rlk. *Immunity* (2006) 25(1):93–104. doi: 10.1016/j.immuni.2006.05.011
4. Weinreich MA, Odumade OA, Jameson SC, Hogquist KA. T Cells Expressing the Transcription Factor PLZF Regulate the Development of Memory-Like CD8+ T Cells. *Nat Immunol* (2010) 11(8):709–16. doi: 10.1038/ni.1898
5. Verykokakis M, Boos MD, Bendelac A, Kee BL. SAP Protein-Dependent Natural Killer T-Like Cells Regulate the Development of CD8(+) T Cells With Innate Lymphocyte Characteristics. *Immunity* (2010) 33(2):203–15. doi: 10.1016/j.immuni.2010.07.013
6. Fukuyama T, Kasper LH, Boussouar F, Jeevan T, van Deursen J, Brindle PK. Histone Acetyltransferase CBP Is Vital to Demarcate Conventional and Innate CD8+ T-Cell Development. *Mol Cell Biol* (2009) 29(14):3894–904. doi: 10.1128/MCB.01598-08
7. Gordon SM, Carty SA, Kim JS, Zou T, Smith-Garvin J, Alonzo ES, et al. Requirements for Eomesodermin and Promyelocytic Leukemia Zinc Finger in the Development of Innate-Like CD8+ T Cells. *J Immunol* (2011) 186 (8):4573–8. doi: 10.4049/jimmunol.1100037
8. Berg RE, Cordes CJ, Forman J. Contribution of CD8+ T Cells to Innate Immunity: IFN-Gamma Secretion Induced by IL-12 and IL-18. *Eur J Immunol* (2002) 32(10):2807–16. doi: 10.1002/1521-4141(2002010)32:10<2807::AID-IMMU2807>3.0.CO;2-0
9. Su J, Berg RE, Murray S, Forman J. Thymus-Dependent Memory Phenotype CD8 T Cells in Naive B6.H-2kb-/-Db-/- Animals Mediate an Antigen-Specific Response Against Listeria Monocytogenes. *J Immunol* (2005) 175(10):6450–7. doi: 10.4049/jimmunol.175.10.6450
10. Horai R, Mueller KL, Handon RA, Cannons JL, Anderson SM, Kirby MR, et al. Requirements for Selection of Conventional and Innate T Lymphocyte Lineages. *Immunity* (2007) 27(5):775–85. doi: 10.1016/j.immuni.2007.09.012
11. Haluszczak C, Akue AD, Hamilton SE, Johnson LDS, Pujanauski L, Teodorovic L, et al. The Antigen-Specific CD8+ T Cell Repertoire in Unimmunized Mice Includes Memory Phenotype Cells Bearing Markers of Homeostatic Expansion. *J Exp Med* (2009) 206(2):435–48. doi: 10.1084/jem.20081829
12. Rudd BD, Venturi V, Li G, Samadder P, Ertelt JM, Way SS, et al. Nonrandom Attrition of the Naive CD8+ T-Cell Pool With Aging Governed by T-Cell Receptor:pMHC Interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* (2011) 108(33):13694–9. doi: 10.1073/pnas.1107594108
13. Lee J-Y, Hamilton SE, Akue AD, Hogquist KA, Jameson SC. Virtual Memory CD8 T Cells Display Unique Functional Properties. *Proc Natl Acad Sci USA* (2013) 110(33):13498–503. doi: 10.1073/pnas.1307572110
14. Akue AD, Lee J-Y, Jameson SC. Derivation and Maintenance of Virtual Memory CD8 T Cells. *J Immunol* (2012) 188(6):2516–23. doi: 10.4049/jimmunol.1102213
15. Arlettaz L, Degermann S, De Rham C, Roosnek E, Huard B. Expression of Inhibitory KIR Is Confined to CD8+ Effector T Cells and Limits Their Proliferative Capacity. *Eur J Immunol* (2004) 34(12):3413–22. doi: 10.1002/eji.200324756
16. Arlettaz L, Villard J, de Rham C, Degermann S, Chapuis B, Huard B, et al. Activating CD94:NKG2C and Inhibitory CD94:NKG2A Receptors Are Expressed by Distinct Subsets of Committed CD8+ TCR Alphabeta Lymphocytes. *Eur J Immunol* (2004) 34(12):3456–64. doi: 10.1002/eji.200425210
17. Huard B, Karlsson L. A Subpopulation of CD8+ T Cells Specific for Melanocyte Differentiation Antigens Expresses Killer Inhibitory Receptors (KIR) in Healthy Donors: Evidence for a Role of KIR in the Control of Peripheral Tolerance. *Eur J Immunol* (2000) 30(6):1665–75. doi: 10.1002/1521-4141(200006)30:6<1665::AID-IMMU1665>3.0.CO;2-2
18. van der Veken LT, Diez Campelo M, van der Hoorn MAWG, Hagedoorn RS, van Egmond HME, van Bergen J, et al. Functional Analysis of Killer Ig-Like Receptor-Expressing Cytomegalovirus-Specific CD8+ T Cells. *J Immunol* (2009) 182(1):92–101. doi: 10.4049/jimmunol.182.1.92
19. Warren HS, Rana PM, Rieger DT, Hewitt KA, Dahlstrom JE, Kent AL. CD8 T Cells Expressing Killer Ig-Like Receptors and NKG2A are Present in Cord Blood and Express a More Naïve Phenotype Than Their Counterparts in Adult Blood. *J Leukoc Biol* (2006) 79(6):1252–9. doi: 10.1189/jlb.0905536
20. Bjorkstrom NK, Beziat V, Cichocki F, Liu LL, Levine J, Larsson S, et al. CD8 T Cells Express Randomly Selected KIRs With Distinct Specificities Compared With NK Cells. *Blood* (2012) 120(17):3455–65. doi: 10.1182/blood-2012-03-416867
21. Guia S, Cognet C, de Beaucoudrey L, Tessmer MS, Jouanguy E, Berger C, et al. A Role for Interleukin-12/23 in the Maturation of Human Natural Killer and CD56+ T Cells *In Vivo*. *Blood* (2008) 111(10):5008–16. doi: 10.1182/blood-2007-11-122259
22. Boelen L, Debebe B, Silveira M, Salam A, Makinde J, Roberts CH, et al. Inhibitory Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors Strengthen CD8+ T Cell-Mediated Control of HIV-1, HCV, and HTLV-1. *Sci Immunol* (2018) 3 (29):eaao2892. doi: 10.1126/sciimmunol.aao2892
23. Min HS, Lee YJ, Jeon YK, Kim EJ, Kang BH, Jung KC, et al. MHC Class II-Restricted Interaction Between Thymocytes Plays an Essential Role in the Production of Innate CD8+ T Cells. *J Immunol* (2011) 186(10):5749–57. doi: 10.4049/jimmunol.1002825
24. Jacomet F, Cayssials E, Basbous S, Levescot A, Piccirilli N, Desmier D, et al. Evidence for Eomesodermin-Expressing Innate-Like CD8 $^{+}$ KIR/NKG2A $^{+}$ T Cells in Human Adults and Cord Blood Samples: Innate Immunity. *Eur J Immunol* (2015) 45(7):1926–33. doi: 10.1002/eji.201545539

25. White JT, Cross EW, Burchill MA, Danhorn T, McCarter MD, Rosen HR, et al. Virtual Memory T Cells Develop and Mediate Bystander Protective Immunity in an IL-15-Dependent Manner. *Nat Commun* (2016) 217:11291. doi: 10.1038/ncomms11291
26. Kaer LV. Innate and Virtual Memory T Cells in Man. *Eur J Immunol* (2015) 45(7):1916–20. doi: 10.1002/eji.201545761
27. Barbarin A, Cayssials E, Jacomet F, Nunez NG, Basbous S, Lefèvre L, et al. Phenotype of NK-Like CD8(+) T Cells With Innate Features in Humans and Their Relevance in Cancer Diseases. *Front Immunol* (2017) 8:316. doi: 10.3389/fimmu.2017.00316
28. Quinn KM, Fox A, Harland KL, Russ BE, Li J, Nguyen THO, et al. Age-Related Decline in Primary CD8+ T Cell Responses Is Associated With the Development of Senescence in Virtual Memory CD8+ T Cells. *Cell Rep* (2018) 23(12):3512–24. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.057
29. Quinn KM, Hussain T, Kraus F, Formosa LE, Lam WK, Dagley MJ, et al. Metabolic Characteristics of CD8+ T Cell Subsets in Young and Aged Individuals Are Not Predictive of Functionality. *Nat Commun* (2020) 11 (1):2857. doi: 10.1038/s41467-020-16633-7
30. Smith NL, Patel RK, Reynaldi A, Grenier JK, Wang J, Watson NB, et al. Developmental Origin Governs CD8+ T Cell Fate Decisions During Infection. *Cell* (2018) 174(1):117–30.e14. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.029
31. Rudd BD. Neonatal T Cells: A Reinterpretation. *Annu Rev Immunol* (2020) 38:229–47. doi: 10.1146/annurev-immunol-091319-083608
32. Gibbons D, Fleming P, Virasami A, Michel M-L, Sebire NJ, Costeloe K, et al. Interleukin-8 (CXCL8) Production Is a Signatory T Cell Effector Function of Human Newborn Infants. *Nat Med* (2014) 20(10):1206–10. doi: 10.1038/nm.3670
33. Das A, Rouault-Pierre K, Kamdar S, Gomez-Tourino I, Wood K, Donaldson I, et al. Adaptive From Innate: Human IFN-γ+CD4+ T Cells Can Arise Directly From CXCL8-Producing Recent Thymic Emigrants in Babies and Adults. *J Immunol* (2017) 199(5):1696–705. doi: 10.4049/jimmunol.1700551
34. Galindo-Albarrán AO, López-Portales OH, Gutiérrez-Reyna DY, Rodríguez-Jorge O, Sánchez-Villanueva JA, Ramírez-Pliego O, et al. CD8+ T Cells From Human Neonates Are Biased Toward an Innate Immune Response. *Cell Rep* (2016) 17(8):2151–60. doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.056
35. Callender LA, Carroll EC, Bober EA, Akbar AN, Solito E, Henson SM. Mitochondrial Mass Governs the Extent of Human T Cell Senescence. *Aging Cell* (2020) 19(2):e13067. doi: 10.1111/acel.13067
36. Pereira BI, Akbar AN. Convergence of Innate and Adaptive Immunity During Human Aging. *Front Immunol* (2016) 7:445. doi: 10.3389/fimmu.2016.00445
37. Cichocki F, Wu C-Y, Zhang B, Felices M, Tesi B, Tuininga K, et al. ARID5B Regulates Metabolic Programming in Human Adaptive NK Cells. *J Exp Med* (2018) 215(9):2379–95. doi: 10.1084/jem.20172168
38. Keating SE, Zaiatz-Bittencourt V, Loftus RM, Keane C, Brennan K, Finlay DK, et al. Metabolic Reprogramming Supports IFN-γ Production by CD56bright NK Cells. *J Immunol* (2016) 196(6):2552–60. doi: 10.4049/jimmunol.1501783
39. Surace L, Doisne J-M, Escoll P, Marie S, Dardalhon V, Croft C, et al. Polarized Mitochondria as Guardians of NK Cell Fitness. *Blood Adv* (2021) 5(1):26–38. doi: 10.1182/bloodadvances.2020003458
40. Wencker M, Turchinovich G, Di Marco Barros R, Deban L, Jandke A, Cope A, et al. Innate-Like T Cells Straddle Innate and Adaptive Immunity by Altering Antigen-Receptor Responsiveness. *Nat Immunol* (2014) 15(1):80–7. doi: 10.1038/ni.2773
41. Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, et al. The Pro-Th2 Cytokine IL-33 Directly Interacts With Invariant NKT and NK Cells to Induce IFN-Gamma Production. *Eur J Immunol* (2009) 39(4):1046–55. doi: 10.1002/eji.200838575
42. Bourgeois EA, Levescot A, Diem S, Chauvineau A, Bergès H, Milpied P, et al. A Natural Protective Function of Invariant NKT Cells in a Mouse Model of Innate-Cell-Driven Lung Inflammation. *Eur J Immunol* (2011) 41(2):299–305. doi: 10.1002/eji.201040647
43. Leite-De-Moraes MC, Hameg A, Arnould A, Machavoine F, Koezuka Y, Schneider E, et al. A Distinct IL-18-Induced Pathway to Fully Activate NK T Lymphocytes Independently From TCR Engagement. *J Immunol Baltim Md 1950* (1999) 163(11):5871–6.
44. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon B-RP, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 Amplifies Both Th1- and Th2-Type Responses Through its Activity on Human Basophils, Allergen-Reactive Th2 Cells, iNKT and NK Cells. *Int Immunol* (2008) 20(8):1019–30. doi: 10.1093/intimm/dxn060
45. Gutierrez-Arcelus M, Teslovich N, Mola AR, Polidoro RB, Nathan A, Kim H, et al. Lymphocyte Innateness Defined by Transcriptional States Reflects a Balance Between Proliferation and Effector Functions. *Nat Commun* (2019) 10(1):687. doi: 10.1038/s41467-019-08604-4
46. Moran AE, Holzapfel KL, Xing Y, Cunningham NR, Maltzman JS, Punt J, et al. T Cell Receptor Signal Strength in Treg and iNKT Cell Development Demonstrated by a Novel Fluorescent Reporter Mouse. *J Exp Med* (2011) 208 (6):1279–89. doi: 10.1084/jem.20110308
47. Vahl JC, Heger K, Knies N, Hein MY, Boon L, Yagita H, et al. NKT Cell-TCR Expression Activates Conventional T Cells *In Vivo*, But Is Largely Dispensable for Mature NKT Cell Biology. *PloS Biol* (2013) 11(6):e1001589. doi: 10.1371/journal.pbio.1001589
48. Ranson T, Vosshenrich CAJ, Corcuff E, Richard O, Müller W, Di Santo JP. IL-15 Is an Essential Mediator of Peripheral NK-Cell Homeostasis. *Blood* (2003) 101(12):4887–93. doi: 10.1182/blood-2002-11-3392
49. Gordy LE, Bezbradica JS, Flyak AI, Spencer CT, Dunkle A, Sun J, et al. IL-15 Regulates Homeostasis and Terminal Maturation of NKT Cells. *J Immunol Baltim Md 1950* (2011) 187(12):6335–45. doi: 10.4049/jimmunol.1003965
50. Matsuda JL, Gapin L, Sidobre S, Kieper WC, Tan JT, Ceredig R, et al. Homeostasis of V Alpha 14i NKT Cells. *Nat Immunol* (2002) 3(10):966–74. doi: 10.1038/ni837
51. Kumar A, Pyaram K, Yarosz EL, Hong H, Lyssiotis CA, Giri S, et al. Enhanced Oxidative Phosphorylation in NKT Cells Is Essential for Their Survival and Function. *Proc Natl Acad Sci USA* (2019) 116(15):7439–48. doi: 10.1073/pnas.1901376116
52. Zinser ME, Highton AJ, Kurioka A, Kronsteiner B, Hagel J, Leng T, et al. Human MAIT Cells Show Metabolic Quiescence With Rapid Glucose-Dependent Upregulation of Granzyme B Upon Stimulation. *Immunol Cell Biol* (2018) 96(6):666–74. doi: 10.1111/imcb.12020
53. O'Brien KL, Finlay DK. Immunometabolism and Natural Killer Cell Responses. *Nat Rev Immunol* (2019) 19(5):282–90. doi: 10.1038/s41577-019-0139-2
54. Raynor JL, Liu C, Dhungana Y, Guy C, Chapman NM, Shi H, et al. Hippo/Mst Signaling Coordinates Cellular Quiescence With Terminal Maturation in iNKT Cell Development and Fate Decisions. *J Exp Med* (2020) 217(6): e20191157. doi: 10.1084/jem.20191157
55. Van Kaer L, Joyce S. Survivre Et Vivre: When iNKT Cells Met a Hippo. *J Exp Med* (2020) 217(6):e20200343. doi: 10.1084/jem.20200343
56. Verykokakis M, Kee BL. Applying the TOR(C)QUE in iNKT Cells: A New Twist in an Old Tale. *Eur J Immunol* (2017) 47(3):454–7. doi: 10.1002/eji.201746921
57. Sklarz T, Guan P, Gohil M, Cotton RM, Ge MQ, Haczku A, et al. Mtorc2 Regulates Multiple Aspects of NKT-Cell Development and Function. *Eur J Immunol* (2017) 47(3):516–26. doi: 10.1002/eji.201646343
58. Goronzy JJ, Weyand CM. Mechanisms Underlying T Cell Ageing. *Nat Rev Immunol* (2019) 19(9):573–83. doi: 10.1038/s41577-019-0180-1
59. Qi Q, Liu Y, Cheng Y, Glanville J, Zhang D, Lee J-Y, et al. Diversity and Clonal Selection in the Human T-Cell Repertoire. *Proc Natl Acad Sci USA* (2014) 111 (36):13139–44. doi: 10.1073/pnas.1409155111
60. Jones JL, Thompson SAJ, Loh P, Davies JL, Tuohy OC, Curry AJ, et al. Human Autoimmunity After Lymphocyte Depletion Is Caused by Homeostatic T-Cell Proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* (2013) 110(50):20200–5. doi: 10.1073/pnas.1313654110
61. Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni FF, Akbar A, Arens R, Chiu Y-L, et al. New Advances in CMV and Immunosenescence. *Exp Gerontol* (2014) 55:54–62. doi: 10.1016/j.exger.2014.03.020
62. Saurwein-Teissl M, Lung TL, Marx F, Gschösser C, Asch E, Blasko I, et al. Lack of Antibody Production Following Immunization in Old Age: Association With CD8(+)CD28(-) T Cell Clonal Expansions and an Imbalance in the Production of Th1 and Th2 Cytokines. *J Immunol* (2002) 168(11):5893–9. doi: 10.4049/jimmunol.168.11.5893
63. Goronzy JJ, Weyand CM. Successful and Maladaptive T Cell Aging. *Immunity* (2017) 46(3):364–78. doi: 10.1016/j.immuni.2017.03.010
64. Ucar D, Márquez EJ, Chung C-H, Marches R, Rossi RJ, Uyar A, et al. The Chromatin Accessibility Signature of Human Immune Aging Stems From CD8+ T Cells. *J Exp Med* (2017) 214(10):3123–44. doi: 10.1084/jem.20170416

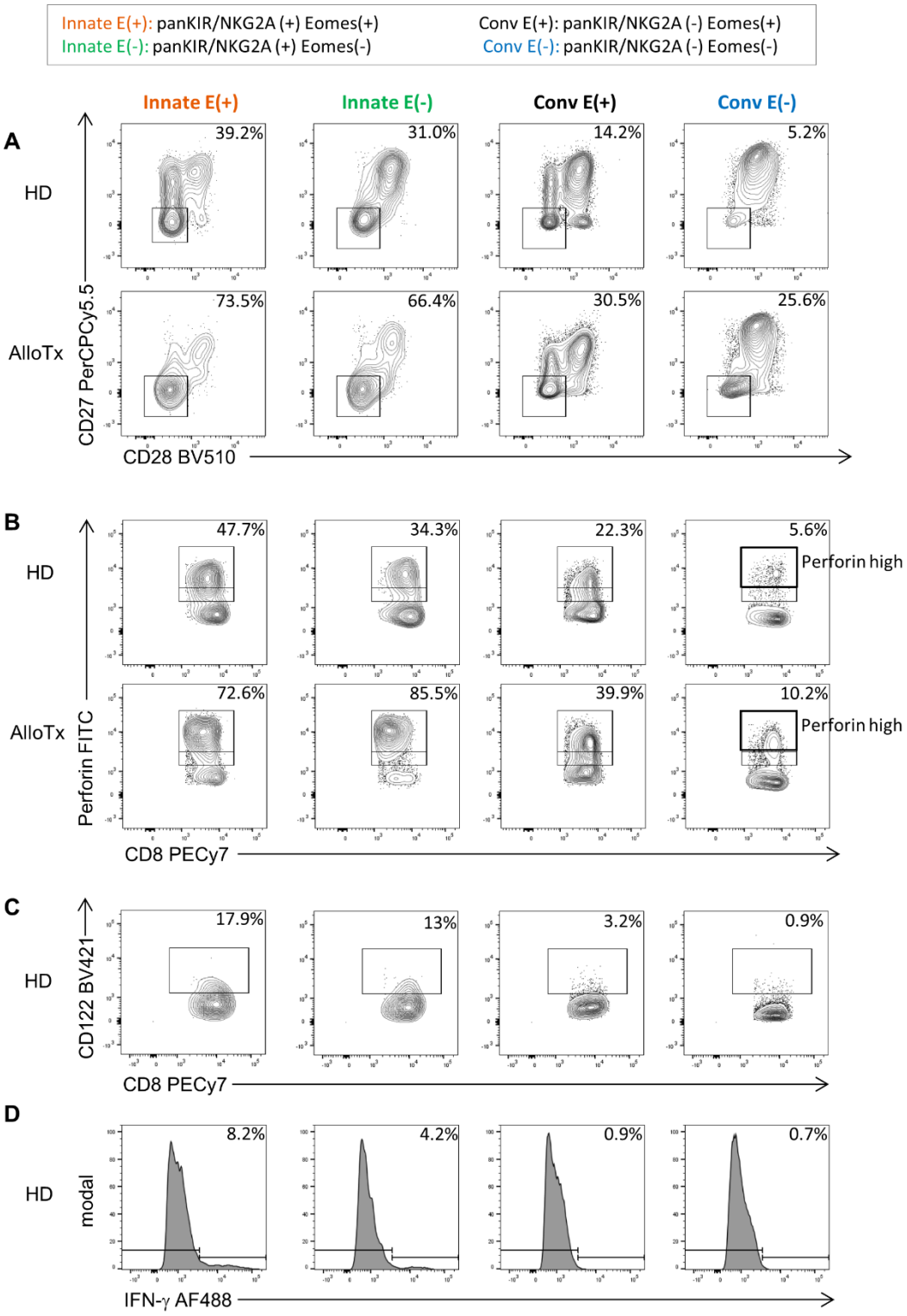
65. Tilly G, Doan-Ngoc T-M, Yap M, Caristan A, Jacquemont L, Danger R, et al. IL-15 Harnesses Pro-Inflammatory Function of TEMRA CD8 in Kidney-Transplant Recipients. *Front Immunol* (2017) 8:778. doi: 10.3389/fimmu.2017.00778
66. Scharping NE, Menk AV, Moreci RS, Whetstone RD, Dadey RE, Watkins SC, et al. The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity* (2016) 45(2):374–88. doi: 10.1016/j.immuni.2016.07.009
67. Bengsch B, Johnson AL, Kurachi M, Odorizzi PM, Pauken KE, Attanasio J, et al. Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion. *Immunity* (2016) 45(2):358–73. doi: 10.1016/j.immuni.2016.07.008
68. Lee JH, Budanov AV, Park EJ, Birse R, Kim TE, Perkins GA, et al. Sestrin as a Feedback Inhibitor of TOR That Prevents Age-Related Pathologies. *Science* (2010) 327(5970):1223–8. doi: 10.1126/science.1182228
69. Lanna A, Gomes DCO, Muller-Durovic B, McDonnell T, Escors D, Gilroy DW, et al. A Sestrin-Dependent Erk-Jnk-P38 MAPK Activation Complex Inhibits Immunity During Aging. *Nat Immunol* (2017) 18(3):354–63. doi: 10.1038/ni.3665
70. Pereira BI, De Maeyer RPH, Covre LP, Nehar-Belaid D, Lanna A, Ward S, et al. Sestrins Induce Natural Killer Function in Senescent-Like CD8+ T Cells. *Nat Immunol* (2020) 21(6):684–94. doi: 10.1038/s41590-020-0643-3
71. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, et al. A Complex Secretory Program Orchestrated by the Inflammasome Controls Paracrine Senescence. *Nat Cell Biol* (2013) 15(8):978–90. doi: 10.1038/ncb2784
72. Velotti F, Barchetta I, Cimini FA, Cavallo MG. Granzyme B in Inflammatory Diseases: Apoptosis, Inflammation, Extracellular Matrix Remodeling, Epithelial-To-Mesenchymal Transition and Fibrosis. *Front Immunol* (2020) 11:587581. doi: 10.3389/fimmu.2020.587581
73. Mogilenko DA, Shpynov O, Andhey PS, Arthur L, Swain A, Esaulova E, et al. Comprehensive Profiling of an Aging Immune System Reveals Clonal GZMK+ CD8+ T Cells as Conserved Hallmark of Inflammaging. *Immunity* (2021) 54 (1):99–115.e12. doi: 10.1016/j.immuni.2020.11.005
74. Camell CD. Taa Cells and Granzyme K: Old Players With New Tricks. *Immunity* (2021) 54(1):6–8. doi: 10.1016/j.immuni.2020.12.008
75. Jin J-H, Huang H-H, Zhou M-J, Li J, Hu W, Huang L, et al. Virtual Memory CD8+ T Cells Restrain the Viral Reservoir in HIV-1-Infected Patients With Antiretroviral Therapy Through Derepressing KIR-Mediated Inhibition. *Cell Mol Immunol* (2020) 17(12):1257–65. doi: 10.1038/s41423-020-0408-9
76. Schirmer M, Goldberger C, Würzner R, Duftner C, Pfeiffer K-P, Clausen J, et al. Circulating Cytotoxic CD8(+) CD28(-) T Cells in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Res* (2002) 4(1):71–6. doi: 10.1186/ar386
77. Pita-Lopez ML, Ortiz-Lazareno PC, Navarro-Meza M, Santoyo-Telles F, Peralta-Zaragoza O. CD28-, CD45RA(null/dim) and Natural Killer-Like CD8+ T Cells are Increased in Peripheral Blood of Women With Low-Grade Cervical Lesions. *Cancer Cell Int* (2014) 14(1):97. doi: 10.1186/s12935-014-0097-5
78. Thierry A, Lemeur Y, Ecotière L, Abou-Ayache R, Etienne I, Laurent C, et al. Minimization of Maintenance Immunosuppressive Therapy After Renal Transplantation Comparing Cyclosporine A/azathioprine or Cyclosporine A/mycophenolate Mofetil Bitherapy to Cyclosporine A Monotherapy: A 10-Year Postrandomization Follow-Up Study. *Transpl Int* (2016) 29(1):23–33. doi: 10.1111/tri.12627
79. Borchers AT, Perez R, Kaysen G, Ansari AA, Gershwin ME. Role of Cytomegalovirus Infection in Allograft Rejection: A Review of Possible Mechanisms. *Transpl Immunol* (1999) 7(2):75–82. doi: 10.1016/S0966-3274(99)80023-9
80. Leeaphorn N, Garg N, Thamcharoen N, Khankin EV, Cardarelli F, Pavlakis M. Cytomegalovirus Mismatch Still Negatively Affects Patient and Graft Survival in the Era of Routine Prophylactic and Preemptive Therapy: A Paired Kidney Analysis. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* (2019) 19(2):573–84. doi: 10.1111/ajt.15183
81. Kasakovski D, Zeng X, Lai J, Yu Z, Yao D, Chen S, et al. Characterization of KIR + NKG2A + Eomes- NK-Like CD8+ T Cells and Their Decline With Age in Healthy Individuals. *Cytometry B Clin Cytom* (2020) 1–9. doi: 10.1002/cyto.b.21945
82. Li P, Tian C, Ge N, Wang H, Liu L, Lou F, et al. Premature Senescence of T Cells in Long-Term Survivors of Renal Transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* (2011) 407(3):599–604. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.03.079
83. Torres IB, Moreso F, Sarró E, Meseguer A, Serón D. The Interplay Between Inflammation and Fibrosis in Kidney Transplantation. *BioMed Res Int* (2014) 2014:e750602. doi: 10.1155/2014/750602
84. Cuellar-Rodríguez J, Sierra-Madero JG. Infections in Solid Organ Transplant Recipients. *Rev Investig Clin Organo Hosp Enfermedades Nutr* (2005) 57 (2):368–80.
85. Sherston SN, Carroll RP, Harden PN, Wood KJ. Predictors of Cancer Risk in the Long-Term Solid-Organ Transplant Recipient. *Transplantation* (2014) 97 (6):605–11. doi: 10.1097/01.TP.0000436907.56425.5c
86. Jacquemont L, Tilly G, Yap M, Doan-Ngoc T-M, Danger R, Guérif P, et al. Terminally Differentiated Effector Memory CD8+ T Cells Identify Kidney Transplant Recipients at High Risk of Graft Failure. *J Am Soc Nephrol JASN* (2020) 31(4):876–91. doi: 10.1681/ASN.2019080847

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

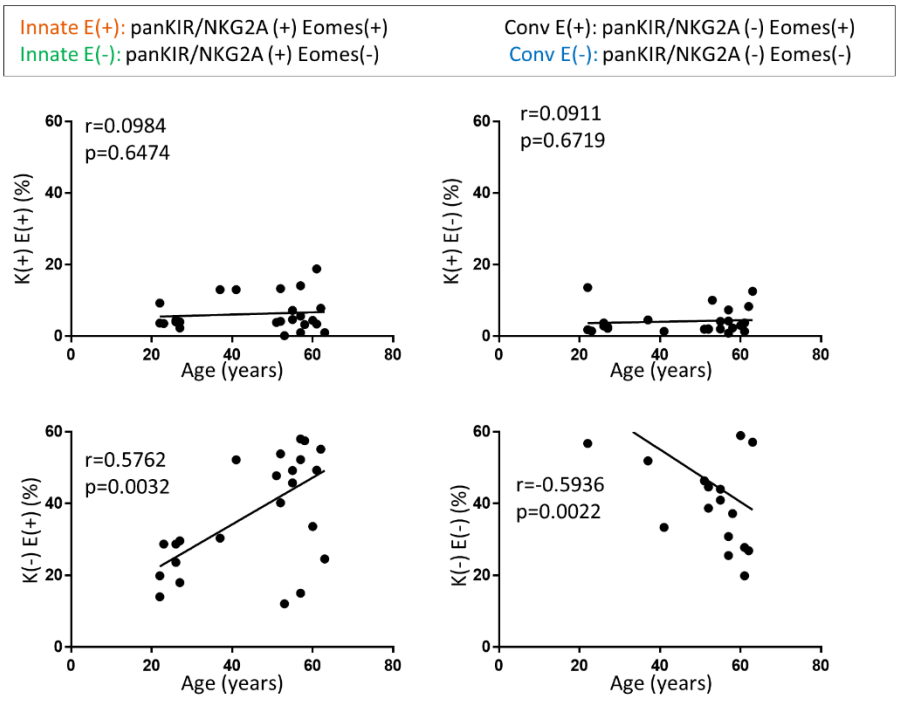
Copyright © 2021 Daniel, Tassery, Lateur, Thierry, Herbelin, Gombert and Barbarin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



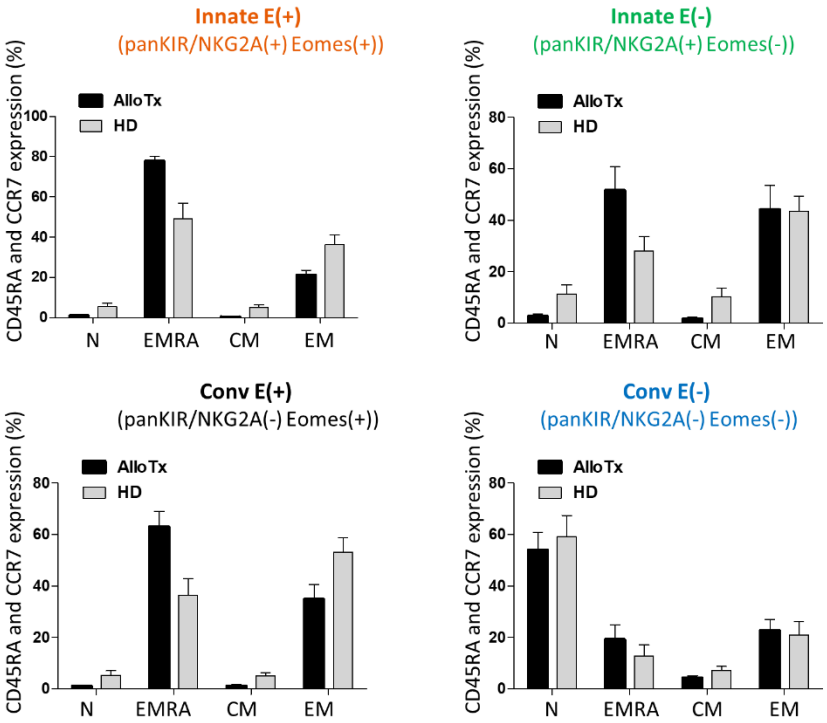
Supplemental Figure 1: Gating strategy for the analysis of CD8(+) T-cell subpopulations in PBMC from HD and AlloTx recipients. A. Gates applicable to all the main Figures. **B.** Gating strategy of the Eomes(+) *versus* Eomes(-) NK-like cell populations analysed for IFN-γ expression in Figure 1D. **C.** Gating strategy of the different cell populations depicted in Figure 1E for MTDR analysis. **D.** Gating strategy of the Eomes and panKIR/NKG2A (+) and (-) cell populations depicted in Figure 4A for senescence (CD27(-)CD28(-)) analysis. **E.** Gating strategy based on NKG2A/panKIR and Eomes expression defining Innate E(+) and E(-) and Conv E(+) and E(-) CD8 T-cells, applicable to all the Figures (except for Figure 1E and Figure 4A). CD8 T-cell subpopulation denominations in the CCR7/CD45RA gating: naive (N): CD45RA(+)CCR7(+); EMRA: CD45RA(+)CCR7(-); central memory (CM): CD45RA(-)CCR7(+); effector memory (EM): CD45RA(-)CCR7(-).



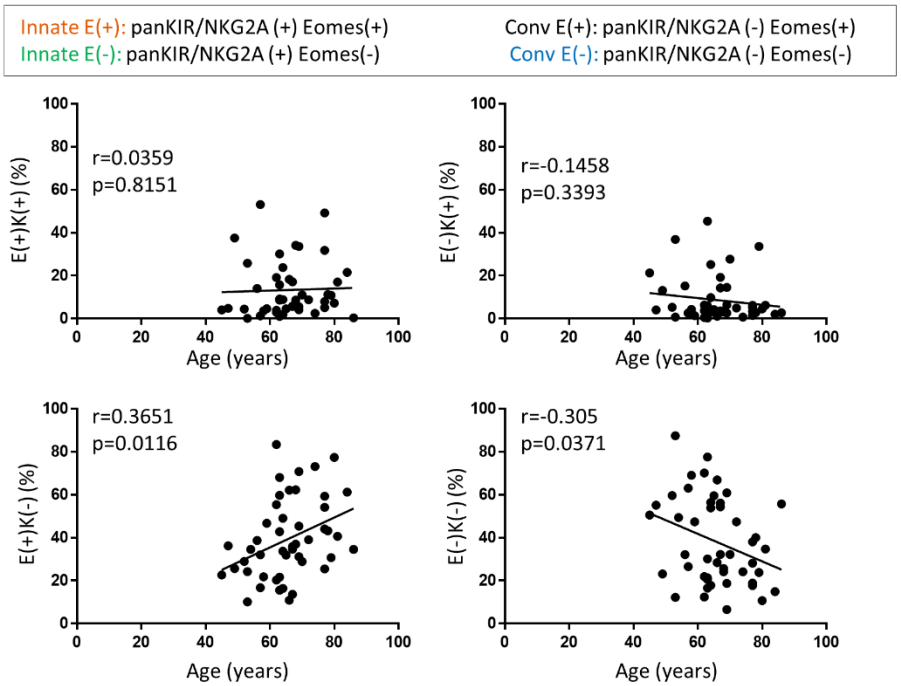
Supplemental Figure 2: Representative plots of senescence **(A)**, perforin **(B)**, CD122 **(C)** and IFN-g **(D)** analysis.



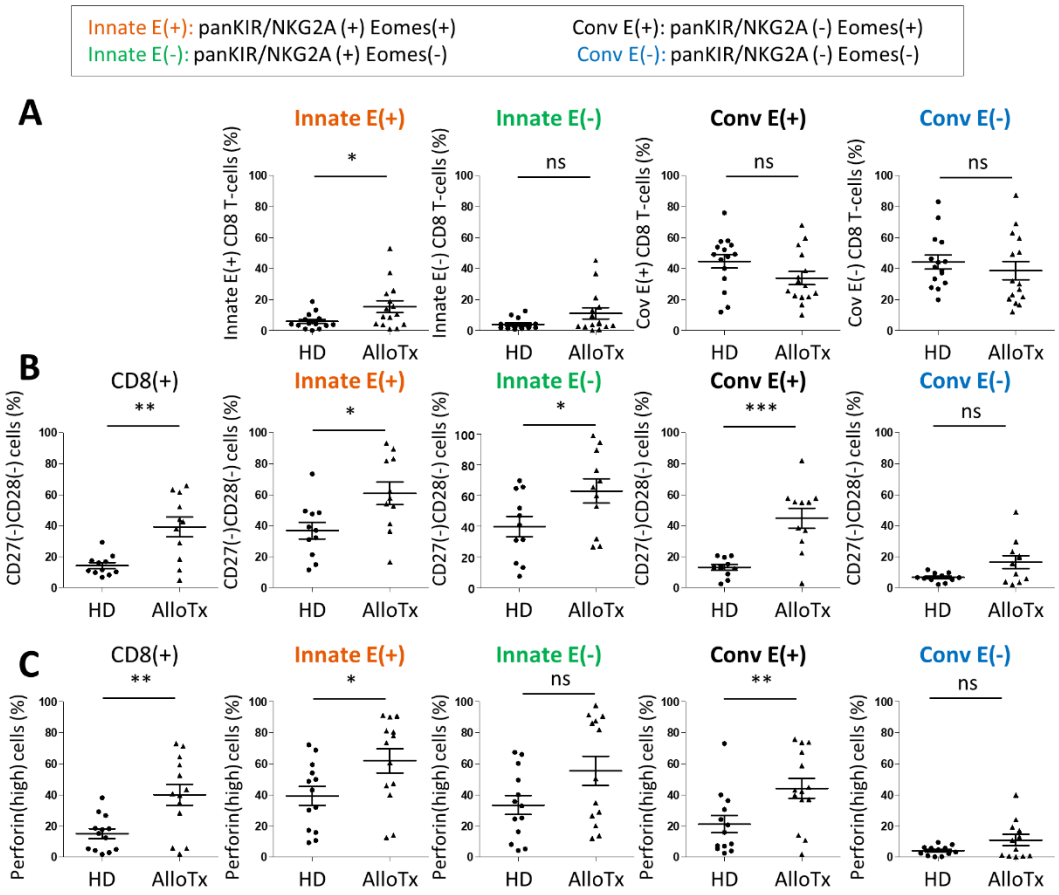
Supplemental Figure 3: The higher frequency of innate-like CD8 T-cell populations is not correlated with age of HD, contrarily to naive and memory conventional CD8 T-cell populations. Pearson correlation analysis between frequency of the four CD8 T-cell subpopulations according to panKIR/NKG2A and Eomes markers and age of HD (n=22).



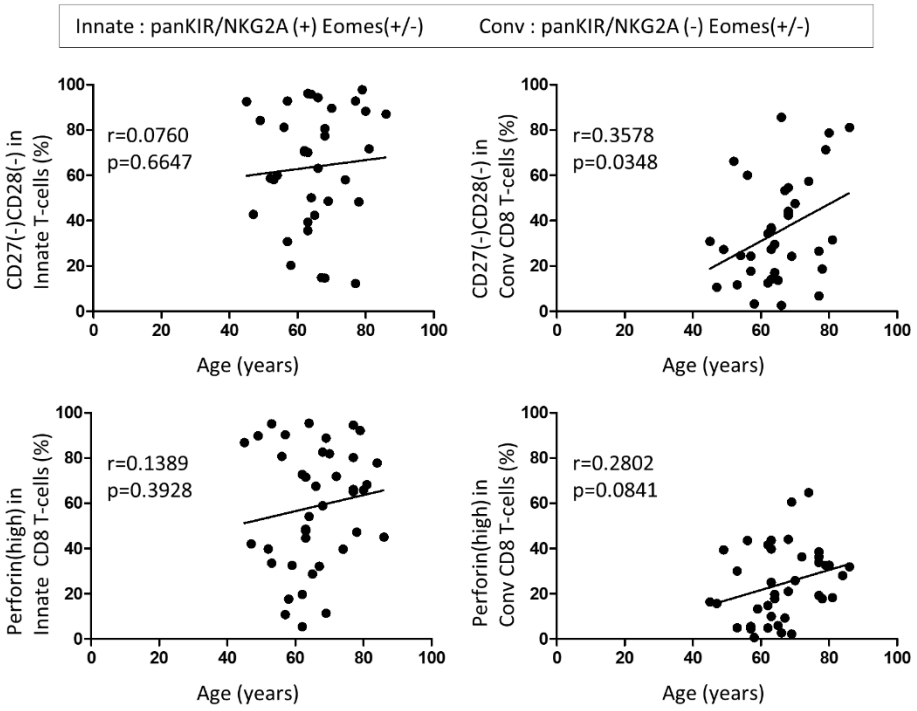
Supplemental Figure 4: Distribution of naïve, EMRA, central memory and effector memory cell phenotypes among innate and conventional naïve/memory CD8 T-cell subpopulations. Flow cytometry analysis of the frequencies of CD45RA- and/or CCR7- expressing cells in the four CD8 T-cell subpopulations according to NKG2A/Pan-KIR and Eomes (E) markers among TCRαb(+)CD8(+) live lymphocytes in HD (n=11) and AlloTx (n=8). CD8 T-cell subpopulation denominations: naive (N): CD45RA(+)CCR7(+); EMRA: CD45RA(+)CCR7(-); central memory (CM): CD45RA(-)CCR7(+); effector memory (EM): CD45RA(-)CCR7(-).



Supplemental Figure 5: The higher frequency of innate CD8 T-cell populations is not correlated with age of AlloTx patients, contrarily to naive and memory conventional CD8 T-cell populations. Pearson correlation analysis between frequency of the four CD8 T-cell subpopulations according to panKIR/NKG2A and Eomes markers and age of AlloTx patients (n=45).



Supplemental Figure 6: Higher cell frequency and exacerbated senescence/terminal differentiation profile of innate CD8 T-cells in AlloTx recipients do not result from age-bias. The frequencies of the four CD8 T-cell subpopulations according to panKIR/NKG2A and Eomes markers **(A)** and the frequencies of senescent CD27(-)CD28(-) **(B)** and perforin(high)-expressing cells **(C)** are analyzed in HD and AlloTx patient age-matched pairs (**A**: n=15, **B**: n=11, **C**: n=13). Each dot represents one HD or AlloTx patient. Mean ± SEM, two-tailed Mann–Whitney non-parametric test. *p<0.05; **p<0.01; ns: not significant.



Supplemental Figure 7: Senescent and inflammaging phenotypes are not related to age in innate CD8 T-cells from AlloTx patients. Pearson correlation analysis between frequency of the senescent (CD27(-) CD28(-)) and inflammaging (perforin(high)) phenotypes among Innate (panKIR/NKG2A(+)) and Conv (panKIR/NKG2A(-)) CD8 T-cells and age in AlloTx patients (CD27(-)CD28(-): n=35; perforin: n=40).

Supplementary table: Anti-human antibodies used in this study

Antibody	Fluorochrome	Clone	Supplier	Reference	RRID
IFN-γ	AF488	4S.B3	BioLegend	502515	AB_493029
TCRαβ	AF488	IP26	BioLegend	306712	AB_528967
Perforin	FITC	sigmaG9	BD Biosciences	556577	AB_396470
CCR7	FITC	150503	RD systems	FAB197F	AB_2259847
IFN-γ	APC	B27	BioLegend	506510	AB_315443
Eomes	eF660	WD1928	eBioscience	50-4877-42	AB_2574229
TCRαβ	BV421	IP26	BioLegend	306722	AB_2562805
Ki67	BV421	Ki-67	BioLegend	350506	AB_2563860
CD122	BV421	Mik-β3	BD Biosciences	562887	AB_2737866
CD45RA	BV510	HI100	BioLegend	304142	AB_2561947
CD28	BV510	CD28.2	BioLegend	302936	AB_2562030
TCRαβ	BV510	IP26	BioLegend	306734	AB_2650821
NKG2A	PE	REA110	Miltenyi Biotec	130-113-566	AB_2726171
KIR2D	PE	NKVFS1	Miltenyi Biotec	130-092-688	AB_871570
KIR3DL1/2	PE	5.133	Miltenyi Biotec	130-095-205	AB_10839570
CD8	PECy7	RPA-T8	BD Pharmingen	557746	AB_396852
CD69	PerCpCy5.5	FN50	BioLegend	310926	AB_2074956
CD27	PerCPCy5.5	O323	BioLegend	302820	AB_2073318
Eomes	PerCPeF710	WD1928	eBioscience	46-4877-42	AB_2573759

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. Evidence d'une reprogrammation des LT CD8 en transplantation rénale

Notre hypothèse était que la transplantation rénale est susceptible d'entraîner une (re)programmation des LT CD8, et des LT CD8 innés en particulier. Différents facteurs causaux peuvent être envisagés, lesquels comprennent les stimulations antigéniques chroniques provoquées par les allo-antigènes du greffon ou les infections virales mais également les molécules immunosuppressives ou encore l'immuno-sénescence inhérente à l'âge du patient transplanté. Il y a relativement peu de données publiées concernant l'effet de ces différents paramètres sur les LT CD8, et quasiment aucune sur les LT CD8 innés, qui sont une population cellulaire plus récemment décrite.

A cette fin, nous avons choisi d'étudier les LT CD8 innés, leur fréquence et leur phénotype dans une cohorte de patients transplantés rénaux sous traitement immunosuppresseur minimisé CsA (ou CsA-T pour *CsA Treatment*).

1.1. Résumé des principaux résultats acquis en faveur d'une reprogrammation des LT CD8

Nous avons observé dans notre cohorte de patients transplantés rénaux une augmentation de la fréquence des LT CD8 innés E(+) et E(-), accompagnée d'une diminution de la fréquence des LT CD8 conventionnels E(-) (principalement des cellules naïves). Ainsi, l'homéostasie des LT CD8 innés est modifiée chez les patients par rapport aux donneurs sains.

Par ailleurs, nous observons dans la même cohorte, parmi les LT CD8 innés, une augmentation de la fréquence de cellules exprimant la perforine et présentant un phénotype sénescent (CD27(-) CD28(-)) ainsi que de type EMRA (**Figure 5 du Manuscrit)**.

De plus, nous disposons de données complémentaires (non présentées dans le **Manuscrit**) relatives à la fonction de production d'IFN-γ des LT CD8 innés. Chez les patients de notre cohorte, nous avons ainsi documenté une dysfonction des LT CD8 innés E(+) : tandis que chez les donneurs sains, la stimulation par le couple de cytokines IL-12/IL-18 entraîne une expression d'IFN-γ par les LT CD8 innés E(+), celle-ci est fortement altérée ou même abolie chez les patients (5,91 % ± 1,26 des LT CD8 innés produisent l'IFN-γ chez les sujets sains *versus* 2,54 % ± 0,62 chez les patients; **Figure 15B**). Ces données relatives à une fonction de type innée confortent notre hypothèse d'une (re)programmation des LT CD8 innés chez les patients transplantés.

A ce stade, se pose la question d'une (re)programmation générale *versus* de plusieurs types de (re)programmation des LT CD8 chez les patients transplantés qui seraient associées à des causes distinctes et se développeraient de façon dissociée. Ces différentes causes, qui comprennent le traitement immunosuppresseur, les stimulations chroniques liées à la transplantation et le vieillissement, seront explorées successivement dans la suite de cette discussion, accompagnées par des données non publiées du laboratoire.

1.2. Causes multifactorielles de la reprogrammation des LT CD8

Nous avons étudié de prime abord l'effet du traitement particulier de notre cohorte, la CsA, sur les différents critères de (re)programmation. Pour cela, nous avons confronté les données de cette cohorte avec celles d'une cohorte complémentaire de patients transplantés rénaux avec un traitement standard (ou GS-T pour *Gold Standard Treatment*) composé de tacrolimus (famille des inhibiteurs de la calcineurine à laquelle appartient la CsA) et de mycophénolate mophétil (un anti-métabolite) (et de corticostéroïdes pour seulement l'un d'entre eux).
Nous avons pu ainsi attribuer l'augmentation de la fréquence des LT CD8 innés E(+) (**Figure 15A**) et leur production diminuée d'IFN-γ (**Figure 15B**) comme spécifiquement associées au traitement CsA, ces variations en référence aux sujets normaux n'étant pas retrouvées chez les patients GS-T. Au contraire, le phénotype sénescent a été observé dans les deux groupes de patients CsA-T et GS-T (**Figure 15C**), suggérant un phénomène plus général, inhérent à la transplantation rénale plutôt qu'associé à un traitement immunosuppresseur donné.
Cette dernière donnée conforte notre hypothèse que la transplantation d'organe, indépendamment des agents immunosuppresseurs utilisés, est un agent du vieillissement des LT CD8.

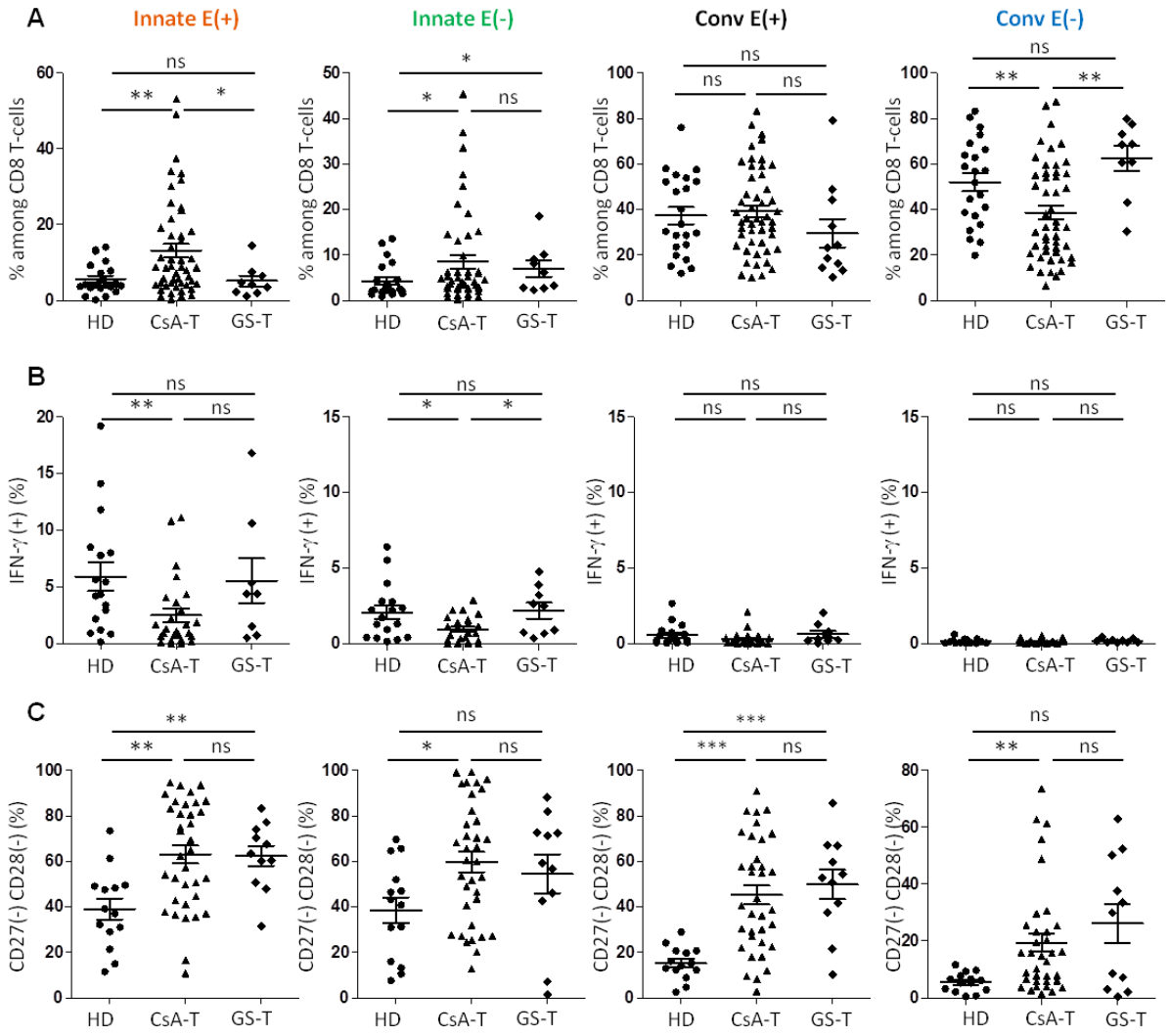


Figure 15 : Effet des différents traitements immunosuppresseurs sur la fréquence des sous-populations de LT CD8, leur production d'IFN-γ et leur phénotype sénescent. Analyse par cytométrie en flux de la fréquence des sous-populations de LT CD8 en fonction des marqueurs panKIR/NKG2A et Eomes (E) parmi les lymphocytes vivants TCRαβ(+)CD8 (**A**), de la production d'IFN-γ (**B**) après deux jours d'incubation avec le couple de cytokines IL-12 et IL-18 et de la fréquence d'expression des marqueurs de sénescence CD27(-) CD28(-) (**C**) et parmi les quatre sous-populations chez des donneurs sains (HD) (A, C : n=22, B : n=17), les patients CsA-T (AC : n=45, B : n=26) et les patients GS-T (AC : n=11, B : n=8). Chaque point représente un individu. Moyenne ± SEM, test non-paramétrique de Mann-Whitney bilatéral. *p<0,05 ; **p<0,01 ; *** p<0,001 ; ns : non significatif.

2. Une (re)programmation homéostatique et fonctionnelle des LT CD8 innés induite par la CsA : mécanismes sous-jacents ?

Les LT CD8 innés E(+) constituent une population cellulaire très récemment décrite et non étudiée en transplantation d'organe et il n'existe pas à notre connaissance de données de la littérature relatives à l'effet que peuvent avoir sur eux les traitements immunosuppresseurs. Si l'on considère que ces cellules partagent des fonctions communes à la fois aux LT CD8

mémoires et aux cellules NK, on présume qu'elles puissent réagir de manière similaire à ces deux populations connues. Cependant, si l'effet de la CsA a été étudié sur les LT en général, peu d'études se sont intéressées jusqu'ici à son effet sur les LT CD8 mémoires ou les NK et les rares données de la littérature disponibles ne sont pas concordantes (Adithan et al., 2019; Derniame et al., 2014; Eissens et al., 2010; Morteau et al., 2010; Vacher-Coponat et al., 2006; Wai et al., 2008; Wang et al., 2007; Y. Zhang et al., 2013). Quant aux données de la CsA sur les LT, elles concernent principalement son effet anti-prolifératif (pour revue (Shevach, 1985)). Les travaux s'intéressant aux effets de la CsA sur les LT CD8 mémoires ne traitent pas la question de leur fréquence mais seulement celle de leur fonction cytotoxique qui apparaît inhibée tant chez l'humain que chez la souris (Combates et al., 1995; Kiziroglu & Miller, 1990; Rovira et al., 2016). Il n'existe pas non plus à notre connaissance de données disponibles dans la littérature sur la génération de caractères NK-like au sein du compartiment LT CD8.

2.1. Modélisation *in vitro*

Pour étudier la spécificité de l'effet de la CsA sur les LT CD8 innés, nous avons mis au point une modélisation *in vitro*. Pour cela, nous avons trié des LT CD8 issus de CMN de donneurs sains et les avons mis en culture pendant 7 jours en présence d'IL-15, de billes de stimulation CD3/CD28 et de CsA (**Figure 16A et B**).

Dans ces conditions de culture, en présence de CsA, on observe une augmentation de la fréquence des LT CD8 innés E(+) et E(-) et une diminution de la fréquence des LT Conv E(-). La fréquence des LT Conv E(+) ne varie pas (**Figure 16C**). L'analyse du nombre absolu de cellules en culture révèle un profil similaire avec une augmentation du nombre de LT CD8 innés E(+) et E(-) et une diminution du nombre de LT CD8 Conv E(-) en présence de CsA (**Figure 16D**).

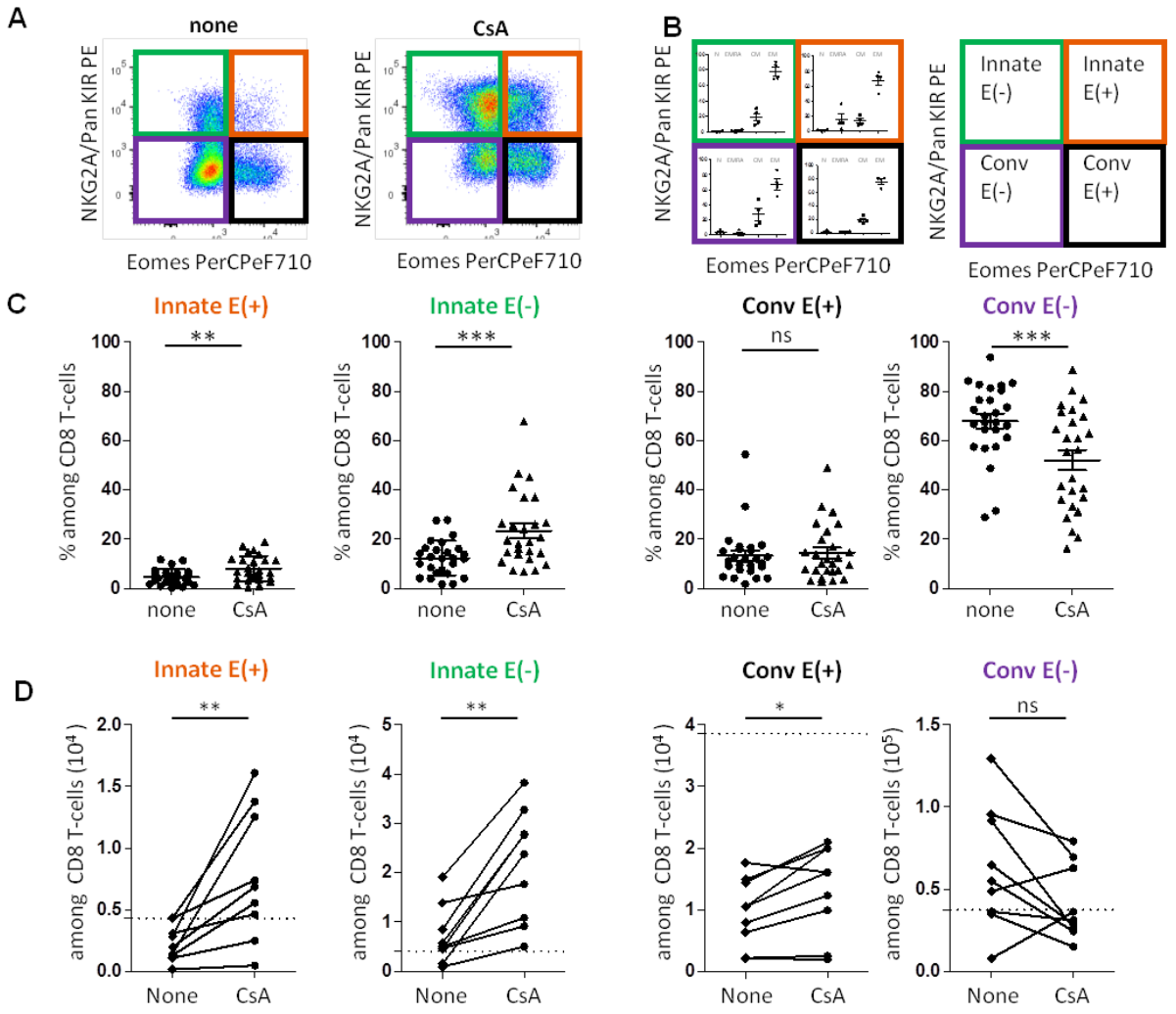


Figure 16 : La CsA favorise la génération des LT CD8 innés *in vitro*. Les CMN de donneurs sains (C : n=26; D : n=9) ont été magnétiquement enrichis en LT CD8 et cultivés avec de l'IL-15 (20 ng/ml), des billes de stimulation CD3/CD28 (concentration 1:1), en présence ou non de CsA (100 ng/ml) pendant 7 jours. Analyse par cytométrie en flux des quatre sous-populations de LT CD8 en fonction des marqueurs panKIR/NKG2A et Eomes (E). (**A**) Dot plots représentatifs. (**B**) Notons pour information que les populations conventionnelles *ex vivo* et *in vitro* présentent un phénotype différent. En effet, la stimulation par les billes CD3/CD28 entraîne l'acquisition d'un phénotype majoritairement effecteur mémoire dans les quatre sous-populations de LT CD8, comme attesté par leur acquisition d'un phénotype prédominant CD45RA(-)CCR7(-), lequel est expliqué par la stimulation du TCR *in vitro* (panel de gauche). Voir le panel de droite pour les abréviations utilisées. Comparaison des fréquences (**C**) et des nombres absolus (**D**) des quatre sous-populations de LT CD8 après 7 jours de culture en présence ou en absence de CsA. Les lignes pointillées (D) représentent le nombre moyen de cellules déposées dans le puits. Chaque point représente un donneur. Moyenne ± SEM ; test non-paramétrique de Wilcoxon bilatéral. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ns : non significatif.

Ce profil de variation, qui est donc le même chez les patients CsA-T et dans la modélisation *in vitro*, fournit des arguments forts en faveur d'un effet de la CsA dans la génération des LT CD8 innés E(+) chez les patients de la cohorte CsA-T.

De plus, l'analyse de la fréquence de cellules capables de produire l'IFN-γ en réponse à une stimulation innée augmente après traitement par la CsA (**Figure 17**). Dans cette situation, la CsA a-t-elle favorisé la génération de cellules qui produisent l'IFN-γ (auto-renouvellement) ou a-t-elle permis l'acquisition de cette fonction (différenciation) ?

Se pose donc la question de l'origine de ces cellules : est-ce une prolifération du compartiment LT CD8 inné E(+) ou bien une différenciation à partir des autres compartiments T CD8 ?

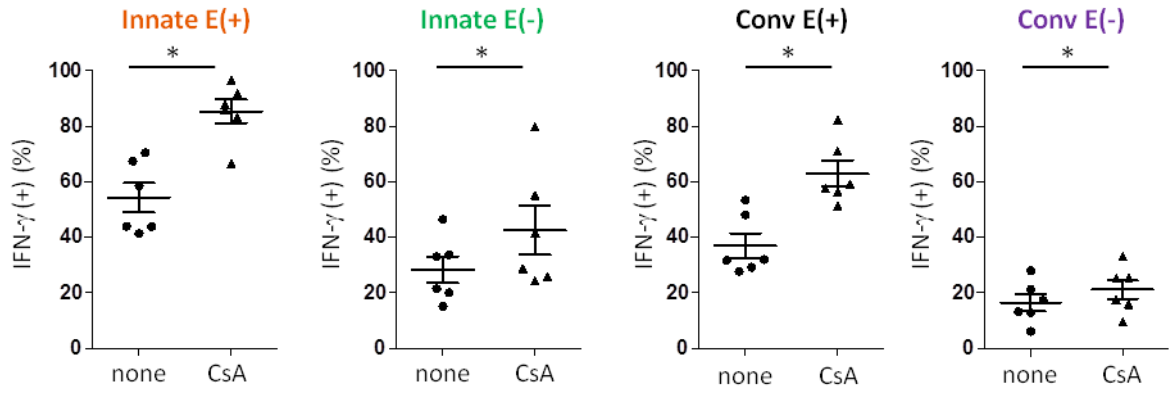


Figure 17: La CsA favorise la production d'IFN-γ par les LT CD8 en modélisation *in vitro* chez le donneur sain. Les CMN de donneurs sains (HD) (n=6) ont été successivement enrichis magnétiquement en cellules CD8(+) et incubées pendant deux jours avec de l'IL-15 (20 ng/ml), des billes de stimulation CD3/CD28 (concentration 1:1), ceci en présence (ou non) de CsA (100 ng/ml). Analyse de la fréquence de cellules produisant l'IFN-γ en réponse aux cytokines IL12/IL-18 (48h) dans chaque sous-population en fonction des marqueurs panKIR/NKG2A et Eomes (E). Chaque point représente un individu. Moyenne ± SEM, test non-paramétrique de Wilcoxon bilatéral. *p<0,05.

2.2. Une programmation à partir du compartiment Eomes(-) ?

L'une de nos hypothèses quant à l'origine de l'augmentation de fréquence des LT CD8 innés E(+) est, qu'à l'instar de la génération des LT CD8 VM murins, les LT CD8 naïfs périphériques se différencient en LT CD8 innés. La comparaison de la fréquence de cellules exprimant Ki67 suggère qu'aucune des quatre sous-populations T CD8 ne prolifère plus chez les patients que chez les sujets sains (**Figure 18A**), ce qui impliquerait une différenciation plutôt qu'une prolifération cellulaire. De plus, l'analyse de l'expression du marqueur d'activation précoce CD69 révèle que les LT CD8 Conv E(-) (représentés principalement par des LT CD8 naïfs) sont plus activés chez les patients CsA-T que chez les sujets sains (**Figure 18B**). Ces données sont donc conciliables avec une différenciation des LT CD8 naïfs en LT CD8 innés E(+) à partir de l'activation chronique des LT CD8 naïfs associée à la transplantation.

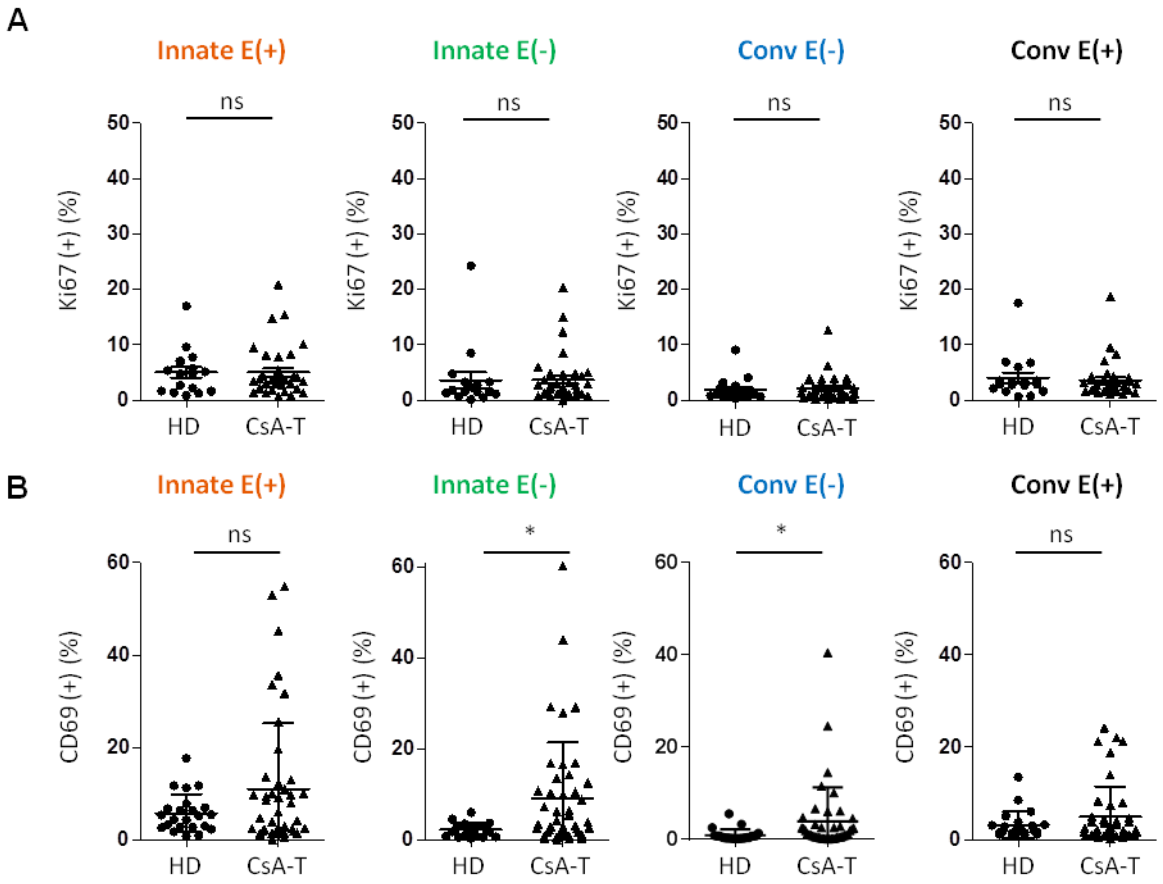


Figure 18 : Analyse des phénotypes de prolifération et d'activation chez les patients et les sujets sains. Analyse par cytométrie en flux de la fréquence des cellules Ki67(+) (**A**) et CD69(+) (**B**) parmi les quatre sous-populations selon l'expression des marqueurs NKG2A/Pan-KIR et Eomes (E) parmi les lymphocytes vivants TCR-αβ(+) CD8(+) chez les sujets sains (HD) (A : n=17 ; B : n=23) et les patients CsA-T (A : n=35 ; B : n=44). Chaque point représente un individu. Moyenne ± SEM, test non-paramétrique de Mann-Whitney bilatéral. *p<0,05 ; ns: non significatif.

De plus, on remarque que les LT CD8 innés E(-) des patients transplantés CsA-T expriment eux aussi plus fortement CD69 que les sujets sains. Cette observation nous a conduits à formuler l'hypothèse selon laquelle les LT CD8 panKIR/NKGA2(-) Eomes(-) pourraient se différencier en LT CD8 panKIR/NKGA2(+) Eomes(+) *via* un état intermédiaire panKIR/NKGA2(+) Eomes(-). Une équipe de chercheurs chinois, sur la base de publications de notre laboratoire, a réalisé une étude des différentes populations T CD8 telles que nous les définissons en fonction de l'expression d'Eomes et de panKIR/NKGA2. A partir d'un large effectif de donneurs sains (105 individus âgés de 6 à 84 ans), cette étude propose également que les LT CD8 innés E(-) puissent constituer une population intermédiaire, moins différenciée, entre les LT CD8 naïfs et les LT CD8 innés E(+) (Kasakovski et al., 2020).

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons poursuivi nos expériences *in vitro* en triant les LT CD8 naïfs à partir de CMN de donneurs sains puis en les cultivant comme précédemment (7 jours en présence d'IL-15, billes CD3/CD28 et CsA). Dans ces conditions, nous ne sommes pas parvenus à obtenir une apparition/génération de LT CD8 avec un profil inné (exprimant les marqueurs panKIR/NKG2A avec ou sans expression d'Eomes). Nous avons aussi testé l'ajout d'IL-4 dans le milieu de culture, puisque cette cytokine semble jouer un rôle dans la génération des LT CD8 innés, ceci sans plus de succès. Nous présumons que d'autres cytokines (seules ou en cocktail) puissent être nécessaires à la différenciation des LT CD8 naïfs en LT CD8 innés.

Nous souhaiterions identifier les molécules solubles responsables de la différenciation dans notre modèle de culture de LT CD8 totaux (IL-15, CD3/CD28, CsA), ceci en analysant par la technique Luninex le contenu des surnageants de culture. Les cytokines identifiées seraient alors testées dans notre modélisation *in vitro*. Enfin, des plaques en *transwell*, avec des LT CD8 naïfs d'un côté et des LT CD8 totaux de l'autre, permettraient de confirmer notre hypothèse que les LT CD8 naïfs sont à l'origine des LT CD8 innés E(+) .

2.3. Une reprogrammation à partir du compartiment Eomes(+) ?

Le compartiment Eomes(+) panKIR/NKG2A(-) ?

Puisque les expériences mises en place à partir du compartiment LT CD8 naïf ne nous ont pas permis d'induire la génération de LT CD8 innés E(+), il serait pertinent de rechercher si l'origine des cellules se différenciant dans notre modèle en LT CD8 innés n'appartiennent pas au compartiment LT CD8 mémoire conventionnel. La moitié du phénotype inné/mémoire est déjà acquis, facilitant potentiellement la différenciation de ces cellules.

L'argument qui pourrait appuyer cette hypothèse est la comparaison du nombre absolu de cellules avant et après les 7 jours de culture en présence d'IL-15, CD3/CD28 et CsA, qui est augmenté après culture pour les populations innées E(+) et E(-) et Conv E(-), possiblement au détriment des cellules Conv E(+) dont le nombre est très inférieur à celui déposé (ligne pointillée ; **Figure 16D**). A ce stade, on ne peut cependant pas écarter un effet de la culture en elle-même, avec une mort des cellules en question, bien que cet effet ne soit pas retrouvé dans les autres populations cellulaires.

Le compartiment Eomes(+) panKIR/NKG2A(+) ?

Chez les patients CsA-T, on n'observe pas de différence de prolifération des différentes sous-populations de LT CD8 par rapport aux sujets sains (**Figure 18A**). Cependant, lorsque l'on compare au sein d'un même groupe les différentes sous-populations entre elles, on observe que les LT CD8 innés E(+) sont les cellules qui expriment le plus fortement Ki67 et qui ont donc le potentiel prolifératif le plus élevé (**Figure 19**).

Il semble plus probable que le principal mécanisme de génération des LT CD8 innés en réponse à la CsA soit une différenciation à partir d'un autre compartiment cellulaire. Mais cela n'exclut pas qu'une partie des LT CD8 innés E(+) puisse aussi s'auto-renouveler.

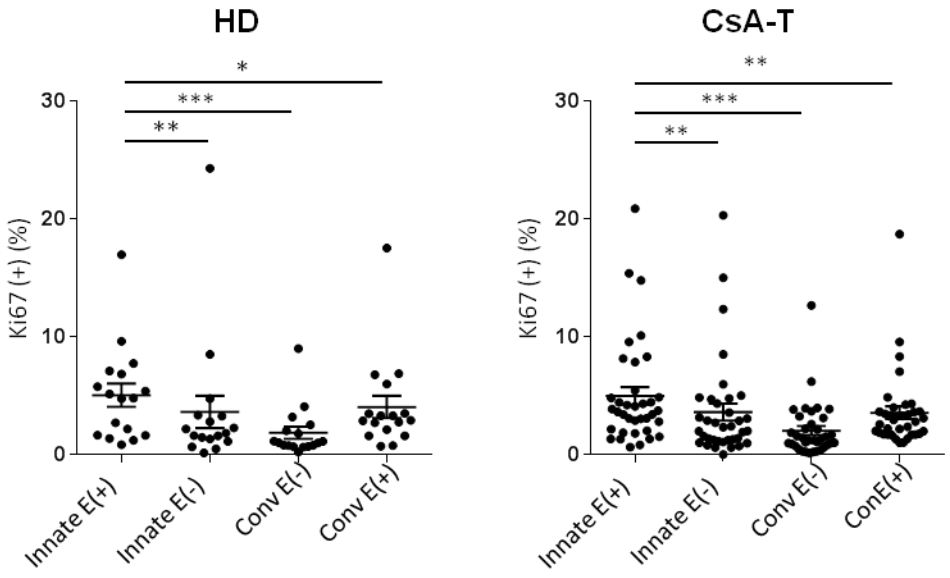


Figure 19 : Analyse du phénotype de prolifération chez les patients CsA-T et les sujets sains. Analyse par cytométrie en flux de la fréquence des cellules Ki67(+) parmi les quatre sous-populations selon l'expression des marqueurs NKG2A/Pan-KIR et Eomes (E) parmi les lymphocytes vivants TCR-αβ(+) CD8(+) chez les sujets sains (HD) (n=17) et les patients CsA-T (n=35). Chaque point représente un individu. Moyenne ± SEM, test non-paramétrique de Wilcoxon bilatéral. *p<0,05 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001 ; ns: non significatif.

2.4. Quel rôle pour la calcineurine/CsA dans la différenciation des LT CD8 innés E(+) ?

Chez la souris, les différents modèles mettant en évidence l'existence des LT CD8 innés sont liés à des anomalies de la transduction du signal du TCR : Itk et Rlk sont des tyrosines kinases de la famille Tec impliquées dans la transduction du signal TCR ; Id3, un facteur de transcription induit au cours de la signalisation TCR ; et SLP76, une molécule adaptatrice de

la transduction du signal TCR. La transduction du signal TCR comprend l'activation de la voie Erk/MAPKinase, comme cela a été observé dans le modèle Itk-/-, où la voie Erk est altérée et où le croisement avec une souche murine souche exprimant l'allèle hypersensible de Erk2 entraîne la correction partielle du phénotype Itk-/- (Broussard et al., 2006). L'altération de cette voie semble donc essentielle au développement des LT CD8 IM.

Récemment, un autre modèle murin associé à une augmentation de la fréquence et du nombre de LT CD8 IM a été décrit. Il s'agit d'un modèle où les souris sont déficientes pour les facteurs de transcription Elk-4 (ou SAP-1) ou pour le couple Elk-4 et Elk-1, impliqués dans la signalisation Erk induite par le TCR. Les auteurs le vérifient en observant une diminution de l'expression des gènes cibles en aval d'Elk-1 et Elk-4 (Maurice et al., 2018). Or si la principale fonction mentionnée de la calcineurine est la déphosphorylation activatrice du facteur de transcription NFAT, la calcineurine est également la principale phosphatase de Elk-1 (Sugimoto et al., 1997). Elk-1 et/ou Elk-4 pourraient-ils être des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des LT CD8 innés E(+) ? Ils sont néanmoins des candidats de choix pour explorer plus avant l'effet de la CsA dans la génération des LT CD8 innés E(+).

La CsA a plusieurs mécanismes d'action, certains impliquant la signalisation du TCR, d'autres non. *In vitro*, l'effet de la CsA sur la fonction de production d'IFN-γ des LT CD8 innés E(+) n'est observable que dans la condition où les deux stimulations innée et acquise sont présentes (**Figures 17** et **20**). Cela rejoint l'idée du travail de Goplen et collègues qui montrent que le signal induit par l'IL-12 et son récepteur (signal de type inné) passe *via* le signalosome du TCR et requière une interaction avec une molécule du CMH chargée. Le blocage de l'un ou l'autre de ces processus impacte la cytotoxicité des LT CD8 (Goplen et al., 2016). On peut alors supposer que la CsA et les cytokines IL-12 et IL-18 utilisent et/ou détournent le signalosome du TCR pour entraîner une action de type inné.

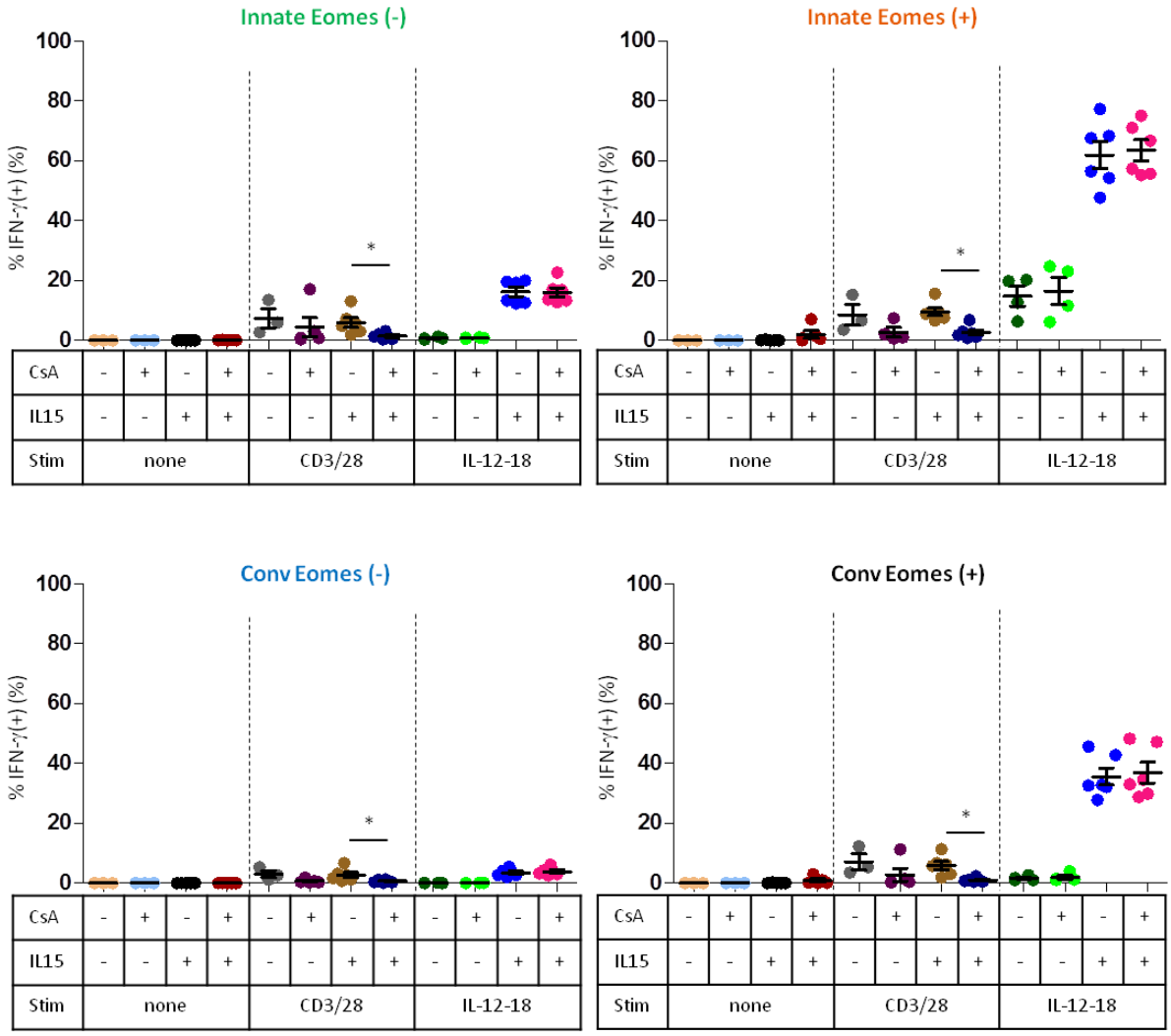


Figure 20 : Les LT CD8 innés E(+) sont les principaux producteurs d'IFN-γ parmi les LT CD8 en réponse à la stimulation de type inné du couple IL-12/IL-18, sans modulation de la CsA. Des CMN de donneurs sains (n=6) ont été magnétiquement enrichis en cellules D8(+) et cultivées avec ou sans IL-15 en présence de CsA ou non pendant 2 jours, avec ou sans stimulation (Stim) de type billes CD3/CD28 ou de type inné (couple IL-12/IL-18). Après culture, les cellules vivantes sont récupérées et leur production d'IFN-γ analysée par cytométrie en flux, selon leur expression des marqueurs PanKIR/NKG2A et Eomes (E) parmi les lymphocytes vivants TCRβ(+)CD8(+). Moyenne ± SEM, test non-paramétrique bilatéral de Wilcoxon. *p<0,05; ns: non significatif.

3. La place de l'activation chronique du système immunitaire associée à la transplantation d'organe dans la (re)programmation des LT CD8 innés E(+)

Plusieurs études ont décrit que la stimulation chronique par des antigènes (viraux ou auto-antigènes) entraîne l'expression de marqueurs NK par les LT CD8 (Tarazona et al., 2000). Cela a été rapporté en particulier pour le LCMV chez la souris (Slifka et al., 2000) ou le HPV chez l'humain (Pita-Lopez et al., 2014) (cf. introduction partie 2).

3.1. Activation immunitaire chronique allo-spécifique ?

L'analyse comparée des deux cohortes de patients transplantés rénaux (CsA-T et GS-T) nous a permis d'observer un phénotype sénescent exacerbé commun, suggérant que cette sénescence induite est un phénomène général étroitement associé à la transplantation rénale (**Figure 15C**). De plus, nous avons révélé une dysfonction des LT CD8 innés (production d'IFN-γ diminuée) *ex vivo* chez les patients CsA-T (**Figure 15B)** qui n'est pas retrouvée *in vitro* dans notre modélisation des effets de CsA (**Figure 17**). Ces deux observations suggèrent un effet de la transplantation *per se*.

Le fait que l'allogreffe puisse entraîner une reprogrammation des populations lymphocytaires T, pose la question d'une allo-spécificité de ces LT reprogrammés pour les antigènes du greffon. Nous n'avons cependant pas pu étudier directement et expérimentalement cette hypothèse dans notre étude.

Pour étudier l'existence de LT CD8 innés E(+) spécifiques des allo-antigènes du greffon, il nous faudra préalablement valider une méthode permettant d'identifier de telles cellules. Dans ce but, nous proposons de prendre appui sur différents travaux utilisant les marqueurs CD137 et CD154 pour identifier (et trier) des LT CD8 spécifiques d'allo-antigènes. Il a été montré que CD137 était exprimé par les LT CD8 précocement après la rencontre avec l'antigène et était presque indétectable dans les LT non activés. Cette méthode a été testée avec des antigènes viraux et est aussi efficace que les méthodes utilisant des tétramères (Watanabe et al., 2008). L'expression de CD154 peut également être utilisée pour identifier les LT CD8 spécifiques d'antigène, avec un pic d'expression 8 heures après la rencontre avec l'antigène et une phase de plateau qui se maintient jusqu'à 24 heures (Han et al., 2007). Ces marqueurs ont été utilisés récemment pour identifier les réponses T CD4 et T CD8 spécifiques du SARS-Cov2 (Rydyznski Moderbacher et al., 2020).

Pour certains patients transplantés à Poitiers, le CHU a conservé des cellules issues du donneur d'organe que nous pourrons utiliser comme source d'allo-antigènes pour stimuler les CMN des patients de la cohorte et ainsi *in fine* déterminer la présence ou l'absence de cellules CD8 innés E(+) allo-spécifiques vis-à-vis du greffon chez les patients transplantés de notre cohorte. Parallèlement, nous pourrions évaluer par la même approche la fréquence de ces

cellules chez des patients transplantés rénaux en rejet chronique ou ayant un greffon fonctionnellement stable sous traitement immunosuppresseur standard.

Une approche complémentaire pour déterminer si l'allo-transplantation a un effet sur la fréquence des LT CD8 innés E(+) serait de réaliser des expériences de MLR (pour *mixed lymphocyte reaction*) avec des cellules de donneurs sains. Cette étude *in vitro* nous permettrait de déterminer un possible effet de la stimulation allo-antigénique sur la génération des LT CD8, et de ses contingents innés en particulier, et d'y évaluer l'influence/dépendance attendue de la CsA sur ce phénomène. L'une des limites est que la durée de stimulation sera beaucoup plus courte que chez les patients.

Des modèles animaux pourraient également être utilisés pour étudier l'allo-spécificité. En effet, il existe des souches murines qui peuvent tolérer une allo-greffe rénale sans traitement immunosuppresseur (par exemple une greffe rénale DBA/2 chez un receveur C57BL/6 (Bickerstaff et al., 2001)). Dans un tel modèle, il serait possible d'étudier la dynamique de l'expression des marqueurs de sénescence au sein des LT CD8 IM et VM totaux et allo-spécifiques avant et au cours de la transplantation.

3.2. Activation immunitaire chronique viro-induite (CMV)

La sérologie positive pour le CMV n'est pas associée à une augmentation de la fréquence de LT CD8 innés E(+) chez les patients transplantés de notre cohorte (**Figure 6 du Manuscrit**). A l'inverse, Stijn et collègues avaient observé une augmentation de l'expression de marqueurs NK après infection par le CMV chez des patients transplantés rénaux (van Stijn et al., 2008). En revanche, la sérologie positive est associée à une augmentation du phénotype sénescent (**Figure 6 du Manuscrit**). Il est cependant difficile de distinguer l'effet du CMV de celui de la transplantation. Si nous disposions des données de sérologie chez les sujets sains, nous pourrions déterminer l'effet propre du CMV sur le vieillissement des LT CD8 innés E(+), ainsi que sur leur fréquence (en supposant un potentiel effet masqué par l'effet de la transplantation).

Malgré le nombre réduit de patients analysés, nous avons observé chez les patients CsA-T présentant une sérologie positive pour le CMV une diminution (bien que non significative ; p=0,1025) de la production d'IFN-γ après stimulation par les cytokines IL-12/IL-18 (**Figure 21**), suggérant une relation entre CMV, sénescence et fonctionnalité diminuée des LT CD8 innés E(+).

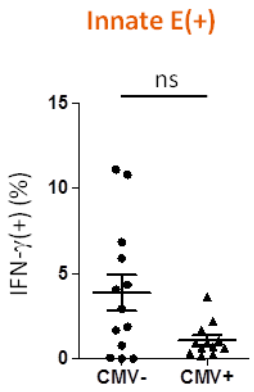


Figure 21 : Les LT CD8 innés E(+) des patients CsA-T dont la sérologie CMV est positive (CMV+) produisent moins d'IFN-γ en réponse à la stimulation de type inné du couple IL-12/IL-18. Analyse par cytométrie en flux de la fréquence de cellules produisant l'IFN-γ après deux jours d'incubation avec le couple de cytokines IL-12 et IL-18 chez les patients CsA-T (CMV- : n=12 ; CMV+ : n=13). Chaque point représente un individu. Moyenne ± SEM, test non-paramétrique de Mann-Whitney bilatéral. ns : non significatif.

4. Une (re)programmation des LT CD8 innés générée/exacerbée par le vieillissement ?

4.1. Etude de l'impact de l'âge sur le statut sénescent des LT CD8 innés

Plusieurs études associent les caractéristiques de type NK portées par les LT CD8 au vieillissement (Abedin et al., 2005; Miyaji et al., 1997; Tarazona et al., 2000) (pour revue (Vallejo et al., 2011)). Selon nos observations chez les sujets sains, il n'y a pas de corrélation entre l'âge et la fréquence des LT CD8 innés E(+), même si ces cellules sont effectivement enrichies en marqueurs de sénescence (**Figures 4C et S3 du Manuscrit**). Ce phénotype sénescent semble donc lié à un programme de différenciation propre à ces cellules plutôt qu'à un phénomène lié à l'âge.

Chez les patients CsA-T, les quatre compartiments de LT CD8 ont été retrouvés touchés par l'immunosénescence accélérée associée à la transplantation, y compris les LT CD8 innés E(+) (**Figure 5B du Manuscrit**). Cependant, comme chez les sujets sains, l'âge n'est apparu corrélé ni à la fréquence (**Figure S5 du Manuscrit**) ni au caractère sénescent des LT CD8

innés E(+) (**Figure S7 du Manuscrit**). De plus, le phénotype sénescent augmenté chez les patients CsA-T par rapport aux sujets sains est conservé lorsqu'on considère des paires de même âge entre les individus des deux groupes (**Figure S6 du Manuscrit**). Ce dernier résultat montre donc bien que la différence d'âge moyenne entre les deux groupes ne peut pas expliquer à elle seule le phénotype sénescent augmenté dans le groupe de patients.

4.2. Le statut sénescent exacerbé des LT CD8 innés : un phénomène de type *inflammaging* ?

Au cours du vieillissement apparaît l'*inflammaging*, qui se définit comme une inflammation systémique de bas grade. Il est caractérisé par une augmentation des niveaux circulants et tissulaires de marqueurs pro-inflammatoires (tels que l'IL-1, l'IL-6 ou l'IFN-α). Certaines infections virales (comme le CMV ou le VIH) associées à une accumulation de LT sénescents pourraient participer au processus d'*inflammaging* (pour revue (Ferrucci & Fabbri, 2018; Pereira & Akbar, 2016)). A cet égard, les travaux de l'équipe d'Akbar ont montré que la sénescence (et l'expression de sestrines) est associée à une augmentation de la cytotoxicité NK-like (mesure du marqueur de dégranulation CD107a) au sein des LT CD8 (Lanna et al., 2017; Pereira et al., 2020) ;

Dans notre cohorte, nous avons observé dans les LT CD8 innés une augmentation de l'expression de la perforine, une molécule de l'arsenal cytotoxique qui peut être considérée comme un marqueur indirect de l'*inflammaging* (**Figure 5 du Manuscrit**). De manière intéressante, le fait que les LT CD8 innés des mêmes patients présentent une diminution de leur capacité de production d'IFN-γ en réponse à une stimulation de type inné ne peut être interprété comme la conséquence d'un phénomène d'exhaustion (cf. paragraphe 5.1). En fait, ce phénomène pourrait plutôt être interprété comme une signature de sénescence. En effet, une étude menée chez la souris comparant les fonctions des NK chez des souris jeunes et des souris âgées a montré que les NK des souris âgées avaient une production d'IFN-γ diminuée en réponse à différentes stimulations cytokiniques, l'IL-12 en particulier, conduisant à une altération de leur cytotoxicité, ainsi qu'à une augmentation forte de l'expression de la perforine (**Figure 22**) (Nogusa et al., 2012).

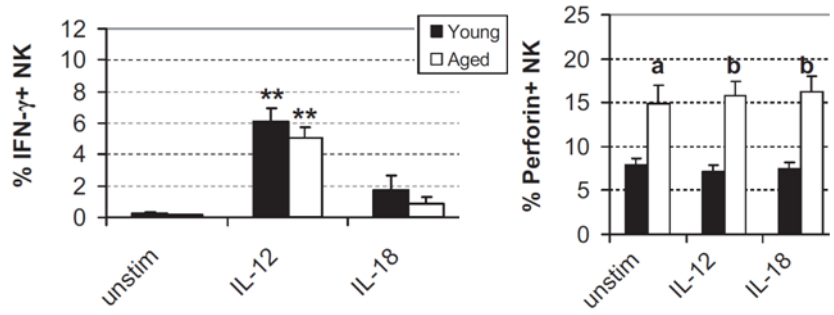


Figure 22 : Production d'IFN-γ et expression de la perforine par les NK des souris jeunes et âgées (Nogusa et al., 2012).

Sur la base de l'ensemble de ces données, il est donc tentant de proposer que la sénescence induite par l'état de transplantation et sa durée, en plus de celle « physiologique » liée à l'âge, qu'elle soit liée au traitement immunosuppresseur, à la présence d'un greffon, au CMV (ou à une autre cause encore inconnue), conduise à un statut d'*inflammaging* responsable de l'état fonctionnel altéré des LT CD8 innés E(+) constaté dans notre cohorte de patients transplantés.

Pour définitivement conclure, il serait nécessaire de compléter notre analyse en utilisant un marqueur d'*inflammaging* plus précis (comme le granzyme K (Camell, 2021; Mogilenko et al., 2021)). Il faudrait aussi agrandir l'effectif de notre cohorte. Qualitativement, celle-ci pourrait comprendre des patients d'âges variés prélevés à différents temps post-transplantation, y compris précoces afin de pouvoir suivre la progression du caractère sénescent et de la signature d'*inflammaging* des LT CD8 innés E(+) en fonction de la durée de transplantation (et donc de la durée de stimulation chronique liée à l'allo-greffe).

5. Origine du défaut d'expression d'IFN-γ dans les LT CD8 innés chez les patients transplantés rénaux traités par CsA

Le défaut d'expression d'IFN-γ après stimulation par les cytokines IL-12/IL-18 mis en évidence chez les patients CsA-T par rapport aux sujets sains n'a pas été retrouvé chez les patients GS-T (**Figure 16B**). Nous avons évoqué dans le chapitre précédent la possibilité que ce défaut soit lié à un phénomène de sénescence ou bien même d'*inflammaging* inhérent à la durée de transplantation. De manière intéressante, dans notre modèle *in vitro*, le traitement par la CsA de CMN de donneurs sains a montré un effet opposé avec une augmentation de la fréquence des LT CD8 innés E(+) produisant l'IFN-γ, attestant que la CsA a bien une influence sur la fonction d'IFN-γ des LT CD8 innés E(+) (**Figure 17**). Dans le premier cas,

une stimulation chronique est fournie par la transplantation ; dans le second, il n'y a pas de stimulation chronique. Chez les patients CsA-T, ce sont donc à la fois la CsA et l'environnement lié à l'activation chronique du système immunitaire qui contribueraient à ce phénotype particulier.

5.1. L'hypothèse d'une exhaustion

Nous avons recherché si le défaut d'expression de l'IFN-γ des LT CD8 innés E(+) chez les patients transplantés traités par CsA était associé ou non à un état d'exhaustion de ces cellules.

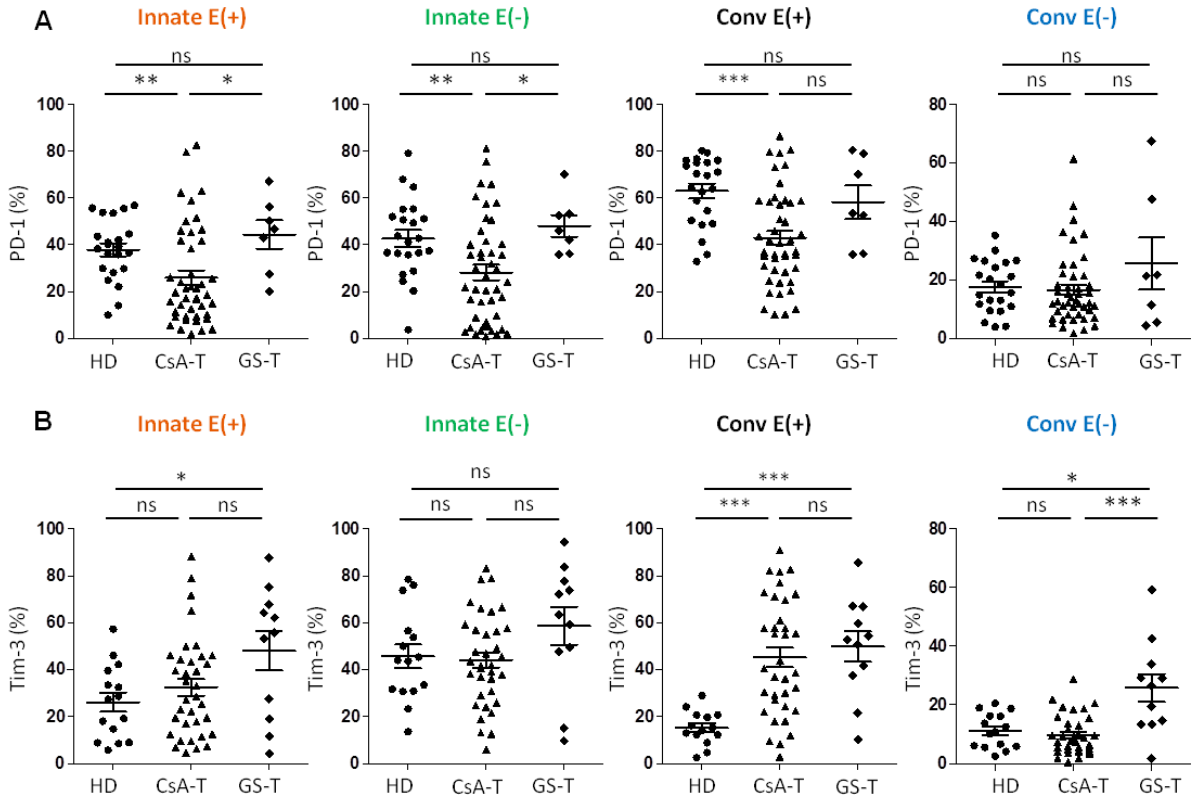


Figure 23 : Les LT CD8 des patients CsA-T ne présentent pas un phénotype d'exhaustion. Analyse par cytométrie en flux de la fréquence des cellules exprimant PD-1 **(A)** et Tim-3 **(B)** parmi les quatre sous-populations décrites par les marqueurs panKIR/NKG2A et Eomes (E) chez les sujets sains (HD) (A : n =22, B : n=13), les patients CsA-T (A : n=45, B : n=35) et les patients GS-T (A : n=7, B : n=11). Chaque point représente un donneur. Moyenne ± SEM, test non-paramétrique de Mann-Whitney bilatéral. * p<0,5 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ns: non significatif.

Mais les profils d'expression des deux marqueurs PD-1 et Tim-3 se sont avérés diminués ou similaires dans les LT CD8 innés E(+) des patients CsA-T par rapport aux sujets sains. De plus, les LT CD8 innés E(+) des patients GS-T, lesquels exprimaient l'IFN-γ de façon similaire aux sujets sains semblaient, eux, être en état d'exhaustion, avec une expression de PD-1 similaire aux sujets sains mais une expression de Tim-3 augmentée par rapport aux sujets sains et aux patients CsA-T (**Figure 23**).

5.2. L'hypothèse d'un déficit en IL-15R

Il est bien documenté que l'IL-15 est nécessaire à l'homéostasie des LT CD8 innés (cf. introduction partie 2). De plus, nous avons observé que l'ajout d'IL-15 à la combinaison IL-12/IL-18 entraîne une plus forte production d'IFN-γ (**Figure 20**). L'IL-15 seule, pendant les 48 heures de stimulation, sans modifier l'équilibre des rapports cellulaires, s'est avérée capable d'induire l'expression de l'IFN-γ. Il avait déjà été démontré que cette cytokine, dans différents contextes, était capable d'induire une réponse effectrice, en particulier par les NK (Carrero et al., 2019; Foong et al., 2009; Jayaraman et al., 2014)**.** Nous montrons ici que c'est aussi le cas pour les LT CD8 innés E(+).

Nous avons donc étudié l'expression de CD122 (la chaîne β du récepteur de l'IL-15) à la fois *ex vivo* chez les sujets sains et transplantés CsA-T et *in vitro* dans notre modèle d'étude des effets de la CsA **(Figure 24).**

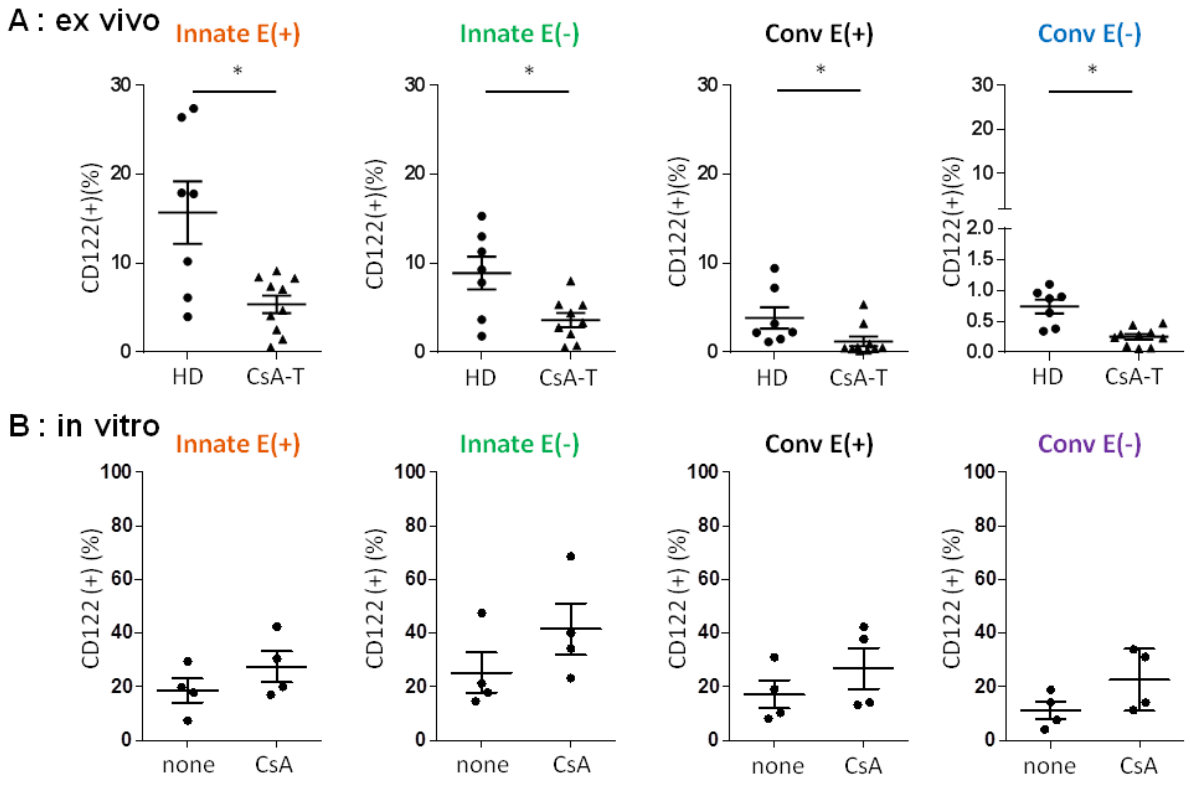


Figure 24 : Le traitement par CsA est associé à une diminution de l'expression de CD122 ex vivo et une augmentation de son expression in vitro. Analyse par cytométrie en flux de la fréquence de cellules exprimant CD122 *ex vivo* (A) et *in vitro* (B) parmi les quatre sous-populations de LT CD8, en fonction des marqueurs panKIR/NKG2A et Eomes (E). (A) Analyse *ex vivo* chez les sujets sains (HD) (A : n=7) et les patients CsA-T (A : n=10). (B) Les CMN de sujets sains (n=4) ont été successivement enrichis magnétiquement en cellules CD8(+) et incubées pendant deux jours avec de l'IL-15 (20 ng/ml), des billes de stimulation CD3/CD28 (concentration 1:1), ceci en présence (ou non) de CsA (100 ng/ml). Chaque point représente un individu. Moyenne ± SEM, test non-paramétrique de Mann Whitney (A) ou de Wilcoxon (B) bilatéral. *p<0,05.

De façon intéressante, nous avons observé une diminution concomitante de l'expression de CD122 et de l'IFN-γ chez les patients CsA-T par rapport aux sujets sains ainsi qu'une augmentation concomitante de l'expression de CD122 et de l'IFN-γ après traitement par la CsA *in vitro* (**Figures 15, 17 et 24**). Ces données, en documentant le lien étroit entre CD122 et la production d'IFN-γ, sont en accord avec le fait que CD122 et IFN-γ sont deux marqueurs associés à l'innateness (cf. introduction partie 1 chapitre 3 et partie 2 chapitre 5). Ayant proposé que l'*inflammaging* pourrait être une cause de l'altération fonctionnelle des LT CD8 innés E(+) (cf. chapitre 4.2 de cette discussion), il serait intéressant d'étudier une possible corrélation chez les patients CsA-T entre le statut d'*inflammaging* (lecture du granzyme K) et une perte globale de l'*innateness* dans nos cellules d'intérêt.

6. Place des LT CD8 innés E(+) et de leur reprogrammation dans la physiopathologie associée à la transplantation rénale

6.1. Etudier le rôle physiopathologique des LT CD8 innés en transplantation d'organe

Les LT CD8 innés E(+) n'avaient encore jamais été étudiés en transplantation d'organe. Nos résultats *princeps* acquis à partir de notre étude observationnelle rendent pertinente la question d'un possible lien entre la fréquence et/ou le phénotype des LT CD8 innés E(+) et le devenir du greffon. Aujourd'hui, le risque principal de perte du greffon rénal est un rejet chronique au cours des premières années suivant la transplantation. Notre étude pilote s'appuie sur une cohorte de patients sélectionnés stables, c'est-à-dire transplantés depuis plus de 10 ans sans avoir jamais présenté de signe de rejet. Elle ne permet donc pas de répondre à la question d'un possible lien entre le statut des LT CD8 innés E(+) et la perte de greffon chez les patients CsA-T.

Cependant, il a été rapporté dans la littérature qu'une fréquence élevée de LT CD8 EMRA à un an post-transplantation était associée à un risque plus élevé d'échec de la transplantation (Jacquemont et al., 2020). De plus, les LT CD8 EMRA en question semblent posséder des fonctions innées (ADCC *via* stimulation de CD16). Etant donné que nos cellules d'intérêt sont enrichies en EMRA et possèdent des fonctions innées, nous pouvons présumer que les cellules étudiées dans le travail de Jacquemont et al. puissent en partie comprendre des LT CD8 innés E(+). Il est donc possible que les LT CD8 innés E(+) EMRA puissent être un facteur de mauvais pronostique (Jacquemont et al., 2020; Tilly et al., 2017) dans les temps précoces de la transplantation. Dans le cadre d'une étude prospective centrée sur les premières années de transplantation, il serait intéressant d'étudier le profil sénescent des LT CD8 EMRA décrites dans le travail de Jacquemont et al. et de le comparer à celui des LT CD8 EMRA issus des patients CsA-T.

6.2. Une reprogrammation en cellules régulatrices ?

Les propriétés des LT CD8 innés E(+) sont encore peu connues. Il a été prouvé qu'ils intervenaient dans les fonctions anti-tumorales et anti-infectieuses (cf. introduction partie 2 chapitre 4), suggérant qu'ils puissent être considérés comme des cellules effectrices. Mais on sait aujourd'hui que la plupart des populations lymphocytaires possèdent une sous-population régulatrice ou peuvent exprimer dans certains contextes de telles propriétés, comme les Treg,

Breg, DCreg, etc. (pour revue (Boonpiyathad et al., 2019)). De plus, les LT non conventionnels ont aussi des propriétés régulatrices, comme les iNKT ou les LT-γδ (cf. introduction partie 1 chapitre 2).

Il est donc plausible que les LT CD8 innés E(+) aient les capacités d'agir comme des cellules régulatrices. Dans cette hypothèse, l'état de pseudo-tolérance des patients CsA-T serait en partie la conséquence de la reprogrammation par l'allo-transplantation des LT CD8 innés E(+) évoluant d'une fonction cytotoxique forte dans les premiers temps post-transplantation à une fonction régulatrice suppressive.

Nous avons décrit que les LT CD8 innés E(+) chez nos patients exprimaient un phénotype sénescent, analysé par l'absence d'expression des marqueurs CD27 et CD28. Or, l'absence d'expression de CD28 définit également une population de LT CD8 suppresseurs. Cette population CD8(+) CD28(-), généralement dénommée Ts (pour T suppressif), est capable d'inhiber la prolifération, l'activation et la production d'IFN-γ des LT CD4 activés (Q. Liu et al., 2015). Ses fonctions utilisent le contact cellule-cellule et des facteurs solubles comme l'IL-10, PDL-1 ou FasL (Reiser & Banerjee, 2016). Les deux populations Treg et Ts semblent, selon les travaux de L. Scotto, partager l'expression de plusieurs marqueurs moléculaires au niveau transcriptomique (tels que GITR, CTLA-4, CD25 ou FoxP3) (Scotto et al., 2004).

Chez la souris, les Ts peuvent prévenir l'apparition de maladie inflammatoire de l'intestin induite par l'injection de LT CD4. L'IL-10 joue un rôle primordial dans cet effet puisque les Ts déficients en IL-10 sont incapables de prévenir l'apparition de la maladie. Cet effet est comparable à celui observé par les Treg (Ménager-Marcq et al., 2006). Dans les maladies auto-immunes, un défaut de cellules régulatrices est souvent observé ; or, certains auteurs ont observé une diminution de la fréquence des Ts chez des patients atteints de diabète de type I ou de sclérose en plaque (Mikulkova et al., 2010). Chez des patients atteints de cancer du poumon, une augmentation de la fréquence des Treg et des Ts circulants a été documentée par rapport aux donneurs sains, avec une fréquence plus augmentée encore chez les patients au stade IV (comparé à des patients au stade III), ce qui suggère une immuno-subversion induite par la tumeur et mettant en jeu ces deux populations cellulaires (Karagöz et al., 2010). Dans le cancer du sein, cette population CD8(+) CD28(-) est associée à un mauvais pronostic, comme le sont les Treg (Song et al., 2018).

Si les lymphocytes Ts possèdent bien des propriétés suppressives, il reste difficile de savoir dans quelle mesure les populations Ts et T CD8 innées E(+) se superposent. Mais le fait que les LT CD8 innés E(+) soient majoritairement CD28(-) suggère qu'ils peuvent potentiellement posséder des propriétés régulatrices, et ainsi être impliquées dans la tolérance du greffon et/ou des cellules tumorales. En effet, chez la souris, l'induction de ces Ts est associée à une suppression du rejet d'allogreffe cutanée (Qiu et al., 2017). Pour le vérifier, nous pourrions analyser l'expression de marqueurs associés au phénotype régulateur (tels que CTLA-4) ou de cytokines (comme l'IL-10 ou le TGF-β) par les LT CD8 innés E(+) des patients transplantés CsA-T.

Il a également été décrit chez la souris des LT CD8 régulateurs dont le TCR reconnait la molécule du CMH de classe Ib Qa-1 et qui permettent l'inhibition du rejet d'allogreffe cardiaque (Choi et al., 2020). Ces cellules présentent des caractéristiques de LT non conventionnels : une restriction par une molécule du CMH non classique. De plus, elles partagent avec les LT CD8 IM l'expression de marqueurs NK tels que NKG2A et Ly49, un phénotype mémoire CD44(+) CD122(+), ainsi qu'une dépendance à l'IL-15 pour leur développement et leur fonction (pour revue (Nakagawa et al., 2018)). Ces données sont conciliables avec l'hypothèse que les LT CD8 innés E(+) possèdent ou acquièrent des fonctions régulatrices et ainsi participer à la tolérance de greffe d'organe.

6.3. Place du cancer dans la reprogrammation des LT CD8 innés

Il a été montré dans le laboratoire que les LT CD8 innés E(+) étaient susceptibles d'intervenir dans la lutte anti-tumorale dans la LMC et certains cancers solides. Nous présumions donc une variation de la fréquence et/ou du phénotype en fonction des antécédents de cancers chez les patients transplantés de la cohorte CsA-T. Or il semble que le cancer n'ait aucun impact sur la fréquence des LT CD8 innés E(+) ni même sur les phénotypes de sénescence (CD27(-) CD28(-)), d'exhaustion (PD-1 et Tim-3) ou encore sur la production d'IFN-γ (après stimulation par le couple IL-12/IL-18) (**Figure 25**). Finalement, seule l'expression de la perforine est apparue modifiée avec les antécédents de cancer. Ainsi, nous avons documenté une augmentation encore plus forte de ce marqueur chez les patients de la cohorte CsA-T dans les LT CD8 de façon générale et dans les LT CD8 innés E(+) en particulier, lorsque ceux-ci ont développé au moins un cancer depuis la transplantation, relativement aux sujets sains.

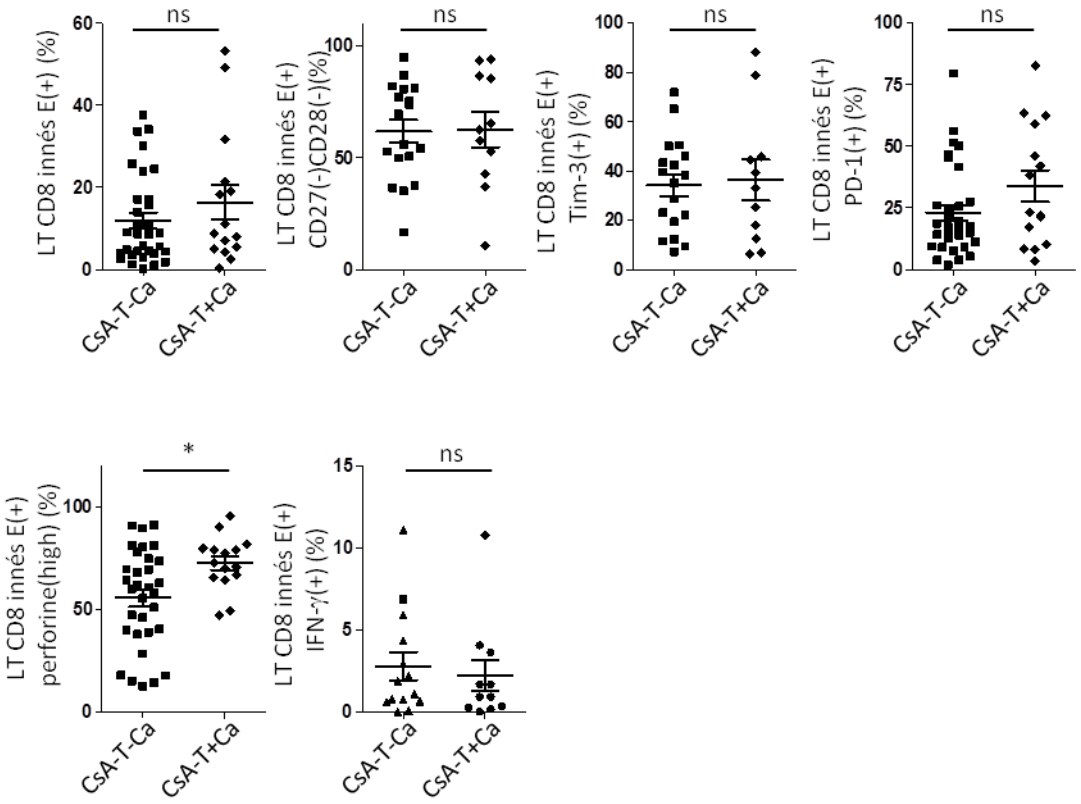


Figure 25 : Impact des antécédents de cancer (Ca) sur la fréquence des LT CD8 innés E(+) et de leurs marqueurs chez les patients transplantés de la cohorte CsA-T. Analyse par cytométrie en flux ; chaque point représente un patient. Test non paramétrique bilatéral de Mann-Whitney. *p<0,05 ; ns : non significatif. La fréquence des cellules produisant l'IFN-γ a été mesurée après 48h d'incubation en présence d'IL-12 et d'IL-18.

Cette interprétation des résultats doit cependant être nuancée dès lors qu'on prend en compte le « *timing* » de l'analyse par rapport à l'histoire individuelle du cancer. Les échantillons sanguins des patients ont en effet été prélevés à un temps t et nous avons identifié *a posteriori* les patients ayant développé au moins un cancer dans le passé. Il est donc possible qu'au moment de notre analyse, la fréquence et le phénotype de ces cellules ne soient pas différents de ceux des autres patients transplantés. Autrement dit, on peut aussi supposer, que, comme chez les patients LMC en rémission (Cayssials et al., 2019; Jacomet et al., 2017), la fréquence et la fonction des LT CD8 innés E(+) reviennent aux valeurs normales des patients transplantés après l'épisode de cancer. De plus, dans la LMC, le cancer est hématopoïétique alors que dans notre cohorte, les cancers sont quasi exclusivement localisés dans la peau (carcinomes spino- et baso-cellulaires). Les LT CD8 innés E(+) cutanés intra-tumoraux pourraient être impactés par le cancer au contraire de leurs équivalents circulants. Pour répondre à la question de l'impact des cancers des patients transplantés sur les LT CD8 innés

E(+), il faudrait donc pouvoir disposer de prélèvements sanguins et tumoraux au diagnostic du cancer.

6.4. Un profil transcriptomique pour mieux caractériser les LT CD8 innés E(+)

L'une des principales limites de nos analyses pour poursuivre l'exploration de la biologie des LT CD8 innés E(+) est l'impossibilité technique de trier des cellules LT CD8 innés E(+). En effet, Eomes étant un facteur nucléaire, il est impossible de l'utiliser pour trier des cellules viables. Une des façons d'identifier de tels marqueurs serait d'isoler les LT CD8 produisant l'IFN-γ après stimulation par le couple IL-12/IL-18 provenant de sujets sains puis de réaliser des analyses de séquençage de l'ARN sur ces cellules. Le tri des LT CD8 innés E(+) rendu possible, nous pourrions alors étudier plus directement leurs fonctions propres. Ce séquençage nous permettrait, outre cet objectif premier, d'identifier de nouveaux marqueurs propres à ces cellules, ainsi que l'identification possible de plusieurs sous-populations discrètes parmi les LT CD8 innés. Les analyses de séquençage de l'ARN permettraient aussi d'analyser le profil d'expression des marqueurs publiés d'*innateness* (Gutierrez-Arcelus et al., 2019) et de placer avec certitude les LT CD8 innés E(+) dans ce gradient. Cette meilleure connaissance des LT CD8 innés E(+) chez le sujet sain nous permettrait dans un second temps de mieux cibler ces cellules lors de leur étude dans la physiopathologie de la transplantation d'organe.

Conclusion générale

La compréhension des mécanismes immunitaires est un enjeu important pour les patients ayant subi une transplantation d'organe, afin qu'ils puissent tolérer le plus longtemps possible leur greffon. L'ensemble des résultats de ce travail de thèse permet de mieux comprendre comment notre population immunitaire d'intérêt, les LT CD8 innés E(+), peut être impactée chez les patients en état de pseudo-tolérance, avec des effets liés à l'allo-transplantation, au CMV, au traitement immunosuppresseur et à l'*inflammaging*. Ce travail permet aussi de mieux caractériser la population des LT CD8 innés E(+) qui, même chez les sujets sains, est encore mal documentée. Nous démontrons que ces cellules sont enrichies en marqueurs de sénescence et d'*inflammaging*, en particulier chez les patients transplantés (et davantage encore chez les patients avec une sérologie CMV positive), suggérant que la stimulation chronique puisse être impliquée dans l'immunosénescence des LT CD8 innés E(+). Ces cellules sont cependant dysfonctionnelles (en termes de production d'IFN-γ) chez les patients transplantés, suggérant une reprogrammation par la transplantation. Notre vue générale est que la transplantation *via* l'allo-immunité et l'infection par le CMV, au-delà de l'immuno-sénescence physiologique induit de manière exogène un vieillissement du système immunitaire. Il reste à déterminer son impact sur la vulnérabilité à l'infection et l'existence de réponse altérée à la vaccination.

Enfin, les résultats de ce travail pourront aussi guider les prochaines études sur les LT CD8 innés dans de nouveaux contextes physiopathologiques et ainsi mieux comprendre les mécanismes liés à leur génération et à leurs fonctions.

BIBLIOGRAPHIE

Abedin, S., Michel, J. J., Lemster, B., & Vallejo, A. N. (2005). Diversity of NKR expression in aging T cells and in T cells of the aged : The new frontier into the exploration of protective immunity in the elderly. *Experimental Gerontology*, *40*(7), 537-548. https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.04.012

Adithan, A., John Peter, J. S., Hossain, M. A., Kang, C.-W., Kim, B., Kim, N. S., Hwang, K.-C., & Kim, J.-H. (2019). Biological effects of cyclosporin A on CD3-CD161+ and CD3+CD161+ lymphocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *458*(1-2), 159-169. https://doi.org/10.1007/s11010-019-03539-2

Ahlers, C., Kreideweiss, S., Nordheim, A., & Rühlmann, A. (1999). Cyclosporin A inhibits Ca2+-mediated upregulation of the DNA repair enzyme DNA polymerase beta in human peripheral blood mononuclear cells. *European Journal of Biochemistry*, *264*(3), 952-959. https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00700.x

Akue, A. D., Lee, J.-Y., & Jameson, S. C. (2012). Derivation and maintenance of virtual memory CD8 T cells. *Journal of Immunology*, *188*(6), 2516-2523. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102213

Andreotti, A. H., Schwartzberg, P. L., Joseph, R. E., & Berg, L. J. (2010). T-cell signaling regulated by the Tec family kinase, Itk. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(7), a002287. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002287

Anglicheau, D., & Suthanthiran, M. (2008). NONINVASIVE PREDICTION OF ORGAN GRAFT REJECTION AND OUTCOME USING GENE EXPRESSION PATTERNS. *Transplantation*, *86*(2), 192-199. https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31817eef7b

Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S., & Haskó, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in molecular medicine*, *19*(6), 355-367. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.03.005

Arase, H., Mocarski, E. S., Campbell, A. E., Hill, A. B., & Lanier, L. L. (2002). Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5571), 1323-1326. https://doi.org/10.1126/science.1070884

Atherly, L. O., Lucas, J. A., Felices, M., Yin, C. C., Reiner, S. L., & Berg, L. J. (2006). The Tec family tyrosine kinases Itk and Rlk regulate the development of conventional CD8+ T cells. *Immunity*, *25*(1), 79-91. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.05.012

Auchincloss, H., Lee, R., Shea, S., Markowitz, J. S., Grusby, M. J., & Glimcher, L. H. (1993). The role of « indirect » recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(8), 3373-3377. https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3373

Baeten, D., Louis, S., Braud, C., Braudeau, C., Ballet, C., Moizant, F., Pallier, A., Giral, M., Brouard, S., & Soulillou, J.-P. (2006). Phenotypically and functionally distinct CD8+ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *17*(1), 294-304. https://doi.org/10.1681/ASN.2005020178

Baez, N. S., Cerbán, F., Savid-Frontera, C., Hodge, D. L., Tosello, J., Acosta-Rodriguez, E., Almada, L., Gruppi, A., Viano, M. E., Young, H. A., & Rodriguez-Galan, M. C. (2019). Thymic expression of IL-4 and IL-15 after systemic inflammatory or infectious Th1 disease processes induce the acquisition of « innate » characteristics

during CD8+ T cell development. *PLoS Pathogens*, *15*(1), e1007456. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007456

Bai, L., Picard, D., Anderson, B., Chaudhary, V., Luoma, A., Jabri, B., Adams, E. J., Savage, P. B., & Bendelac, A. (2012). The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant Vδ1 TCR. *European Journal of Immunology*, *42*(9), 2505-2510. https://doi.org/10.1002/eji.201242531

Baker, R. J., Hernandez-Fuentes, M. P., Brookes, P. A., Chaudhry, A. N., Cook, H. T., & Lechler, R. I. (2001). Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients : Implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *167*(12), 7199-7206. https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.12.7199

Ballet, C., Giral, M., Ashton-Chess, J., Renaudin, K., Brouard, S., & Soulillou, J.-P. (2006). Chronic rejection of human kidney allografts. *Expert Review of Clinical Immunology*, *2*(3), 393-402. https://doi.org/10.1586/1744666X.2.3.393

Barbarin, A., Cayssials, E., Jacomet, F., Nunez, N. G., Basbous, S., Lefèvre, L., Abdallah, M., Piccirilli, N., Morin, B., Lavoue, V., Catros, V., Piaggio, E., Herbelin, A., & Gombert, J.-M. (2017). Phenotype of NK-Like CD8(+) T Cells with Innate Features in Humans and Their Relevance in Cancer Diseases. *Frontiers in Immunology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00316

Barbarin, A., Herbelin, A., & Gombert, J.-M. (2017). [The CD8+ T cell innate function in the war against cancer]. *Medecine Sciences: M/S*, *33*(11), 927-929. https://doi.org/10.1051/medsci/20173311004

Barbarino, J. M., Staatz, C. E., Venkataramanan, R., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2013). PharmGKB summary : Cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenetics and Genomics*, *23*(10), 563-585. https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328364db84

Barbee, S. D., Woodward, M. J., Turchinovich, G., Mention, J.-J., Lewis, J. M., Boyden, L. M., Lifton, R. P., Tigelaar, R., & Hayday, A. C. (2011). Skint-1 is a highly specific, unique selecting component for epidermal T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(8), 3330-3335. https://doi.org/10.1073/pnas.1010890108

Barbier, L. (2019). *Rôle de l'alarmine IL-33 dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion hépatique*. Poitiers.

Baron, M., Belo, R., Cathelin, D., Moreira-Teixeira, L., Cartery, C., Rondeau, E., Mesnard, L., & Leite-de-Moraes, M. (2014). Innate-like and conventional T cell populations from hemodialyzed and kidney transplanted patients are equally compromised. *PloS One*, *9*(8), e105422. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105422

Barthlott, T., Moncrieffe, H., Veldhoen, M., Atkins, C. J., Christensen, J., O'Garra, A., & Stockinger, B. (2005). CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *International Immunology*, *17*(3), 279-288. https://doi.org/10.1093/intimm/dxh207

Bendelac, A. (1995). Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, *182*(6), 2091-2096. https://doi.org/10.1084/jem.182.6.2091

Bengmark, S. (2013). Gut microbiota, immune development and function. *Pharmacological Research*, *69*(1), 87-113. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.09.002

Benichou, G. (1999). Direct and indirect antigen recognition : The pathways to allograft immune rejection. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, *4*, D476-480. https://doi.org/10.2741/benichou

Benichou, G., Takizawa, P. A., Olson, C. A., McMillan, M., & Sercarz, E. E. (1992). Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *The Journal of Experimental Medicine*, *175*(1), 305-308. https://doi.org/10.1084/jem.175.1.305

Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., & Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of *FOXP3*. *Nature Genetics*, *27*(1), 20-21. https://doi.org/10.1038/83713

Berg, L. J., Finkelstein, L. D., Lucas, J. A., & Schwartzberg, P. L. (2005). Tec family kinases in T lymphocyte development and function. *Annual Review of Immunology*, *23*, 549-600. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104743

Berzins, S. P., Smyth, M. J., & Baxter, A. G. (2011). Presumed guilty : Natural killer T cell defects and human disease. *Nature Reviews. Immunology*, *11*(2), 131-142. https://doi.org/10.1038/nri2904

Bickerstaff, A. A., Wang, J. J., Pelletier, R. P., & Orosz, C. G. (2001). Murine renal allografts : Spontaneous acceptance is associated with regulated T cell-mediated immunity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *167*(9), 4821-4827. https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.9.4821

Billingham, R. E., Brent, L., & Medawar, P. B. (1953). Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*, *172*(4379), 603-606. https://doi.org/10.1038/172603a0

Bjorkstrom, N. K., Beziat, V., Cichocki, F., Liu, L. L., Levine, J., Larsson, S., Koup, R. A., Anderson, S. K., Ljunggren, H.-G., & Malmberg, K.-J. (2012). CD8 T cells express randomly selected KIRs with distinct specificities compared with NK cells. *Blood*, *120*(17), 3455-3465. https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-416867

Boonpiyathad, T., Satitsuksanoa, P., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2019). Il-10 producing T and B cells in allergy. *Seminars in Immunology*, *44*, 101326. https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101326

Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., Stoll, S., Schild, H., Staege, M. S., Stassen, M., Jonuleit, H., & Schmitt, E. (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of Experimental Medicine*, *204*(6), 1303-1310. https://doi.org/10.1084/jem.20062129

Born, W. K., Kemal Aydintug, M., & O'Brien, R. L. (2013). Diversity of γδ T-cell antigens. *Cellular & Molecular Immunology*, *10*(1), 13-20. https://doi.org/10.1038/cmi.2012.45

Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Hopner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M. L., Rossini, P. M., Battistini, L., Rotzschke, O., & Falk, K. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells : Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, *110*(4), 1225-1232. https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064527

Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., Tarlinton, D. M., Kay, T. W., Köntgen, F., Adams, J. M., & Strasser, A. (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science (New York, N.Y.)*, *286*(5445), 1735-1738. https://doi.org/10.1126/science.286.5445.1735

Bourgeois, E., Van, L. P., Samson, M., Diem, S., Barra, A., Roga, S., Gombert, J.-M., Schneider, E., Dy, M., Gourdy, P., Girard, J.-P., & Herbelin, A. (2009). The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *European Journal of Immunology*, *39*(4), 1046-1055. https://doi.org/10.1002/eji.200838575

Boyman, O., Létourneau, S., Krieg, C., & Sprent, J. (2009). Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *European Journal of Immunology*, *39*(8), 2088-2094. https://doi.org/10.1002/eji.200939444

Brigl, M., & Brenner, M. B. (2010). How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens. *Seminars in Immunology*, *22*(2), 79-86. https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.10.006

Brouard, Dupont, A., Giral, M., Louis, S., Lair, D., Braudeau, C., Degauque, N., Moizant, F., Pallier, A., Ruiz, C., Guillet, M., Laplaud, D., & Soulillou, J.-P. (2005). Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, *5*(2), 330-340. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00700.x

Brouard, Pallier, A., Renaudin, K., Foucher, Y., Danger, R., Devys, A., Cesbron, A., Guillot-Guegen, C., Ashton-Chess, J., Le Roux, S., Harb, J., Roussey, G., Subra, J.-F., Villemain, F., Legendre, C., Bemelman, F. J., Orlando, G., Garnier, A., Jambon, H., … Giral, M. (2012). The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, *12*(12), 3296-3307. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04249.x

Broussard, C., Fleischacker, C., Fleischecker, C., Horai, R., Chetana, M., Venegas, A. M., Sharp, L. L., Hedrick, S. M., Fowlkes, B. J., & Schwartzberg, P. L. (2006). Altered development of CD8+ T cell lineages in mice deficient for the Tec kinases Itk and Rlk. *Immunity*, *25*(1), 93-104. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.05.011

Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paeper, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F., & Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics*, *27*(1), 68-73. https://doi.org/10.1038/83784

Burlingham, W. J., Grailer, A. P., Fechner, J. H., Kusaka, S., Trucco, M., Kocova, M., Belzer, F. O., & Sollinger, H. W. (1995). Microchimerism linked to cytotoxic T lymphocyte functional unresponsiveness (clonal anergy) in a tolerant renal transplant recipient. *Transplantation*, *59*(8), 1147-1155.

Burnet, F. M., & Fenner, F. (1949). *The production of antibodies*,.

Burzyn, D., Kuswanto, W., Kolodin, D., Shadrach, J. L., Cerletti, M., Jang, Y., Sefik, E., Tan, T. G., Wagers, A. J., Benoist, C., & Mathis, D. (2013). A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell*, *155*(6), 1282-1295. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.054

Cai, J., & Terasaki, P. (2010). Induction immunosuppression improves long-term graft and patient outcome in organ transplantation : An analysis of United Network for Organ Sharing registry data. *Transplantation*, *90*(12), 1511-1515. https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181fecfcb

Cai, J., & Terasaki, P. I. (2005). Human leukocyte antigen antibodies for monitoring transplant patients. *Surgery Today*, *35*(8), 605-612. https://doi.org/10.1007/s00595-005-3015-6

Calne. (2004). Prope tolerance : The future of organ transplantation--from the laboratory to the clinic. *Transplantation*, *77*(6), 930-932. https://doi.org/10.1097/01.tp.0000117776.14277.03

Calne, R., Friend, P., Moffatt, S., Bradley, A., Hale, G., Firth, J., Bradley, J., Smith, K., & Waldmann, H. (1998). Prope tolerance, perioperative campath 1H, and low-dose cyclosporin monotherapy in renal allograft recipients. *Lancet (London, England)*, *351*(9117), 1701-1702. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)77739-4

Camell, C. D. (2021). Taa Cells and Granzyme K : Old Players with New Tricks. *Immunity*, *54*(1), 6-8. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.12.008

Caridade, M., Graca, L., & Ribeiro, R. M. (2013). Mechanisms Underlying CD4+ Treg Immune Regulation in the Adult : From Experiments to Models. *Frontiers in Immunology*, *4*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00378

Carrero, R. M. S., Beceren-Braun, F., Rivas, S. C., Hegde, S. M., Gangadharan, A., Plote, D., Pham, G., Anthony, S. M., & Schluns, K. S. (2019). IL-15 is a component of the inflammatory milieu in the tumor microenvironment promoting antitumor responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(2), 599-608. https://doi.org/10.1073/pnas.1814642116

Castiglioni, A., Corna, G., Rigamonti, E., Basso, V., Vezzoli, M., Monno, A., Almada, A. E., Mondino, A., Wagers, A. J., Manfredi, A. A., & Rovere-Querini, P. (2015). FOXP3+ T Cells Recruited to Sites of Sterile Skeletal Muscle Injury Regulate the Fate of Satellite Cells and Guide Effective Tissue Regeneration. *PloS One*, *10*(6), e0128094. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128094

Cayssials, E., Jacomet, F., Piccirilli, N., Lefèvre, L., Roy, L., Guilhot, F., Chomel, J.-C., Leleu, X., Gombert, J.-M., Herbelin, A., & Barbarin, A. (2019). Sustained treatment-free remission in chronic myeloid leukaemia is associated with an increased frequency of innate CD8(+) T-cells. *British Journal of Haematology*, *186*(1), 54-59. https://doi.org/10.1111/bjh.15858

Chaidos, A., Patterson, S., Szydlo, R., Chaudhry, M. S., Dazzi, F., Kanfer, E., McDonald, D., Marin, D., Milojkovic, D., Pavlu, J., Davis, J., Rahemtulla, A., Rezvani, K., Goldman, J., Roberts, I., Apperley, J., & Karadimitris, A. (2012). Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, *119*(21), 5030-5036. https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-389304

Chan, C. J., Smyth, M. J., & Martinet, L. (2014). Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death and Differentiation*, *21*(1), 5-14. https://doi.org/10.1038/cdd.2013.26

Chen, He, W., Kim, S. T., Tao, J., Gao, Y., Chi, H., Intlekofer, A. M., Harvey, B., Reiner, S. L., Yin, Z., Flavell, R. A., & Craft, J. (2007). Epigenetic and transcriptional programs lead to default IFN-gamma production by gammadelta T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *178*(5), 2730-2736. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2730

Chen, Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A., & Weiner, H. L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance : Suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science (New York, N.Y.)*, *265*(5176), 1237-1240. https://doi.org/10.1126/science.7520605

Chen, Zhao, H., Gao, X., Chen, S., Liu, H., Zhang, J., Zhang, J., & Meng, M. (2019). Subcutaneous administration of α-GalCer activates iNKT10 cells to promote M2 macrophage polarization and ameliorates chronic inflammation of obese adipose tissue. *International Immunopharmacology*, *77*, 105948. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105948

Chien, Y., Meyer, C., & Bonneville, M. (2014). γδ T Cells : First Line of Defense and Beyond. *Annual Review of Immunology*, *32*(1), 121-155. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120216

Chiu, B., Martin, B., Stolberg, V., & Chensue, S. (2013, décembre 15). *Cutting edge : Central memory CD8 T cells in aged mice are virtual memory cells*. Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950); J Immunol. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302509

Cho, W. Y., Choi, H. M., Lee, S. Y., Kim, M. G., Kim, H.-K., & Jo, S.-K. (2010). The role of Tregs and CD11c(+) macrophages/dendritic cells in ischemic preconditioning of the kidney. *Kidney International*, *78*(10), 981-992. https://doi.org/10.1038/ki.2010.266

Choi, J. Y., Eskandari, S. K., Cai, S., Sulkaj, I., Assaker, J. P., Allos, H., AlHaddad, J., Muhsin, S. A., Alhussain, E., Mansouri, A., Yeung, M. Y., Seelen, M. A. J., Kim, H.-J., Cantor, H., & Azzi, J. R. (2020). Regulatory CD8 T cells that recognize Qa-1 expressed by CD4 T-helper cells inhibit rejection of heart allografts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(11), 6042-6046. https://doi.org/10.1073/pnas.1918950117

Christensen, L. L., Grunnet, N., Rüdiger, N., Møller, B., & Birkeland, S. A. (1998). Indications of immunological tolerance in kidney transplantation. *Tissue Antigens*, *51*(6), 637-644. https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1998.tb03006.x

Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S., & Vignali, D. A. A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, *450*(7169), 566-569. https://doi.org/10.1038/nature06306

Combates, N. J., Degiannis, D., Raskova, J., & Raska, K. (1995). Direct inhibition of human CD8+ lymphocyte activation by cyclosporine A and Rapamune-Sirolimus. *Clinical Immunology and Immunopathology*, *77*(3), 221-228. https://doi.org/10.1006/clin.1995.1147

Constantinides, M. G., Link, V. M., Tamoutounour, S., Wong, A. C., Perez-Chaparro, P. J., Han, S.-J., Chen, Y. E., Li, K., Farhat, S., Weckel, A., Krishnamurthy, S. R., Vujkovic-Cvijin, I., Linehan, J. L., Bouladoux, N., Merrill, E. D., Roy, S., Cua, D. J., Adams, E. J., Bhandoola, A., … Belkaid, Y. (2019). MAIT cells are imprinted by the microbiota in early life and promote tissue repair. *Science (New York, N.Y.)*, *366*(6464). https://doi.org/10.1126/science.aax6624

Cortesini, R., & Suciu-Foca, N. (2004). The concept of « partial » clinical tolerance. *Transplant Immunology*, *13*(2), 101-104. https://doi.org/10.1016/j.trim.2004.05.002

Couzi, L., Levaillant, Y., Jamai, A., Pitard, V., Lassalle, R., Martin, K., Garrigue, I., Hawchar, O., Siberchicot, F., Moore, N., Moreau, J.-F., Dechanet-Merville, J., & Merville, P. (2010). Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *21*(1), 181-188. https://doi.org/10.1681/ASN.2008101072

Couzi, L., Pitard, V., Sicard, X., Garrigue, I., Hawchar, O., Merville, P., Moreau, J.-F., & Déchanet-Merville, J. (2012). Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human γδ T cells expressing CD16 (FcγRIIIa). *Blood*, *119*(6), 1418-1427. https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-363655

Cozzi, E., Colpo, A., & De Silvestro, G. (2017). The mechanisms of rejection in solid organ transplantation. *Transfusion and Apheresis Science*, *56*(4), 498-505. https://doi.org/10.1016/j.transci.2017.07.005

Crouse, J., Bedenikovic, G., Wiesel, M., Ibberson, M., Xenarios, I., Von Laer, D., Kalinke, U., Vivier, E., Jonjic, S., & Oxenius, A. (2014). Type I interferons protect T cells

against NK cell attack mediated by the activating receptor NCR1. *Immunity*, *40*(6), 961-973. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.003

Cui, G., Hara, T., Simmons, S., Wagatsuma, K., Abe, A., Miyachi, H., Kitano, S., Ishii, M., Tani-ichi, S., & Ikuta, K. (2014). Characterization of the IL-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(5), 1915-1920. https://doi.org/10.1073/pnas.1318281111

Curotto de Lafaille, M. A., & Lafaille, J. J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells : More of the same or a division of labor? *Immunity*, *30*(5), 626-635. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.002

Das, H., Groh, V., Kuijl, C., Sugita, M., Morita, C. T., Spies, T., & Bukowski, J. F. (2001). MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity*, *15*(1), 83-93. https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00168-6

Deniz, G., Erten, G., Kücüksezer, U. C., Kocacik, D., Karagiannidis, C., Aktas, E., Akdis, C. A., & Akdis, M. (2008). Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *180*(2), 850-857. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.2.850

Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., & Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature Immunology*, *2*(11), 1032-1039. https://doi.org/10.1038/ni723

Derniame, S., Perazzo, J., Lee, F., Domogala, A., Escobedo-Cousin, M., Alnabhan, R., Luevano, M., Pedroza-Pacheco, I., Cooper, N., Madrigal, A., & Saudemont, A. (2014). Differential effects of mycophenolate mofetil and cyclosporine A on peripheral blood and cord blood natural killer cells activated with interleukin-2. *Cytotherapy*, *16*(10), 1409-1418. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.05.010

DeWolf, S., & Sykes, M. (2017). Alloimmune T cells in transplantation. *The Journal of Clinical Investigation*, *127*(7), 2473-2481. https://doi.org/10.1172/JCI90595

Dhanji, S., Chow, M. T., & Teh, H.-S. (2006). Self-antigen maintains the innate antibacterial function of self-specific CD8 T cells in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *177*(1), 138-146. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.138

Dhanji, S., Teh, S.-J., Oble, D., Priatel, J. J., & Teh, H.-S. (2004). Self-reactive memory-phenotype CD8 T cells exhibit both MHC-restricted and non-MHC-restricted cytotoxicity : A role for the T-cell receptor and natural killer cell receptors. *Blood*, *104*(7), 2116-2123. https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0150

Dickgreber, N., Farrand, K. J., van Panhuys, N., Knight, D. A., McKee, S. J., Chong, M. L., Miranda-Hernandez, S., Baxter, A. G., Locksley, R. M., Le Gros, G., & Hermans, I. F. (2012). Immature murine NKT cells pass through a stage of developmentally programmed innate IL-4 secretion. *Journal of Leukocyte Biology*, *92*(5), 999-1009. https://doi.org/10.1189/jlb.0512242

Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., & Schuler, G. (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *The Journal of Experimental Medicine*, *193*(11), 1303-1310. https://doi.org/10.1084/jem.193.11.1303

Dieli, F., Troye-Blomberg, M., Ivanyi, J., Fournié, J. J., Krensky, A. M., Bonneville, M., Peyrat, M. A., Caccamo, N., Sireci, G., & Salerno, A. (2001). Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *The Journal of Infectious Diseases*, *184*(8), 1082-1085. https://doi.org/10.1086/323600

Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, *4*(1), 11-22. https://doi.org/10.1038/nrc1252

Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology*, *22*(1), 329-360. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803

Duthie, M. S., Kahn, M., White, M., Kapur, R. P., & Kahn, S. J. (2005). Both CD1d antigen presentation and interleukin-12 are required to activate natural killer T cells during Trypanosoma cruzi infection. *Infection and Immunity*, *73*(3), 1890-1894. https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1890-1894.2005

Ehrentraut, H., Clambey, E. T., McNamee, E. N., Brodsky, K. S., Ehrentraut, S. F., Poth, J. M., Riegel, A. K., Westrich, J. A., Colgan, S. P., & Eltzschig, H. K. (2013). CD73+ regulatory T cells contribute to adenosine-mediated resolution of acute lung injury. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *27*(6), 2207-2219. https://doi.org/10.1096/fj.12-225201

Eidson, M., Wahlstrom, J., Beaulieu, A. M., Zaidi, B., Carsons, S. E., Crow, P. K., Yuan, J., Wolchok, J. D., Horsthemke, B., Wieczorek, D., & Sant'Angelo, D. B. (2011). Altered development of NKT cells, γδ T cells, CD8 T cells and NK cells in a PLZF deficient patient. *PloS One*, *6*(9), e24441. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024441

Eissens, D. N., Van Der Meer, A., Van Cranenbroek, B., Preijers, F. W. M. B., & Joosten, I. (2010). Rapamycin and MPA, but not CsA, impair human NK cell cytotoxicity due to differential effects on NK cell phenotype. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, *10*(9), 1981-1990. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03242.x

Ekberg, H., Tedesco-Silva, H., Demirbas, A., Vítko, S., Nashan, B., Gürkan, A., Margreiter, R., Hugo, C., Grinyó, J. M., Frei, U., Vanrenterghem, Y., Daloze, P., Halloran, P. F., & ELITE-Symphony Study. (2007). Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *The New England Journal of Medicine*, *357*(25), 2562-2575. https://doi.org/10.1056/NEJMoa067411

Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Fraumeni, J. F., Kasiske, B. L., Israni, A. K., Snyder, J. J., Wolfe, R. A., Goodrich, N. P., Bayakly, A. R., Clarke, C. A., Copeland, G., Finch, J. L., Fleissner, M. L., Goodman, M. T., Kahn, A., Koch, L., Lynch, C. F., Madeleine, M. M., Pawlish, K., … Lin, M. (2011). Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA*, *306*(17), 1891-1901. https://doi.org/10.1001/jama.2011.1592

Espinosa, E., & Chillet, P. (2010). *Immunologie* (Ellipses).

Fagiolo, U., Cossarizza, A., Scala, E., Fanales-Belasio, E., Ortolani, C., Cozzi, E., Monti, D., Franceschi, C., & Paganelli, R. (1993). Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *European Journal of Immunology*, *23*(9), 2375-2378. https://doi.org/10.1002/eji.1830230950

Fangmann, J., Dalchau, R., & Fabre, J. W. (1992). Rejection of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. *The Journal of Experimental Medicine*, *175*(6), 1521-1529. https://doi.org/10.1084/jem.175.6.1521

Fann, M., Chiu, W. K., Wood, W. H., Levine, B. L., Becker, K. G., & Weng, N.-P. (2005). Gene expression characteristics of CD28null memory phenotype CD8+ T cells and its implication in T-cell aging. *Immunological Reviews*, *205*, 190-206. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00262.x

Ferber, I., Schönrich, G., Schenkel, J., Mellor, A. L., Hämmerling, G. J., & Arnold, B. (1994). Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science (New York, N.Y.), 263*(5147), 674-676. https://doi.org/10.1126/science.8303275

Ferhat, M., Robin, A., Giraud, S., Sena, S., Goujon, J.-M., Touchard, G., Hauet, T., Girard, J.-P., Gombert, J.-M., Herbelin, A., & Thierry, A. (2018). Endogenous IL-33 Contributes to Kidney Ischemia-Reperfusion Injury as an Alarmin. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *29*(4), 1272-1288. https://doi.org/10.1681/ASN.2017060650

Ferrucci, L., & Fabbri, E. (2018). Inflammageing : Chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nature Reviews Cardiology*, *15*(9), 505-522. https://doi.org/10.1038/s41569-018-0064-2

Fischer, T., Schobel, H., & Barenbrock, M. (1996). Specific immune tolerance during pregnancy after renal transplantation. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, *70*(2), 217-219. https://doi.org/10.1016/s0301-2115(95)02581-2

Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, *4*(4), 330-336. https://doi.org/10.1038/ni904

Foong, Y. Y., Jans, D. A., Rolph, M. S., Gahan, M. E., & Mahalingam, S. (2009). Interleukin-15 mediates potent antiviral responses via an interferon-dependent mechanism. *Virology*, *393*(2), 228-237. https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.030

Fudaba, Y., Spitzer, T. R., Shaffer, J., Kawai, T., Fehr, T., Delmonico, F., Preffer, F., Tolkoff-Rubin, N., Dey, B. R., Saidman, S. L., Kraus, A., Bonnefoix, T., McAfee, S., Power, K., Kattleman, K., Colvin, R. B., Sachs, D. H., Cosimi, A. B., & Sykes, M. (2006). Myeloma responses and tolerance following combined kidney and nonmyeloablative marrow transplantation : In vivo and in vitro analyses. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, *6*(9), 2121-2133. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01434.x

Fukuyama, T., Kasper, L. H., Boussouar, F., Jeevan, T., van Deursen, J., & Brindle, P. K. (2009). Histone acetyltransferase CBP is vital to demarcate conventional and innate CD8+ T-cell development. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(14), 3894-3904. https://doi.org/10.1128/MCB.01598-08

Furman, D., Chang, J., Lartigue, L., Bolen, C. R., Haddad, F., Gaudilliere, B., Ganio, E. A., Fragiadakis, G. K., Spitzer, M. H., Douchet, I., Daburon, S., Moreau, J.-F., Nolan, G. P., Blanco, P., Déchanet-Merville, J., Dekker, C. L., Jojic, V., Kuo, C. J., Davis, M. M., & Faustin, B. (2017). Expression of specific inflammasome gene modules stratifies older individuals into two extreme clinical and immunological states. *Nature Medicine*, *23*(2), 174-184. https://doi.org/10.1038/nm.4267

Gallon, L., Watschinger, B., Murphy, B., Akalin, E., Sayegh, M. H., & Carpenter, C. B. (1995). The indirect pathway of allorecognition. The occurrence of self-restricted T cell recognition of allo-MHC peptides early in acute renal allograft rejection and its inhibition by conventional immunosuppression. *Transplantation*, *59*(4), 612-616.

Gandolfo, M. T., Jang, H. R., Bagnasco, S. M., Ko, G.-J., Agreda, P., Satpute, S. R., Crow, M. T., King, L. S., & Rabb, H. (2009). Foxp3+ regulatory T cells participate in repair of ischemic acute kidney injury. *Kidney International*, *76*(7), 717-729. https://doi.org/10.1038/ki.2009.259

Gapin, L., Matsuda, J. L., Surh, C. D., & Kronenberg, M. (2001). NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nature Immunology*, *2*(10), 971-978. https://doi.org/10.1038/ni710

Geiger, T. L., & Sun, J. C. (2016). Development and maturation of natural killer cells. *Current Opinion in Immunology*, *39*, 82-89. https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.01.007

George, A. J., & Ritter, M. A. (1996). Thymic involution with ageing : Obsolescence or good housekeeping? *Immunology Today*, *17*(6), 267-272. https://doi.org/10.1016/0167-5699(96)80543-3

Godfrey, D. I., Koay, H.-F., McCluskey, J., & Gherardin, N. A. (2019). The biology and functional importance of MAIT cells. *Nature Immunology*, *20*(9), 1110-1128. https://doi.org/10.1038/s41590-019-0444-8

Godfrey, D. I., McCluskey, J., & Rossjohn, J. (2005). CD1d antigen presentation : Treats for NKT cells. *Nature Immunology*, *6*(8), 754-756. https://doi.org/10.1038/ni0805-754

Godfrey, D. I., Uldrich, A. P., McCluskey, J., Rossjohn, J., & Moody, D. B. (2015). The burgeoning family of unconventional T cells. *Nature Immunology*, *16*(11), 1114-1123. https://doi.org/10.1038/ni.3298

Gondek, D. C., Lu, L.-F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S., & Noelle, R. J. (2005). Cutting edge : Contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *174*(4), 1783-1786. https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.4.1783

Goplen, N. P., Saxena, V., Knudson, K. M., Schrum, A. G., Gil, D., Daniels, M. A., Zamoyska, R., & Teixeiro, E. (2016). IL-12 Signals through the TCR To Support CD8 Innate Immune Responses. *The Journal of Immunology*, *197*(6), 2434-2443. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600037

Gordon, S. M., Carty, S. A., Kim, J. S., Zou, T., Smith-Garvin, J., Alonzo, E. S., Haimm, E., Sant'Angelo, D. B., Koretzky, G. A., Reiner, S. L., & Jordan, M. S. (2011). Requirements for eomesodermin and promyelocytic leukemia zinc finger in the development of innate-like CD8+ T cells. *Journal of Immunology*, *186*(8), 4573-4578. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100037

Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2019). Mechanisms underlying T cell ageing. *Nature Reviews Immunology*, *19*(9), 573-583. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0180-1

Green, Gorelik, L., McGregor, C. M., Tran, E. H., & Flavell, R. A. (2003). CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(19), 10878-10883. https://doi.org/10.1073/pnas.1834400100

Griewank, K., Borowski, C., Rietdijk, S., Wang, N., Julien, A., Wei, D. G., Mamchak, A. A., Terhorst, C., & Bendelac, A. (2007). Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity*, *27*(5), 751-762. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.020

Grose, R. H., Thompson, F. M., Baxter, A. G., Pellicci, D. G., & Cummins, A. G. (2007). Deficiency of invariant NK T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, *52*(6), 1415-1422. https://doi.org/10.1007/s10620-006-9261-7

Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J. P., & Ley, T. J. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*, *21*(4), 589-601. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.09.002

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., & Roncarolo, M. G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, *389*(6652), 737-742. https://doi.org/10.1038/39614

Grulich, A. E., van Leeuwen, M. T., Falster, M. O., & Vajdic, C. M. (2007). Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients : A meta-analysis. *Lancet (London, England)*, *370*(9581), 59-67. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61050-2

Guo, H., Wang, W., Zhao, N., He, X., Zhu, L., & Jiang, X. (2013). Inhibiting cardiac allograft rejection with interleukin-35 therapy combined with decitabine treatment in mice. *Transplant Immunology*, *29*(1-4), 99-104. https://doi.org/10.1016/j.trim.2013.10.001

Gutierrez-Arcelus, M., Teslovich, N., Mola, A. R., Polidoro, R. B., Nathan, A., Kim, H., Hannes, S., Slowikowski, K., Watts, G. F. M., Korsunsky, I., Brenner, M. B., Raychaudhuri, S., & Brennan, P. J. (2019). Lymphocyte innateness defined by transcriptional states reflects a balance between proliferation and effector functions. *Nature Communications*, *10*(1), 687. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08604-4

Halary, F., Peyrat, M.-A., Champagne, E., Lopez-Botet, M., Moretta, A., Moretta, L., Vié, H., Fournié, J.-J., & Bonneville, M. (1997). Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing γδ T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. *European Journal of Immunology*, *27*(11), 2812-2821. https://doi.org/10.1002/eji.1830271111

Halloran, P. F. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *The New England Journal of Medicine*, *351*(26), 2715-2729. https://doi.org/10.1056/NEJMra033540

Haluszczak, C., Akue, A. D., Hamilton, S. E., Johnson, L. D. S., Pujanauski, L., Teodorovic, L., Jameson, S. C., & Kedl, R. M. (2009). The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *The Journal of Experimental Medicine*, *206*(2), 435-448. https://doi.org/10.1084/jem.20081829

Hammond, K. J. L., & Kronenberg, M. (2003). Natural killer T cells : Natural or unnatural regulators of autoimmunity? *Current Opinion in Immunology*, *15*(6), 683-689. https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.09.014

Han, Y. W., Aleyas, A. G., George, J. A., Yoon, H. A., Lee, J. H., Kim, B. S., & Eo, S. K. (2007). Intracellular CD154 expression reflects antigen-specific CD8+ t cells but shows less sensitivity than intracellular cytokine and MHC tetramer staining. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *17*(12), 1955-1964.

Harly, C., Guillaume, Y., Nedellec, S., Peigné, C.-M., Mönkkönen, H., Mönkkönen, J., Li, J., Kuball, J., Adams, E. J., Netzer, S., Déchanet-Merville, J., Léger, A., Herrmann, T., Breathnach, R., Olive, D., Bonneville, M., & Scotet, E. (2012). Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human γδ T-cell subset. *Blood*, *120*(11), 2269-2279. https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-430470

Havran, & Jameson, J. M. (2010). Epidermal T cells and wound healing. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *184*(10), 5423-5428. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902733

Henson, S. M., Franzese, O., Macaulay, R., Libri, V., Azevedo, R. I., Kiani-Alikhan, S., Plunkett, F. J., Masters, J. E., Jackson, S., Griffiths, S. J., Pircher, H.-P., Soares, M. V. D., & Akbar, A. N. (2009). KLRG1 signaling induces defective Akt (ser473) phosphorylation and proliferative dysfunction of highly differentiated CD8+ T cells. *Blood*, *113*(26), 6619-6628. https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-199588

Henson, S. M., Riddell, N. E., & Akbar, A. N. (2012). Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression. *Current Opinion in Immunology*, *24*(4), 476-481. https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.04.001

Herrera, O. B., Golshayan, D., Tibbott, R., Salcido Ochoa, F., James, M. J., Marelli-Berg, F. M., & Lechler, R. I. (2004). A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *173*(8), 4828-4837. https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.8.4828

Hertig, A., & Rondeau, E. (2006). Immunomodulation dans la greffe rénale : Ce qui a changé en 20 ans. *Réanimation*, *15*(4), 253-258. https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2006.06.012

Hodson, E. M., Jones, C. A., Webster, A. C., Strippoli, G. F. M., Barclay, P. G., Kable, K., Vimalachandra, D., & Craig, J. C. (2005). Antiviral medications to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants : A systematic review of randomised controlled trials. *Lancet (London, England)*, *365*(9477), 2105-2115. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66553-1

Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)*, *299*(5609), 1057-1061. https://doi.org/10.1126/science.1079490

Hornick, P. I., Mason, P. D., Yacoub, M. H., Rose, M. L., Batchelor, R., & Lechler, R. I. (1998). Assessment of the contribution that direct allorecognition makes to the progression of chronic cardiac transplant rejection in humans. *Circulation*, *97*(13), 1257-1263. https://doi.org/10.1161/01.cir.97.13.1257

Hu, Sahu, N., Walsh, E., & August, A. (2007). Memory phenotype CD8+ T cells with innate function selectively develop in the absence of active Itk. *European Journal of Immunology*, *37*(10), 2892-2899. https://doi.org/10.1002/eji.200737311

Hu, Wu, P., Cheng, P., Zhang, Z., Wang, Z., Yu, X., Shao, X., Wu, D., Ye, J., Zhang, T., Wang, X., Qiu, F., Yan, J., & Huang, J. (2017). Tumor-infiltrating CD39+γδTregs are novel immunosuppressive T cells in human colorectal cancer. *Oncoimmunology*, *6*(2), e1277305. https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1277305

Huang, W., Huang, F., Kannan, A. K., Hu, J., & August, A. (2014). ITK tunes IL-4-induced development of innate memory CD8+ T cells in a γδ T and invariant NKT cell-independent manner. *Journal of Leukocyte Biology*, *96*(1), 55-63. https://doi.org/10.1189/jlb.1AB0913-484RR

Huard, B., & Karlsson, L. (2000). A subpopulation of CD8+ T cells specific for melanocyte differentiation antigens expresses killer inhibitory receptors (KIR) in healthy donors : Evidence for a role of KIR in the control of peripheral tolerance. *European Journal of Immunology*, *30*(6), 1665-1675. https://doi.org/10.1002/1521-4141(200006)30:6<1665::AID-IMMU1665>3.0.CO;2-2

Hulin, A. (2008). [Today in molecular mechanisms of immunosuppressive drugs actions : Roles of pharmacist]. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, *66*(2), 102-114. https://doi.org/10.1016/j.pharma.2008.03.005

Ildstad, S. T., & Sachs, D. H. (1984). Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. *Nature*, *307*(5947), 168-170. https://doi.org/10.1038/307168a0

Intlekofer, A. M., Takemoto, N., Wherry, E. J., Longworth, S. A., Northrup, J. T., Palanivel, V. R., Mullen, A. C., Gasink, C. R., Kaech, S. M., Miller, J. D., Gapin, L., Ryan, K., Russ, A. P., Lindsten, T., Orange, J. S., Goldrath, A. W., Ahmed, R., & Reiner, S. L. (2005). Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nature Immunology*, *6*(12), 1236-1244. https://doi.org/10.1038/ni1268

Istaces, N., Splittgerber, M., Lima Silva, V., Nguyen, M., Thomas, S., Le, A., Achouri, Y., Calonne, E., Defrance, M., Fuks, F., Goriely, S., & Azouz, A. (2019). EOMES interacts with RUNX3 and BRG1 to promote innate memory cell formation through epigenetic reprogramming. *Nature Communications*, *10*. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11233-6

Jabrane-Ferrat, N. (2019). Features of Human Decidual NK Cells in Healthy Pregnancy and During Viral Infection. *Frontiers in Immunology*, *10*, 1397. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01397

Jacomet, F., Cayssials, E., Barbarin, A., Desmier, D., Basbous, S., Lefèvre, L., Levescot, A., Robin, A., Piccirilli, N., Giraud, C., Guilhot, F., Roy, L., Herbelin, A., & Gombert, J.-M. (2017). The Hypothesis of the Human iNKT/Innate CD8(+) T-Cell Axis Applied to Cancer : Evidence for a Deficiency in Chronic Myeloid Leukemia. *Frontiers in Immunology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00688

Jacomet, F., Cayssials, E., Basbous, S., Levescot, A., Piccirilli, N., Desmier, D., Robin, A., Barra, A., Giraud, C., Guilhot, F., Roy, L., Herbelin, A., & Gombert, J.-M. (2015). Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8 $^{+}$ KIR/NKG2A $^{+}$ T cells in human adults and cord blood samples : Innate immunity. *European Journal of Immunology*, *45*(7), 1926-1933. https://doi.org/10.1002/eji.201545539

Jacquemont, L., Tilly, G., Yap, M., Doan-Ngoc, T.-M., Danger, R., Guérif, P., Delbos, F., Martinet, B., Giral, M., Foucher, Y., Brouard, S., & Degauque, N. (2020). Terminally Differentiated Effector Memory CD8+ T Cells Identify Kidney Transplant Recipients at High Risk of Graft Failure. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *31*(4), 876-891. https://doi.org/10.1681/ASN.2019080847

Jayaraman, A., Jackson, D. J., Message, S. D., Pearson, R. M., Aniscenko, J., Caramori, G., Mallia, P., Papi, A., Shamji, B., Edwards, M., Westwick, J., Hansel, T., Stanciu, L. A., Johnston, S. L., & Bartlett, N. W. (2014). IL-15 complexes induce NK- and T-cell responses independent of type I IFN signaling during rhinovirus infection. *Mucosal Immunology*, *7*(5), 1151-1164. https://doi.org/10.1038/mi.2014.2

Jensen, K. D. C., & Chien, Y.-H. (2009). Thymic maturation determines gammadelta T cell function, but not their antigen specificities. *Current Opinion in Immunology*, *21*(2), 140-145. https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.02.008

Jensen, K. D. C., Su, X., Shin, S., Li, L., Youssef, S., Yamasaki, S., Steinman, L., Saito, T., Locksley, R. M., Davis, M. M., Baumgarth, N., & Chien, Y. (2008). Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate : Antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. *Immunity*, *29*(1), 90-100. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.04.022

Jimeno, R., Lebrusant-Fernandez, M., Margreitter, C., Lucas, B., Veerapen, N., Kelly, G., Besra, G. S., Fraternali, F., Spencer, J., Anderson, G., & Barral, P. (2019). Tissue-specific shaping of the TCR repertoire and antigen specificity of iNKT cells. *ELife*, *8*. https://doi.org/10.7554/eLife.51663

Jin, J.-H., Huang, H.-H., Zhou, M.-J., Li, J., Hu, W., Huang, L., Xu, Z., Tu, B., Yang, G., Shi, M., Jiao, Y.-M., Fan, X., Song, J.-W., Zhang, J.-Y., Zhang, C., & Wang, F.-S. (2020). Virtual memory CD8+ T cells restrain the viral reservoir in HIV-1-infected patients with antiretroviral therapy through derepressing KIR-mediated inhibition. *Cellular & Molecular Immunology*. https://doi.org/10.1038/s41423-020-0408-9

Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., & Enk, A. H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4+ CD25+ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *The Journal of experimental medicine*, *193*(11), 1285-1294.

Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Holenbeck, A. E., Lerman, M. A., Naji, A., & Caton, A. J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature Immunology*, *2*(4), 301-306. https://doi.org/10.1038/86302

Kang, N., Tang, L., Li, X., Wu, D., Li, W., Chen, X., Cui, L., Ba, D., & He, W. (2009). Identification and characterization of Foxp3(+) gammadelta T cells in mouse and human. *Immunology Letters*, *125*(2), 105-113. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.06.005

Karagöz, B., Bilgi, O., Gümüs, M., Erikçi, A. A., Sayan, O., Türken, O., Kandemir, E. G., Oztürk, A., & Yaylaci, M. (2010). CD8+CD28- cells and CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of advanced stage lung cancer patients. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, *27*(1), 29-33. https://doi.org/10.1007/s12032-008-9165-9

Kasakovski, D., Zeng, X., Lai, J., Yu, Z., Yao, D., Chen, S., Zha, X., Li, Y., & Xu, L. (2020). Characterization of KIR + NKG2A + Eomes- NK-like CD8+ T cells and their decline with age in healthy individuals. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*. https://doi.org/10.1002/cyto.b.21945

Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.-A., & Ramsdell, F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature Immunology*, *4*(4), 337-342. https://doi.org/10.1038/ni909

Kim, Lynch, L., Brennan, P. J., Cohen, N. R., & Brenner, M. B. (2015). The transcriptional programs of iNKT cells. *Seminars in Immunology*, *27*(1), 26-32. https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.02.005

Kinsey, G. R., Huang, L., Vergis, A. L., Li, L., & Okusa, M. D. (2010). Regulatory T cells contribute to the protective effect of ischemic preconditioning in the kidney. *Kidney International*, *77*(9), 771-780. https://doi.org/10.1038/ki.2010.12

Kiziroglu, F., & Miller, R. G. (1990). Direct effect of cyclosporin A on CD8+ T lymphocytes in a primary mixed lymphocyte reaction. *Immunology Letters*, *24*(2), 77-86. https://doi.org/10.1016/0165-2478(90)90015-i

Klein Geltink, R. I., O'Sullivan, D., Corrado, M., Bremser, A., Buck, M. D., Buescher, J. M., Firat, E., Zhu, X., Niedermann, G., Caputa, G., Kelly, B., Warthorst, U., Rensing-Ehl, A., Kyle, R. L., Vandersarren, L., Curtis, J. D., Patterson, A. E., Lawless, S., Grzes, K., … Pearce, E. L. (2017). Mitochondrial Priming by CD28. *Cell*, *171*(2), 385-397.e11. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.018

Klenerman, P., Hinks, T. S. C., & Ussher, J. E. (2021). Biological functions of MAIT cells in tissues. *Molecular Immunology*, *130*, 154-158. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.12.017

Knechtle, S. J., Pirsch, J. D., H Fechner, J., Becker, B. N., Friedl, A., Colvin, R. B., Lebeck, L. K., Chin, L. T., Becker, Y. T., Odorico, J. S., D'Alessandro, A. M., Kalayoglu, M., Hamawy, M. M., Hu, H., Bloom, D. D., & Sollinger, H. W. (2003). Campath-1H induction plus rapamycin monotherapy for renal transplantation : Results of a pilot study. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, *3*(6), 722-730. https://doi.org/10.1034/j.1600-6143.2003.00120.x

Koay, H.-F., Gherardin, N. A., Enders, A., Loh, L., Mackay, L. K., Almeida, C. F., Russ, B. E., Nold-Petry, C. A., Nold, M. F., Bedoui, S., Chen, Z., Corbett, A. J., Eckle, S. B. G., Meehan, B., d'Udekem, Y., Konstantinov, I. E., Lappas, M., Liu, L., Goodnow, C. C., … Pellicci, D. G. (2016). A three-stage intrathymic development pathway for the

mucosal-associated invariant T cell lineage. *Nature Immunology*, *17*(11), 1300-1311. https://doi.org/10.1038/ni.3565

Kronenberg, M., & Zajonc, D. M. (2013). A « GEM » of a cell. *Nature Immunology*, *14*(7), 694-695. https://doi.org/10.1038/ni.2644

Kryczek, I., Wei, S., Zou, L., Zhu, G., Mottram, P., Xu, H., Chen, L., & Zou, W. (2006). Cutting edge : Induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *177*(1), 40-44. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.40

Kuijpers, T. W., Vossen, M. T., Gent, M.-R., Davin, J.-C., Roos, M. T., Wertheim-van Dillen, P. M., Weel, J. F., Baars, P. A., & van Lier, R. A. (2003). Frequencies of circulating cytolytic, CD45RA+CD27-, CD8+ T lymphocytes depend on infection with CMV. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *170*(8), 4342-4348. https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.8.4342

La Cava, A., Van Kaer, L., & Fu-Dong-Shi, null. (2006). CD4+CD25+ Tregs and NKT cells : Regulators regulating regulators. *Trends in Immunology*, *27*(7), 322-327. https://doi.org/10.1016/j.it.2006.05.003

Lakkis, F. G., Arakelov, A., Konieczny, B. T., & Inoue, Y. (2000). Immunologic « ignorance » of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nature Medicine*, *6*(6), 686-688. https://doi.org/10.1038/76267

Lamichhane, R., Schneider, M., de la Harpe, S. M., Harrop, T. W. R., Hannaway, R. F., Dearden, P. K., Kirman, J. R., Tyndall, J. D. A., Vernall, A. J., & Ussher, J. E. (2019). TCR- or Cytokine-Activated CD8+ Mucosal-Associated Invariant T Cells Are Rapid Polyfunctional Effectors That Can Coordinate Immune Responses. *Cell Reports*, *28*(12), 3061-3076.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.054

Lanna, A., Gomes, D. C. O., Muller-Durovic, B., McDonnell, T., Escors, D., Gilroy, D. W., Lee, J. H., Karin, M., & Akbar, A. N. (2017). A sestrin-dependent Erk-Jnk-p38 MAPK activation complex inhibits immunity during aging. *Nature Immunology*, *18*(3), 354-363. https://doi.org/10.1038/ni.3665

Lee, Holzapfel, K. L., Zhu, J., Jameson, S. C., & Hogquist, K. A. (2013). Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. *Nature Immunology*, *14*(11), 1146-1154. https://doi.org/10.1038/ni.2731

Lee, Park, S. P., Park, C. H., Kang, B. H., Park, S. H., Ha, S.-J., & Jung, K. C. (2015). IL-4 Induced Innate CD8+ T Cells Control Persistent Viral Infection. *PLoS Pathogens*, *11*(10), e1005193. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005193

Lee, Zhang, T., Hwang, I., Kim, A., Nitschke, L., Kim, M., Scott, J. M., Kamimura, Y., Lanier, L. L., & Kim, S. (2015). Epigenetic modification and antibody-dependent expansion of memory-like NK cells in human cytomegalovirus-infected individuals. *Immunity*, *42*(3), 431-442. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.013

Legoux, Gilet, J., Procopio, E., Echasserieau, K., Bernardeau, K., & Lantz, O. (2019). Molecular mechanisms of lineage decisions in metabolite-specific T cells. *Nature Immunology*, *20*(9), 1244-1255. https://doi.org/10.1038/s41590-019-0465-3

Legoux, Salou, M., & Lantz, O. (2017). Unconventional or Preset αβ T Cells : Evolutionarily Conserved Tissue-Resident T Cells Recognizing Nonpeptidic Ligands. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *33*, 511-535. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060725

Leng, T., Akther, H. D., Hackstein, C.-P., Powell, K., King, T., Friedrich, M., Christoforidou, Z., McCuaig, S., Neyazi, M., Arancibia-Cárcamo, C. V., Hagel, J., Powrie, F., Oxford IBD Investigators, Peres, R. S., Millar, V., Ebner, D., Lamichhane, R., Ussher, J.,

Hinks, T. S. C., … Klenerman, P. (2019). TCR and Inflammatory Signals Tune Human MAIT Cells to Exert Specific Tissue Repair and Effector Functions. *Cell Reports*, *28*(12), 3077-3091.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.050

Levings, M. K., Sangregorio, R., & Roncarolo, M.-G. (2001). Human CD25+ CD4+ T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *The Journal of experimental medicine*, *193*(11), 1295-1302.

Lewkowicz, N., Klink, M., Mycko, M. P., & Lewkowicz, P. (2013). Neutrophil--CD4+CD25+ T regulatory cell interactions : A possible new mechanism of infectious tolerance. *Immunobiology*, *218*(4), 455-464. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.05.029

Li, Li, X. C., Zheng, X. X., Wells, A. D., Turka, L. A., & Strom, T. B. (1999). Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nature Medicine*, *5*(11), 1298-1302. https://doi.org/10.1038/15256

Liao, X. C., & Littman, D. R. (1995). Altered T cell receptor signaling and disrupted T cell development in mice lacking Itk. *Immunity*, *3*(6), 757-769. https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90065-9

Linehan, J. L., Harrison, O. J., Han, S.-J., Byrd, A. L., Vujkovic-Cvijin, I., Villarino, A. V., Sen, S. K., Shaik, J., Smelkinson, M., Tamoutounour, S., Collins, N., Bouladoux, N., Dzutsev, A., Rosshart, S. P., Arbuckle, J. H., Wang, C.-R., Kristie, T. M., Rehermann, B., Trinchieri, G., … Belkaid, Y. (2018). Non-classical Immunity Controls Microbiota Impact on Skin Immunity and Tissue Repair. *Cell*, *172*(4), 784-796.e18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.033

Liu, Q., Zheng, H., Chen, X., Peng, Y., Huang, W., Li, X., Li, G., Xia, W., Sun, Q., & Xiang, A. P. (2015). Human mesenchymal stromal cells enhance the immunomodulatory function of CD8+CD28− regulatory T cells. *Cellular and Molecular Immunology*, *12*(6), 708-718. https://doi.org/10.1038/cmi.2014.118

Liu, R., Cava, A. L., Bai, X.-F., Jee, Y., Price, M., Campagnolo, D. I., Christadoss, P., Vollmer, T. L., Kaer, L. V., & Shi, F.-D. (2005). Cooperation of Invariant NKT Cells and CD4+CD25+ T Regulatory Cells in the Prevention of Autoimmune Myasthenia. *The Journal of Immunology*, *175*(12), 7898-7904. https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.7898

Liu, Z., Colovai, A. I., Tugulea, S., Reed, E. F., Fisher, P. E., Mancini, D., Rose, E. A., Cortesini, R., Michler, R. E., & Suciu-Foca, N. (1996). Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *The Journal of Clinical Investigation*, *98*(5), 1150-1157. https://doi.org/10.1172/JCI118898

Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Rahnavard, G., Crabtree, J., Orvis, J., Hall, A. B., Brady, A., Creasy, H. H., McCracken, C., Giglio, M. G., McDonald, D., Franzosa, E. A., Knight, R., White, O., & Huttenhower, C. (2017). Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature*, *550*(7674), 61-66. https://doi.org/10.1038/nature23889

Lopes, N., Ferrier, P., & Irla, M. (2015). [Induction of central tolerance by the factor Aire : Molecular and epigenetic regulation]. *Medecine Sciences: M/S*, *31*(8-9), 742-747. https://doi.org/10.1051/medsci/20153108012

López-Botet, M., Llano, M., Navarro, F., & Bellón, T. (2000). NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. *Seminars in Immunology*, *12*(2), 109-119. https://doi.org/10.1006/smim.2000.0213

Lopez-Vergès, S., Milush, J. M., Schwartz, B. S., Pando, M. J., Jarjoura, J., York, V. A., Houchins, J. P., Miller, S., Kang, S.-M., Norris, P. J., Nixon, D. F., & Lanier, L. L. (2011). Expansion of a unique CD57^{+}NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(36), 14725-14732. https://doi.org/10.1073/pnas.1110900108

Loupy, A., & Lefaucheur, C. (2018). Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *New England Journal of Medicine*, *379*(12), 1150-1160. https://doi.org/10.1056/NEJMra1802677

Lynch, Goldberg, G. L., Chidgey, A., Van den Brink, M. R. M., Boyd, R., & Sempowski, G. D. (2009). Thymic involution and immune reconstitution. *Trends in Immunology*, *30*(7), 366-373. https://doi.org/10.1016/j.it.2009.04.003

Lynch, Michelet, X., Zhang, S., Brennan, P. J., Moseman, A., Lester, C., Besra, G., Vomhof-Dekrey, E. E., Tighe, M., Koay, H.-F., Godfrey, D. I., Leadbetter, E. A., Sant'Angelo, D. B., von Andrian, U., & Brenner, M. B. (2015). Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. *Nature Immunology*, *16*(1), 85-95. https://doi.org/10.1038/ni.3047

Lynch, O'Shea, D., Winter, D. C., Geoghegan, J., Doherty, D. G., & O'Farrelly, C. (2009). Invariant NKT cells and CD1d(+) cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. *European Journal of Immunology*, *39*(7), 1893-1901. https://doi.org/10.1002/eji.200939349

MacKie, R. M., Reid, R., & Junor, B. (2003). Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *New England Journal of Medicine*, *348*(6), 567-568.

Malan Borel, I., Racca, A., Garcia, M. I., Bailat, A., Quiroga, F., Soutullo, A., & Gaite, L. (2003). Gammadelta T cells and interleukin-6 levels could provide information regarding the progression of human renal allograft. *Scandinavian Journal of Immunology*, *58*(1), 99-105. https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2003.01275.x

Martin, F., & Kearney, J. F. (2001). B1 cells : Similarities and differences with other B cell subsets. *Current Opinion in Immunology*, *13*(2), 195-201. https://doi.org/10.1016/s0952-7915(00)00204-1

Martinet, V., Tonon, S., Torres, D., Azouz, A., Nguyen, M., Kohler, A., Flamand, V., Mao, C.-A., Klein, W. H., Leo, O., & Goriely, S. (2015). Type I interferons regulate eomesodermin expression and the development of unconventional memory CD8(+) T cells. *Nature Communications*, *6*, 7089. https://doi.org/10.1038/ncomms8089

Mason, P. D., Robinson, C. M., & Lechler, R. I. (1996). Detection of donor-specific hyporesponsiveness following late failure of human renal allografts. *Kidney International*, *50*(3), 1019-1025. https://doi.org/10.1038/ki.1996.404

Mathis, D., & Benoist, C. (2007). A decade of AIRE. *Nature Reviews. Immunology*, *7*(8), 645-650. https://doi.org/10.1038/nri2136

Maurice, D., Costello, P., Sargent, M., & Treisman, R. (2018). ERK Signaling Controls Innate-like CD8+ T Cell Differentiation via the ELK4 (SAP-1) and ELK1 Transcription Factors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *201*(6), 1681-1691. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800704

Mavers, M., Maas-Bauer, K., & Negrin, R. S. (2017). Invariant Natural Killer T Cells As Suppressors of Graft-versus-Host Disease in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Frontiers in Immunology*, *8*, 900. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00900

Melandri, D., Zlatareva, I., Chaleil, R. A. G., Dart, R. J., Chancellor, A., Nussbaumer, O., Polyakova, O., Roberts, N. A., Wesch, D., Kabelitz, D., Irving, P. M., John, S., Mansour, S., Bates, P. A., Vantourout, P., & Hayday, A. C. (2018). The γδTCR combines innate immunity with adaptive immunity by utilizing spatially distinct regions for agonist selection and antigen responsiveness. *Nature Immunology*, *19*(12), 1352-1365. https://doi.org/10.1038/s41590-018-0253-5

Ménager-Marcq, I., Pomié, C., Romagnoli, P., & van Meerwijk, J. P. M. (2006). CD8+CD28- regulatory T lymphocytes prevent experimental inflammatory bowel disease in mice. *Gastroenterology*, *131*(6), 1775-1785. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.09.008

Merkenschlager, M., Graf, D., Lovatt, M., Bommhardt, U., Zamoyska, R., & Fisher, A. G. (1997). How many thymocytes audition for selection? *The Journal of Experimental Medicine*, *186*(7), 1149-1158. https://doi.org/10.1084/jem.186.7.1149

Michel, J. J., Griffin, P., & Vallejo, A. N. (2016). Functionally Diverse NK-Like T Cells Are Effectors and Predictors of Successful Aging. *Frontiers in Immunology*, *7*, 530. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00530

Mikulkova, Z., Praksova, P., Stourac, P., Bednarik, J., Strajtova, L., Pacasova, R., Belobradkova, J., Dite, P., & Michalek, J. (2010). Numerical defects in CD8+CD28- T-suppressor lymphocyte population in patients with type 1 diabetes mellitus and multiple sclerosis. *Cellular Immunology*, *262*(2), 75-79. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.02.002

Min, H. S., Lee, Y. J., Jeon, Y. K., Kim, E. J., Kang, B. H., Jung, K. C., Chang, C.-H., & Park, S. H. (2011). MHC class II-restricted interaction between thymocytes plays an essential role in the production of innate CD8+ T cells. *Journal of Immunology*, *186*(10), 5749-5757. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002825

Min-Oo, G., Kamimura, Y., Hendricks, D. W., Nabekura, T., & Lanier, L. L. (2013). Natural killer cells : Walking three paths down memory lane. *Trends in Immunology*, *34*(6), 251-258. https://doi.org/10.1016/j.it.2013.02.005

Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M. D., & Kaveri, S. V. (2004). Cutting edge : Human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *172*(8), 4676-4680. https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.8.4676

Miyaji, C., Watanabe, H., Minagawa, M., Toma, H., Kawamura, T., Nohara, Y., Nozaki, H., Sato, Y., & Abo, T. (1997). Numerical and functional characteristics of lymphocyte subsets in centenarians. *Journal of Clinical Immunology*, *17*(5), 420-429. https://doi.org/10.1023/a:1027324626199

Mogilenko, D. A., Shpynov, O., Andhey, P. S., Arthur, L., Swain, A., Esaulova, E., Brioschi, S., Shchukina, I., Kerndl, M., Bambouskova, M., Yao, Z., Laha, A., Zaitsev, K., Burdess, S., Gillfilan, S., Stewart, S. A., Colonna, M., & Artyomov, M. N. (2021). Comprehensive Profiling of an Aging Immune System Reveals Clonal GZMK+ CD8+ T Cells as Conserved Hallmark of Inflammaging. *Immunity*, *54*(1), 99-115.e12. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.005

Moody, D. B., Zajonc, D. M., & Wilson, I. A. (2005). Anatomy of CD1-lipid antigen complexes. *Nature Reviews. Immunology*, *5*(5), 387-399. https://doi.org/10.1038/nri1605

Morgan, M. E., Flierman, R., van Duivenvoorde, L. M., Witteveen, H. J., van Ewijk, W., van Laar, J. M., de Vries, R. R. P., & Toes, R. E. M. (2005). Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis and Rheumatism*, *52*(7), 2212-2221. https://doi.org/10.1002/art.21195

Morris, H., DeWolf, S., Robins, H., Sprangers, B., LoCascio, S. A., Shonts, B. A., Kawai, T., Wong, W., Yang, S., Zuber, J., Shen, Y., & Sykes, M. (2015). Tracking donor-reactive T cells : Evidence for clonal deletion in tolerant kidney transplant patients. *Science translational medicine*, *7*(272), 272ra10. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010760

Morteau, O., Blundell, S., Chakera, A., Bennett, S., Christou, C. M., Mason, P. D., Cornall, R. J., & O'Callaghan, C. A. (2010). Renal transplant immunosuppression impairs natural killer cell function in vitro and in vivo. *PloS One*, *5*(10), e13294. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013294

Murphy, W. J., Raziuddin, A., Mason, L., Kumar, V., Bennett, M., & Longo, D. L. (1995). NK cell subsets in the regulation of murine hematopoiesis. I. 5E6+ NK cells promote hematopoietic growth in H-2d strain mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *155*(6), 2911-2917.

Nabel, G. J. (1999). A transformed view of cyclosporine. *Nature*, *397*(6719), 471-472. https://doi.org/10.1038/17207

Nakagawa, H., Wang, L., Cantor, H., & Kim, H.-J. (2018). New Insights Into the Biology of CD8 Regulatory T Cells. *Advances in Immunology*, *140*, 1-20. https://doi.org/10.1016/bs.ai.2018.09.001

Nakamura, K., Kitani, A., & Strober, W. (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *The Journal of Experimental Medicine*, *194*(5), 629-644. https://doi.org/10.1084/jem.194.5.629

Nikolich-Žugich, J., Li, G., Uhrlaub, J. L., Renkema, K. R., & Smithey, M. J. (2012). Age-related changes in CD8 T cell homeostasis and immunity to infection. *Seminars in Immunology*, *24*(5), 356-364. https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.04.009

Nogusa, S., Murasko, D. M., & Gardner, E. M. (2012). Differential effects of stimulatory factors on natural killer cell activities of young and aged mice. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, *67*(9), 947-954. https://doi.org/10.1093/gerona/gls079

Oghumu, S., Terrazas, C. A., Varikuti, S., Kimble, J., Vadia, S., Yu, L., Seveau, S., & Satoskar, A. R. (2015). CXCR3 expression defines a novel subset of innate CD8+ T cells that enhance immunity against bacterial infection and cancer upon stimulation with IL-15. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *29*(3), 1019-1028. https://doi.org/10.1096/fj.14-264507

O'Leary, J. G., Goodarzi, M., Drayton, D. L., & von Andrian, U. H. (2006). T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nature Immunology*, *7*(5), 507-516. https://doi.org/10.1038/ni1332

Orlando, G., Hematti, P., Stratta, R. J., Burke, G. W., Di Cocco, P., Cocco, P. D., Pisani, F., Soker, S., & Wood, K. (2010). Clinical operational tolerance after renal transplantation : Current status and future challenges. *Annals of Surgery*, *252*(6), 915-928. https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181f3efb0

Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., & Lenardo, M. J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation–mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature Immunology*, *8*(12), 1353-1362. https://doi.org/10.1038/ni1536

Panijayanond, P., & Monaco, A. P. (1974). Enhancement of pancreatic islet allograft survival with ALS and donor bone marrow. *Surgical Forum*, *25*(0), 379-381.

Patel, O., Kjer-Nielsen, L., Le Nours, J., Eckle, S. B. G., Birkinshaw, R., Beddoe, T., Corbett, A. J., Liu, L., Miles, J. J., Meehan, B., Reantragoon, R., Sandoval-Romero, M. L., Sullivan, L. C., Brooks, A. G., Chen, Z., Fairlie, D. P., McCluskey, J., & Rossjohn, J.

(2013). Recognition of vitamin B metabolites by mucosal-associated invariant T cells. *Nature Communications*, *4*, 2142. https://doi.org/10.1038/ncomms3142

Paust, S., Blish, C. A., & Reeves, R. K. (2017). Redefining Memory : Building the Case for Adaptive NK Cells. *Journal of Virology*, *91*(20). https://doi.org/10.1128/JVI.00169-17

Pearce, E. L., Mullen, A. C., Martins, G. A., Krawczyk, C. M., Hutchins, A. S., Zediak, V. P., Banica, M., DiCioccio, C. B., Gross, D. A., Mao, C.-A., Shen, H., Cereb, N., Yang, S. Y., Lindsten, T., Rossant, J., Hunter, C. A., & Reiner, S. L. (2003). Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science (New York, N.Y.)*, *302*(5647), 1041-1043. https://doi.org/10.1126/science.1090148

Pearce, E. L., Poffenberger, M. C., Chang, C.-H., & Jones, R. G. (2013). Fueling immunity : Insights into metabolism and lymphocyte function. *Science (New York, N.Y.)*, *342*(6155), 1242454. https://doi.org/10.1126/science.1242454

Pereira, B. I., & Akbar, A. N. (2016). Convergence of Innate and Adaptive Immunity during Human Aging. *Frontiers in Immunology*, *7*, 445. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00445

Pereira, B. I., De Maeyer, R. P. H., Covre, L. P., Nehar-Belaid, D., Lanna, A., Ward, S., Marches, R., Chambers, E. S., Gomes, D. C. O., Riddell, N. E., Maini, M. K., Teixeira, V. H., Janes, S. M., Gilroy, D. W., Larbi, A., Mabbott, N. A., Ucar, D., Kuchel, G. A., Henson, S. M., … Akbar, A. N. (2020). Sestrins induce natural killer function in senescent-like CD8+ T cells. *Nature Immunology*, *21*(6), 684-694. https://doi.org/10.1038/s41590-020-0643-3

Peters, C., Kabelitz, D., & Wesch, D. (2018). Regulatory functions of γδ T cells. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *75*(12), 2125-2135. https://doi.org/10.1007/s00018-018-2788-x

Pietra, B. A., Wiseman, A., Bolwerk, A., Rizeq, M., & Gill, R. G. (2000). CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *The Journal of Clinical Investigation*, *106*(8), 1003-1010. https://doi.org/10.1172/JCI10467

Pita-Lopez, M. L., Ortiz-Lazareno, P. C., Navarro-Meza, M., Santoyo-Telles, F., & Peralta-Zaragoza, O. (2014). CD28-, CD45RA(null/dim) and natural killer-like CD8+ T cells are increased in peripheral blood of women with low-grade cervical lesions. *Cancer Cell International*, *14*(1), 97. https://doi.org/10.1186/s12935-014-0097-5

Prager, I., & Watzl, C. (2019). Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *Journal of Leukocyte Biology*, *105*(6), 1319-1329. https://doi.org/10.1002/JLB.MR0718-269R

Prince, A. L., Kraus, Z., Carty, S. A., Ng, C., Yin, C. C., Jordan, M. S., Schwartzberg, P. L., & Berg, L. J. (2014). Development of innate CD4+ and CD8+ T cells in Itk-deficient mice is regulated by distinct pathways. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *193*(2), 688-699. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302059

Prince, A. L., Yin, C. C., Enos, M. E., Felices, M., & Berg, L. J. (2009). The Tec kinases Itk and Rlk regulate conventional versus innate T-cell development. *Immunological Reviews*, *228*(1), 115-131. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00746.x

Qiu, F., Liu, H., Liang, C.-L., Nie, G. D., & Dai, Z. (2017). A New Immunosuppressive Molecule Emodin Induces both CD4+FoxP3+ and CD8+CD122+ Regulatory T Cells and Suppresses Murine Allograft Rejection. *Frontiers in Immunology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01519

Quinn, K. M., Fox, A., Harland, K. L., Russ, B. E., Li, J., Nguyen, T. H. O., Loh, L., Olshanksy, M., Naeem, H., Tsyganov, K., Wiede, F., Webster, R., Blyth, C., Sng, X. Y. X., Tiganis, T., Powell, D., Doherty, P. C., Turner, S. J., Kedzierska, K., & La

Gruta, N. L. (2018). Age-Related Decline in Primary CD8+ T Cell Responses Is Associated with the Development of Senescence in Virtual Memory CD8+ T Cells. *Cell Reports*, *23*(12), 3512-3524. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.057

Quinn, K. M., Zaloumis, S. G., Cukalac, T., Kan, W.-T., Sng, X. Y. X., Mirams, M., Watson, K. A., McCaw, J. M., Doherty, P. C., Thomas, P. G., Handel, A., & La Gruta, N. L. (2016). Heightened self-reactivity associated with selective survival, but not expansion, of naïve virus-specific CD8+ T cells in aged mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(5), 1333-1338. https://doi.org/10.1073/pnas.1525167113

Reiser, J., & Banerjee, A. (2016). Effector, Memory, and Dysfunctional CD8+ T Cell Fates in the Antitumor Immune Response. *Journal of Immunology Research*, *2016*. https://doi.org/10.1155/2016/8941260

Renkema, K. R., Li, G., Wu, A., Smithey, M. J., & Nikolich-Zugich, J. (2014). Two Separate Defects Affecting True Naive or Virtual Memory T Cell Precursors Combine To Reduce Naive T Cell Responses with Aging. *The Journal of Immunology*, *192*(1), 151-159. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301453

Rigau, M., Ostrouska, S., Fulford, T. S., Johnson, D. N., Woods, K., Ruan, Z., McWilliam, H. E. G., Hudson, C., Tutuka, C., Wheatley, A. K., Kent, S. J., Villadangos, J. A., Pal, B., Kurts, C., Simmonds, J., Pelzing, M., Nash, A. D., Hammet, A., Verhagen, A. M., … Uldrich, A. P. (2020). Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by γδ T cells. *Science (New York, N.Y.)*, *367*(6478). https://doi.org/10.1126/science.aay5516

Rock, E. P., Sibbald, P. R., Davis, M. M., & Chien, Y. H. (1994). CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *The Journal of Experimental Medicine*, *179*(1), 323-328. https://doi.org/10.1084/jem.179.1.323

Rodriguez-Galan, M. C., Reynolds, D., Correa, S. G., Iribarren, P., Watanabe, M., & Young, H. A. (2009). Coexpression of IL-18 strongly attenuates IL-12-induced systemic toxicity through a rapid induction of IL-10 without affecting its antitumor capacity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *183*(1), 740-748. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804166

Romano, M., Fanelli, G., Tan, N., Nova-Lamperti, E., McGregor, R., Lechler, R. I., Lombardi, G., & Scottà, C. (2018). Expanded Regulatory T Cells Induce Alternatively Activated Monocytes With a Reduced Capacity to Expand T Helper-17 Cells. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1625. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01625

Roncador, G., Brown, P. J., Maestre, L., Hue, S., Martínez-Torrecuadrada, J. L., Ling, K.-L., Pratap, S., Toms, C., Fox, B. C., Cerundolo, V., Powrie, F., & Banham, A. H. (2005). Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *European Journal of Immunology*, *35*(6), 1681-1691. https://doi.org/10.1002/eji.200526189

Rossignol, A., Levescot, A., Jacomet, F., Robin, A., Basbous, S., Giraud, C., Roy, L., Guilhot, F., Turhan, A. G., Barra, A., Herbelin, A., & Gombert, J.-M. (2012). Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients : Clinical immunology. *European Journal of Immunology*, *42*(7), 1870-1875. https://doi.org/10.1002/eji.201142043

Roussey-Kesler, Giral, M., Moreau, A., Subra, J.-F., Legendre, C., Noël, C., Pillebout, E., Brouard, S., & Soulillou, J.-P. (2006). Clinical Operational Tolerance after Kidney Transplantation. *American Journal of Transplantation*, *6*(4), 736-746. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01280.x

Rovira, J., Renner, P., Sabet-Baktach, M., Eggenhofer, E., Koehl, G. E., Lantow, M., Lang, S. A., Schlitt, H. J., Campistol, J. M., Geissler, E. K., & Kroemer, A. (2016). Cyclosporine A Inhibits the T-bet-Dependent Antitumor Response of CD8(+) T Cells. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, *16*(4), 1139-1147. https://doi.org/10.1111/ajt.13597

Rudak, P. T., Choi, J., & Haeryfar, S. M. M. (2018). MAIT cell-mediated cytotoxicity : Roles in host defense and therapeutic potentials in infectious diseases and cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, *104*(3), 473-486. https://doi.org/10.1002/JLB.4RI0118-023R

Rudd, B. D., Venturi, V., Li, G., Samadder, P., Ertelt, J. M., Way, S. S., Davenport, M. P., & Nikolich-Žugich, J. (2011). Nonrandom attrition of the naive CD8+ T-cell pool with aging governed by T-cell receptor:pMHC interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(33), 13694-13699. https://doi.org/10.1073/pnas.1107594108

Rydyznski Moderbacher, C., Ramirez, S. I., Dan, J. M., Grifoni, A., Hastie, K. M., Weiskopf, D., Belanger, S., Abbott, R. K., Kim, C., Choi, J., Kato, Y., Crotty, E. G., Kim, C., Rawlings, S. A., Mateus, J., Tse, L. P. V., Frazier, A., Baric, R., Peters, B., … Crotty, S. (2020). Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*, *183*(4), 996-1012.e19. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.038

Sada-Ovalle, I., Chiba, A., Gonzales, A., Brenner, M. B., & Behar, S. M. (2008). Innate invariant NKT cells recognize Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages, produce interferon-gamma, and kill intracellular bacteria. *PLoS Pathogens*, *4*(12), e1000239. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000239

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *155*(3), 1151-1164.

Saubermann, L. J., Beck, P., De Jong, Y. P., Pitman, R. S., Ryan, M. S., Kim, H. S., Exley, M., Snapper, S., Balk, S. P., Hagen, S. J., Kanauchi, O., Motoki, K., Sakai, T., Terhorst, C., Koezuka, Y., Podolsky, D. K., & Blumberg, R. S. (2000). Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. *Gastroenterology*, *119*(1), 119-128. https://doi.org/10.1053/gast.2000.9114

Savage, Constantinides, M. G., Han, J., Picard, D., Martin, E., Li, B., Lantz, O., & Bendelac, A. (2008). The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity*, *29*(3), 391-403. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.011

Sayegh, M. H., & Carpenter, C. B. (1996). Role of indirect allorecognition in allograft rejection. *International Reviews of Immunology*, *13*(3), 221-229. https://doi.org/10.3109/08830189609061749

Scalapino, K. J., Tang, Q., Bluestone, J. A., Bonyhadi, M. L., & Daikh, D. I. (2006). Suppression of disease in New Zealand Black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *177*(3), 1451-1459. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.3.1451

Schaeffer, E. M., Broussard, C., Debnath, J., Anderson, S., McVicar, D. W., & Schwartzberg, P. L. (2000). Tec family kinases modulate thresholds for thymocyte development and

selection. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*(7), 987-1000. https://doi.org/10.1084/jem.192.7.987

Scheffold, A., Hühn, J., & Höfer, T. (2005). Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity : It takes (IL-)two to tango. *European Journal of Immunology*, *35*(5), 1336-1341. https://doi.org/10.1002/eji.200425887

Schild, H., Mavaddat, N., Litzenberger, C., Ehrich, E. W., Davis, M. M., Bluestone, J. A., Matis, L., Draper, R. K., & Chien, Y. H. (1994). The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. *Cell*, *76*(1), 29-37. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90170-8

Schirmer, M., Goldberger, C., Würzner, R., Duftner, C., Pfeiffer, K.-P., Clausen, J., Neumayr, G., & Falkenbach, A. (2002). Circulating cytotoxic CD8(+) CD28(-) T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Research*, *4*(1), 71-76. https://doi.org/10.1186/ar386

Schlums, H., Cichocki, F., Tesi, B., Theorell, J., Beziat, V., Holmes, T. D., Han, H., Chiang, S. C. C., Foley, B., Mattsson, K., Larsson, S., Schaffer, M., Malmberg, K.-J., Ljunggren, H.-G., Miller, J. S., & Bryceson, Y. T. (2015). Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity*, *42*(3), 443-456. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.008

Schwartz, R. H. (2003). T cell anergy. *Annual Review of Immunology*, *21*, 305-334. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141110

Sckisel, G. D., Tietze, J. K., Zamora, A. E., Hsiao, H.-H., Priest, S. O., Wilkins, D. E. C., Lanier, L. L., Blazar, B. R., Baumgarth, N., & Murphy, W. J. (2014). Influenza infection results in local expansion of memory CD8(+) T cells with antigen non-specific phenotype and function. *Clinical and Experimental Immunology*, *175*(1), 79-91. https://doi.org/10.1111/cei.12186

Scotto, L., Naiyer, A. J., Galluzzo, S., Rossi, P., Manavalan, J. S., Kim-Schulze, S., Fang, J., Favera, R. D., Cortesini, R., & Suciu-Foca, N. (2004). Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells and antigen specific CD4+CD25+ and CD8+CD28- T suppressor cells. *Human Immunology*, *65*(11), 1297-1306. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2004.09.004

Seach, N., Guerri, L., Le Bourhis, L., Mburu, Y., Cui, Y., Bessoles, S., Soudais, C., & Lantz, O. (2013). Double-positive thymocytes select mucosal-associated invariant T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *191*(12), 6002-6009. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301212

Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, *14*(8), e1002533. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533

Seo, N., Tokura, Y., Takigawa, M., & Egawa, K. (1999). Depletion of IL-10- and TGF-beta-producing regulatory gamma delta T cells by administering a daunomycin-conjugated specific monoclonal antibody in early tumor lesions augments the activity of CTLs and NK cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *163*(1), 242-249.

Shapiro, R., Jordan, M. L., Basu, A., Scantlebury, V., Potdar, S., Tan, H. P., Gray, E. A., Randhawa, P. S., Murase, N., Zeevi, A., Demetris, A. J., Woodward, J., Marcos, A., Fung, J. J., & Starzl, T. E. (2003). Kidney transplantation under a tolerogenic regimen of recipient pretreatment and low-dose postoperative immunosuppression with subsequent weaning. *Annals of Surgery*, *238*(4), 520-525; discussion 525-527. https://doi.org/10.1097/01.sla.0000089853.11184.53

Sherston, S. N., Vogt, K., Schlickeiser, S., Sawitzki, B., Harden, P. N., & Wood, K. J. (2014). Demethylation of the TSDR Is a Marker of Squamous Cell Carcinoma in Transplant

Recipients : TSDR Is SCC Marker in KTRs. *American Journal of Transplantation*, *14*(11), 2617-2622. https://doi.org/10.1111/ajt.12899

Shevach, E. M. (1985). The effects of cyclosporin A on the immune system. *Annual Review of Immunology*, *3*, 397-423. https://doi.org/10.1146/annurev.iy.03.040185.002145

Shin, S., El-Diwany, R., Schaffert, S., Adams, E. J., Garcia, K. C., Pereira, P., & Chien, Y.-H. (2005). Antigen recognition determinants of gammadelta T cell receptors. *Science (New York, N.Y.)*, *308*(5719), 252-255. https://doi.org/10.1126/science.1106480

Shouval, D. S., Ouahed, J., Biswas, A., Goettel, J. A., Horwitz, B. H., Klein, C., Muise, A. M., & Snapper, S. B. (2014). Interleukin 10 receptor signaling : Master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans. *Advances in Immunology*, *122*, 177-210. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800267-4.00005-5

Simpson, E. (2006). A historical perspective on immunological privilege. *Immunological Reviews*, *213*, 12-22. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00434.x

Siu, J. H. Y., Surendrakumar, V., Richards, J. A., & Pettigrew, G. J. (2018). T cell Allorecognition Pathways in Solid Organ Transplantation. *Frontiers in Immunology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02548

Sivori, S., Carlomagno, S., Pesce, S., Moretta, A., Vitale, M., & Marcenaro, E. (2014). TLR/NCR/KIR : Which One to Use and When? *Frontiers in Immunology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00105

Slifka, M. K., Pagarigan, R. R., & Whitton, J. L. (2000). NK markers are expressed on a high percentage of virus-specific CD8+ and CD4+ T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *164*(4), 2009-2015. https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.4.2009

Song, Q., Ren, J., Zhou, X., Wang, X., Song, G., Hobeika, A., Yuan, Y., & Lyerly, H. K. (2018). Circulating CD8+CD28- suppressor T cells tied to poorer prognosis among metastatic breast cancer patients receiving adoptive T-cell therapy : A cohort study. *Cytotherapy*, *20*(1), 126-133. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.08.018

Sosinowski, T., White, J. T., Cross, E. W., Haluszczak, C., Marrack, P., Gapin, L., & Kedl, R. M. (2013). CD8α+ dendritic cell trans presentation of IL-15 to naive CD8+ T cells produces antigen-inexperienced T cells in the periphery with memory phenotype and function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *190*(5), 1936-1947. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203149

Spencer, C. T., Abate, G., Sakala, I. G., Xia, M., Truscott, S. M., Eickhoff, C. S., Linn, R., Blazevic, A., Metkar, S. S., Peng, G., Froelich, C. J., & Hoft, D. F. (2013). Granzyme A produced by γ(9)δ(2) T cells induces human macrophages to inhibit growth of an intracellular pathogen. *PLoS Pathogens*, *9*(1), e1003119. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003119

Starzl, T. E., Murase, N., Abu-Elmagd, K., Gray, E. A., Shapiro, R., Eghtesad, B., Corry, R. J., Jordan, M. L., Fontes, P., Gayowski, T., Bond, G., Scantlebury, V. P., Potdar, S., Randhawa, P., Wu, T., Zeevi, A., Nalesnik, M. A., Woodward, J., Marcos, A., … Fung, J. J. (2003). Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. *Lancet (London, England)*, *361*(9368), 1502-1510. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13175-3

Stepkowski, S. M. (2000). Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *2*(4), 1-23. https://doi.org/10.1017/S1462399400001769

Strober, S., Benike, C., Krishnaswamy, S., Engleman, E. G., & Grumet, F. C. (2000). Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs : Studies of chimerism and anti-donor reactivity.

Transplantation, *69*(8), 1549-1554. https://doi.org/10.1097/00007890-200004270-00005

Sugimoto, T., Stewart, S., & Guan, K. L. (1997). The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin is the major Elk-1 phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(47), 29415-29418. https://doi.org/10.1074/jbc.272.47.29415

Suliman, S., Geldenhuys, H., Johnson, J. L., Hughes, J. E., Smit, E., Murphy, M., Toefy, A., Lerumo, L., Hopley, C., Pienaar, B., Chheng, P., Nemes, E., Hoft, D. F., Hanekom, W. A., Boom, W. H., Hatherill, M., & Scriba, T. J. (2016). Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Revaccination of Adults with Latent Mycobacterium tuberculosis Infection Induces Long-Lived BCG-Reactive NK Cell Responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *197*(4), 1100-1110. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501996

Sullivan, L. C., Shaw, E. M., Stankovic, S., Snell, G. I., Brooks, A. G., & Westall, G. P. (2019). The complex existence of γδ T cells following transplantation : The good, the bad and the simply confusing. *Clinical & Translational Immunology*, *8*(9), e1078. https://doi.org/10.1002/cti2.1078

Sun, Beilke, J. N., & Lanier, L. L. (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*, *457*(7229), 557-561. https://doi.org/10.1038/nature07665

Swanson, S. J., Hale, D. A., Mannon, R. B., Kleiner, D. E., Cendales, L. C., Chamberlain, C. E., Polly, S. M., Harlan, D. M., & Kirk, A. D. (2002). Kidney transplantation with rabbit antithymocyte globulin induction and sirolimus monotherapy. *Lancet (London, England)*, *360*(9346), 1662-1664. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11606-0

Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., & Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells : Induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International Immunology*, *10*(12), 1969-1980. https://doi.org/10.1093/intimm/10.12.1969

Tarazona, R., DelaRosa, O., Alonso, C., Ostos, B., Espejo, J., Peña, J., & Solana, R. (2000). Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, *121*(1-3), 77-88. https://doi.org/10.1016/s0047-6374(00)00199-8

Tarbell, K. V., Petit, L., Zuo, X., Toy, P., Luo, X., Mqadmi, A., Yang, H., Suthanthiran, M., Mojsov, S., & Steinman, R. M. (2007). Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+ CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *204*(1), 191-201. https://doi.org/10.1084/jem.20061631

Terpstra, M. L., Remmerswaal, E. B. M., van der Bom-Baylon, N. D., Sinnige, M. J., Kers, J., van Aalderen, M. C., Geerlings, S. E., & Bemelman, F. J. (2020). Tissue-resident mucosal-associated invariant T (MAIT) cells in the human kidney represent a functionally distinct subset. *European Journal of Immunology*, *50*(11), 1783-1797. https://doi.org/10.1002/eji.202048644

Thierry, A., Lemeur, Y., Ecotière, L., Abou-Ayache, R., Etienne, I., Laurent, C., Vuiblet, V., Colosio, C., Bouvier, N., Aldigier, J.-C., Rerolle, J.-P., Javaugue, V., Gand, E., Bridoux, F., Essig, M., Hurault de Ligny, B., & Touchard, G. (2016). Minimization of maintenance immunosuppressive therapy after renal transplantation comparing cyclosporine A/azathioprine or cyclosporine A/mycophenolate mofetil bitherapy to cyclosporine A monotherapy : A 10-year postrandomization follow-up study. *Transplant International*, *29*(1), 23-33. https://doi.org/10.1111/tri.12627

Thornton, & Shevach, E. M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of Experimental Medicine*, *188*(2), 287-296. https://doi.org/10.1084/jem.188.2.287

Tiemessen, M. M., Jagger, A. L., Evans, H. G., van Herwijnen, M. J. C., John, S., & Taams, L. S. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(49), 19446-19451. https://doi.org/10.1073/pnas.0706832104

Tieppo, P., Papadopoulou, M., Gatti, D., McGovern, N., Chan, J. K. Y., Gosselin, F., Goetgeluk, G., Weening, K., Ma, L., Dauby, N., Cogan, A., Donner, C., Ginhoux, F., Vandekerckhove, B., & Vermijlen, D. (2020). The human fetal thymus generates invariant effector γδ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *217*(3). https://doi.org/10.1084/jem.20190580

Tietze, J. K., Wilkins, D. E. C., Sckisel, G. D., Bouchlaka, M. N., Alderson, K. L., Weiss, J. M., Ames, E., Bruhn, K. W., Craft, N., Wiltrout, R. H., Longo, D. L., Lanier, L. L., Blazar, B. R., Redelman, D., & Murphy, W. J. (2012). Delineation of antigen-specific and antigen-nonspecific CD8(+) memory T-cell responses after cytokine-based cancer immunotherapy. *Blood*, *119*(13), 3073-3083. https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-369736

Tilly, G., Doan-Ngoc, T.-M., Yap, M., Caristan, A., Jacquemont, L., Danger, R., Cadoux, M., Bruneau, S., Giral, M., Guerif, P., Nicol, B., Garcia, A., Laplaud, D.-A., Brouard, S., Pecqueur Hellman, C., & Degauque, N. (2017). IL-15 Harnesses Pro-inflammatory Function of TEMRA CD8 in Kidney-Transplant Recipients. *Frontiers in Immunology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00778

Vacher-Coponat, H., Brunet, C., Moal, V., Loundou, A., Bonnet, E., Lyonnet, L., Ravet, S., Sampol-Manos, E., Sampol, J., Berland, Y., George, F. D., & Paul, P. (2006). Tacrolimus/Mycophenolate Mofetil Improved Natural Killer Lymphocyte Reconstitution One Year After Kidney Transplant by Reference to Cyclosporine/Azathioprine. *Transplantation*, *82*(4), 558-566. https://doi.org/10.1097/01.tp.0000229390.01369.4a

Vahl, J. C., Heger, K., Knies, N., Hein, M. Y., Boon, L., Yagita, H., Polic, B., & Schmidt-Supprian, M. (2013). NKT cell-TCR expression activates conventional T cells in vivo, but is largely dispensable for mature NKT cell biology. *PLoS Biology*, *11*(6), e1001589. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001589

Vallejo, A. N., Mueller, R. G., Hamel, D. L., Way, A., Dvergsten, J. A., Griffin, P., & Newman, A. B. (2011). Expansions of NK-like αβT cells with chronologic aging : Novel lymphocyte effectors that compensate for functional deficits of conventional NK cells and T cells. *Ageing Research Reviews*, *10*(3), 354-361. https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.09.006

van de Berg, Yong, S. L., Koch, S. D., Lardy, N., van Donselaar-van der Pant, K. A. M. I., Florquin, S., Bemelman, F. J., van Lier, R. A. W., & ten Berge, I. J. M. (2012). Characteristics of alloreactive T cells measured before renal transplantation. *Clinical and Experimental Immunology*, *168*(2), 241-250. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04551.x

van den Boorn, J. G., Jakobs, C., Hagen, C., Renn, M., Luiten, R. M., Melief, C. J. M., Tüting, T., Garbi, N., Hartmann, G., & Hornung, V. (2016). Inflammasome-Dependent Induction of Adaptive NK Cell Memory. *Immunity*, *44*(6), 1406-1421. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.008

van der Veken, L. T., Diez Campelo, M., van der Hoorn, M. A. W. G., Hagedoorn, R. S., van Egmond, H. M. E., van Bergen, J., Willemze, R., Falkenburg, J. H. F., & Heemskerk, M. H. M. (2009). Functional analysis of killer Ig-like receptor-expressing cytomegalovirus-specific CD8+ T cells. *Journal of Immunology*, *182*(1), 92-101. https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.1.92

van der Windt, G. J. W., O'Sullivan, D., Everts, B., Huang, S. C.-C., Buck, M. D., Curtis, J. D., Chang, C.-H., Smith, A. M., Ai, T., Faubert, B., Jones, R. G., Pearce, E. J., & Pearce, E. L. (2013). CD8 memory T cells have a bioenergetic advantage that underlies their rapid recall ability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(35), 14336-14341. https://doi.org/10.1073/pnas.1221740110

Van Kaer, L. (2005). alpha-Galactosylceramide therapy for autoimmune diseases : Prospects and obstacles. *Nature Reviews. Immunology*, *5*(1), 31-42. https://doi.org/10.1038/nri1531

Van Parijs, L., Ibraghimov, A., & Abbas, A. K. (1996). The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity*, *4*(3), 321-328. https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80440-9

van Besouw, N. M., Zuijderwijk, J. M., Vaessen, L. M. B., Balk, A. H. M. M., Maat, A. P. W. M., van der Meide, P. H., & Weimar, W. (2005). The direct and indirect allogeneic presentation pathway during acute rejection after human cardiac transplantation. *Clinical and Experimental Immunology*, *141*(3), 534-540. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02871.x

van Stijn, A., Rowshani, A. T., Yong, S. L., Baas, F., Roosnek, E., ten Berge, I. J. M., & van Lier, R. A. W. (2008). Human cytomegalovirus infection induces a rapid and sustained change in the expression of NK cell receptors on CD8+ T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *180*(7), 4550-4560. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4550

Vantourout, P., Laing, A., Woodward, M. J., Zlatareva, I., Apolonia, L., Jones, A. W., Snijders, A. P., Malim, M. H., & Hayday, A. C. (2018). Heteromeric interactions regulate butyrophilin (BTN) and BTN-like molecules governing γδ T cell biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(5), 1039-1044. https://doi.org/10.1073/pnas.1701237115

van Wilgenburg, B., Scherwitzl, I., Hutchinson, E. C., Leng, T., Kurioka, A., Kulicke, C., de Lara, C., Cole, S., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., Malasit, P., Young, D., Denney, L., STOP-HCV consortium, Moore, M. D., Fabris, P., Giordani, M. T., Oo, Y. H., Laidlaw, S. M., … Klenerman, P. (2016). MAIT cells are activated during human viral infections. *Nature Communications*, *7*, 11653. https://doi.org/10.1038/ncomms11653

Ventre, E., Brinza, L., Schicklin, S., Mafille, J., Coupet, C.-A., Marçais, A., Djebali, S., Jubin, V., Walzer, T., & Marvel, J. (2012). Negative regulation of NKG2D expression by IL-4 in memory CD8 T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *189*(7), 3480-3489. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102954

Verykokakis, M., Boos, M. D., Bendelac, A., & Kee, B. L. (2010). SAP protein-dependent natural killer T-like cells regulate the development of CD8(+) T cells with innate lymphocyte characteristics. *Immunity*, *33*(2), 203-215. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.07.013

Waaga, A. M., Chandraker, A., Spadafora-Ferreira, M., Iyengar, A. R., Khoury, S. J., Carpenter, C. B., & Sayegh, M. H. (1998). Mechanisms of indirect allorecognition : Characterization of MHC class II allopeptide-specific T helper cell clones from

animals undergoing acute allograft rejection. *Transplantation*, *65*(7), 876-883. https://doi.org/10.1097/00007890-199804150-00004

Waggoner, S. N., Cornberg, M., Selin, L. K., & Welsh, R. M. (2011). Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. *Nature*, *481*(7381), 394-398. https://doi.org/10.1038/nature10624

Wai, L.-E., Fujiki, M., Takeda, S., Martinez, O. M., & Krams, S. M. (2008). Rapamycin, But Not Cyclosporine or FK506, Alters Natural Killer Cell Function. *Transplantation*, *85*(1), 145-149. https://doi.org/10.1097/01.tp.0000296817.28053.7b

Wang, H., Grzywacz, B., Sukovich, D., McCullar, V., Cao, Q., Lee, A. B., Blazar, B. R., Cornfield, D. N., Miller, J. S., & Verneris, M. R. (2007). The unexpected effect of cyclosporin A on CD56+CD16- and CD56+CD16+ natural killer cell subpopulations. *Blood*, *110*(5), 1530-1539. https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-048173

Warren, H. S., Rana, P. M., Rieger, D. T., Hewitt, K. A., Dahlstrom, J. E., & Kent, A. L. (2006). CD8 T cells expressing killer Ig-like receptors and NKG2A are present in cord blood and express a more naïve phenotype than their counterparts in adult blood. *Journal of Leukocyte Biology*, *79*(6), 1252-1259. https://doi.org/10.1189/jlb.0905536

Watanabe, K., Suzuki, S., Kamei, M., Toji, S., Kawase, T., Takahashi, T., Kuzushima, K., & Akatsuka, Y. (2008). CD137-guided isolation and expansion of antigen-specific CD8 cells for potential use in adoptive immunotherapy. *International Journal of Hematology*, *88*(3), 311-320. https://doi.org/10.1007/s12185-008-0134-z

Weinreich, M. A., Odumade, O. A., Jameson, S. C., & Hogquist, K. A. (2010). T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8+ T cells. *Nature Immunology*, *11*(8), 709-716. https://doi.org/10.1038/ni.1898

Weirather, J., Hofmann, U. D. W., Beyersdorf, N., Ramos, G. C., Vogel, B., Frey, A., Ertl, G., Kerkau, T., & Frantz, S. (2014). Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circulation Research*, *115*(1), 55-67. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303895

Wekerle, T., Kurtz, J., Sayegh, M., Ito, H., Wells, A., Bensinger, S., Shaffer, J., Turka, L., & Sykes, M. (2001). Peripheral deletion after bone marrow transplantation with costimulatory blockade has features of both activation-induced cell death and passive cell death. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *166*(4), 2311-2316. https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.4.2311

Weltevrede, M., Eilers, R., de Melker, H. E., & van Baarle, D. (2016). Cytomegalovirus persistence and T-cell immunosenescence in people aged fifty and older : A systematic review. *Experimental Gerontology*, *77*, 87-95. https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.02.005

White, J. T., Cross, E. W., Burchill, M. A., Danhorn, T., McCarter, M. D., Rosen, H. R., O'Connor, B., & Kedl, R. M. (2016). Virtual memory T cells develop and mediate bystander protective immunity in an IL-15-dependent manner. *Nature Communications*, *7*, 11291. https://doi.org/10.1038/ncomms11291

Wildin, R. S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.-L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., Dagna Bricarelli, F., Byrne, G., McEuen, M., Proll, S., Appleby, M., & Brunkow, M. E. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature Genetics*, *27*(1), 18-20. https://doi.org/10.1038/83707

Willcox, C. R., Pitard, V., Netzer, S., Couzi, L., Salim, M., Silberzahn, T., Moreau, J.-F., Hayday, A. C., Willcox, B. E., & Déchanet-Merville, J. (2012). Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human γδ T cell antigen receptor to

endothelial protein C receptor. *Nature Immunology*, *13*(9), 872-879. https://doi.org/10.1038/ni.2394

Willcox, C. R., Vantourout, P., Salim, M., Zlatareva, I., Melandri, D., Zanardo, L., George, R., Kjaer, S., Jeeves, M., Mohammed, F., Hayday, A. C., & Willcox, B. E. (2019). Butyrophilin-like 3 Directly Binds a Human Vγ4+ T Cell Receptor Using a Modality Distinct from Clonally-Restricted Antigen. *Immunity*, *51*(5), 813-825.e4. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.006

Wolf, B. J., Tatituri, R. V. V., Almeida, C. F., Le Nours, J., Bhowruth, V., Johnson, D., Uldrich, A. P., Hsu, F.-F., Brigl, M., Besra, G. S., Rossjohn, J., Godfrey, D. I., & Brenner, M. B. (2015). Identification of a Potent Microbial Lipid Antigen for Diverse NKT Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *195*(6), 2540-2551. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501019

Xia, N., Jiao, J., Tang, T.-T., Lv, B.-J., Lu, Y.-Z., Wang, K.-J., Zhu, Z.-F., Mao, X.-B., Nie, S.-F., Wang, Q., Tu, X., Xiao, H., Liao, Y.-H., Shi, G.-P., & Cheng, X. (2015). Activated regulatory T-cells attenuate myocardial ischaemia/reperfusion injury through a CD39-dependent mechanism. *Clinical Science (London, England: 1979)*, *128*(10), 679-693. https://doi.org/10.1042/CS20140672

Xu, Grusdat, M., Pandyra, A. A., Polz, R., Huang, J., Sharma, P., Deenen, R., Köhrer, K., Rahbar, R., Diefenbach, A., Gibbert, K., Löhning, M., Höcker, L., Waibler, Z., Häussinger, D., Mak, T. W., Ohashi, P. S., Lang, K. S., & Lang, P. A. (2014). Type I interferon protects antiviral CD8+ T cells from NK cell cytotoxicity. *Immunity*, *40*(6), 949-960. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.004

Xu, Jones, M., Liu, B., Zhu, X., Johnson, C. B., Edwards, A. C., Kong, L., Jeng, E. K., Han, K., Marcus, W. D., Rubinstein, M. P., Rhode, P. R., & Wong, H. C. (2013). Efficacy and mechanism-of-action of a novel superagonist interleukin-15 : Interleukin-15 receptor αSu/Fc fusion complex in syngeneic murine models of multiple myeloma. *Cancer Research*, *73*(10), 3075-3086. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2357

Young, D. A., Lowe, L. D., Booth, S. S., Whitters, M. J., Nicholson, L., Kuchroo, V. K., & Collins, M. (2000). IL-4, IL-10, IL-13, and TGF-beta from an altered peptide ligand-specific Th2 cell clone down-regulate adoptive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *164*(7), 3563-3572. https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3563

Zeng, & Chi, H. (2013). MTOR and lymphocyte metabolism. *Current Opinion in Immunology*, *25*(3), 347-355. https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.05.002

Zeng, Meyer, C., Huang, J., Newell, E. W., Kidd, B. A., Wei, Y.-L., & Chien, Y. (2014). Gamma delta T cells recognize haptens and mount a hapten-specific response. *ELife*, *3*, e03609. https://doi.org/10.7554/eLife.03609

Zhang, Li, L., Feng, K., Fan, D., Xue, W., & Lu, J. (2017). « Repair » Treg Cells in Tissue Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, *43*(6), 2155-2169. https://doi.org/10.1159/000484295

Zhang, Xiangyue, Zheng, P., Prestwood, T. R., Zhang, H., Carmi, Y., Tolentino, L. L., Wu, N., Choi, O., Winer, D. A., Strober, S., Kang, E.-S., Alonso, M. N., & Engleman, E. G. (2020). Human Regulatory Dendritic Cells Develop From Monocytes in Response to Signals From Regulatory and Helper T Cells. *Frontiers in Immunology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01982

Zhang, Xingmin, Koldzic, D. N., Izikson, L., Reddy, J., Nazareno, R. F., Sakaguchi, S., Kuchroo, V. K., & Weiner, H. L. (2004). IL-10 is involved in the suppression of

experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *International Immunology*, *16*(2), 249-256. https://doi.org/10.1093/intimm/dxh029

Zhang, Y., Cheng, G., Xu, Z.-W., Li, Z.-L., Song, C.-J., Li, Q., Chen, L.-H., Yang, K., Yang, A.-G., & Jin, B.-Q. (2013). Down regulation of TRAIL and FasL on NK cells by Cyclosporin A in renal transplantation patients. *Immunology Letters*, *152*(1), 1-7. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.03.002

Zhao, D.-M., Thornton, A. M., DiPaolo, R. J., & Shevach, E. M. (2006). Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*, *107*(10), 3925-3932. https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4502

Zhou, Appleton, S. E., Stadnyk, A., Lee, T. D. G., & Nashan, B. A. P. (2008). CD8+ gammadelta T regulatory cells mediate kidney allograft prolongation after oral exposure to alloantigen. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, *21*(7), 679-687. https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2008.00669.x

Zhou, P., Hwang, K. W., Palucki, D., Kim, O., Newell, K. A., Fu, Y.-X., & Alegre, M.-L. (2003). Secondary lymphoid organs are important but not absolutely required for allograft responses. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, *3*(3), 259-266. https://doi.org/10.1034/j.1600-6143.2003.00067.x

Zhou, Yu, S., Zhao, D.-M., Harty, J. T., Badovinac, V. P., & Xue, H.-H. (2010). Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity*, *33*(2), 229-240. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.002

Zuber, J., & Sykes, M. (2017). Mechanisms of Mixed Chimerism-Based Transplant Tolerance. *Trends in Immunology*, *38*(11), 829-843. https://doi.org/10.1016/j.it.2017.07.008

Résumé

Les lymphocytes T (LT) CD8 innés sont une population de LT non conventionnels récemment décrits dans le laboratoire. On les qualifie de « non conventionnels » car ils possèdent des caractéristiques de l'immunité acquise (facteur de transcription Eomesodermine et phénotype T mémoire) mais aussi de l'immunité innée (récepteurs des cellules NK, réponse à une stimulation cytokinique de type inné). Les fonctions de ces cellules sont encore peu connues, même s'il existe un faisceau d'argument en faveur de leur implication dans l'immunité anti-infectieuse et anti-tumorale.

Il a été décrit que l'immuno-sénescence et/ou la stimulation antigénique chronique (induite par exemple par les infections virales chroniques au cytomégalovirus ou CMV) entraîne(nt) l'expression de marqueurs NK par les LT. Ce phénotype se rapproche donc de celui de nos cellules d'intérêt. Pour étudier l'effet de la stimulation antigénique chronique sur le compartiment LT CD8, et spécialement sa composante innée, nous avons choisi comme modèle la transplantation d'organe.

Dans ce domaine, la recherche s'intéresse aux populations immunitaires susceptibles de jouer un rôle dans la tolérance ou le rejet du greffon. Parmi elles, les LT CD8 innés méritent une attention spéciale, ceci du fait de leurs fonctions innées effectrices/cytotoxiques. Nous avons présumé leur (re)programmation par la stimulation antigénique chronique (du greffon et/ou virale) pendant la transplantation. Cette hypothèse a été testée à partir d'une cohorte de patients transplantés rénaux depuis plus de dix ans, sous traitement immunosuppresseur minimisé (ciclosporine A (CsA) en monothérapie), en l'absence de signe clinico-biologique de rejet.

Notre travail a d'abord permis de révéler dans les LT CD8 innés issus des donneurs sains (DS) un phénotype sénescent accentué (fréquence de cellules CD27(-)CD28(-) augmentée) que les LT CD8 conventionnels. En outre, la fréquence de cette population T innée, contrairement aux LT CD8 conventionnels, ne corrélait pas avec l'âge.

Dans la cohorte de patients transplantés, nous avons observé une augmentation de la fréquence des LT CD8 innés, accompagnée d'un phénotype sénescent et effecteur terminal (CD45RA(+)CCR7(-)) exacerbé, comparativement aux cellules des DS. Les patients présentant une sérologie positive pour le CMV avaient un phénotype sénescent accru par rapport aux patients présentant une sérologie négative.

En altérant la signalisation du TCR, le traitement immunosuppresseur CsA pourrait faciliter la (re)programmation des LT CD8 en faveur de leur versant inné. En accord avec cette hypothèse, une modélisation *in vitro* des effets de la CsA sur les LT CD8 provenant de DS en présence d'une stimulation du TCR et d'IL-15 a permis de documenter une augmentation du pool de LT CD8 innés au détriment du pool de LT naïfs, laquelle est accompagnée d'une valorisation de leurs fonctions (production innée d'IFN-γ).

A l'inverse, chez les patients, les LT CD8 innés étaient dysfonctionnels, avec une production innée d'IFN-γ diminuée qui pourrait résulter de leur expression membranaire diminuée du récepteur de l'IL-15, cytokine indispensable aux LT CD8 innés. Ce dysfonctionnement, qui ne peut être attribué à un programme d'exhaustion ni être relié à un antécédent de cancer, pose la question du rôle de la stimulation allo-spécifique chronique.

De façon générale, ce travail suggère que le contexte d'allogreffe rénale entraîne une reprogrammation et un phénotype de type « vieillissement » des LT CD8 innés, liés au moins en partie au traitement immunosuppresseur. Cette hypothèse devra être confortée par une analyse fine de l'allo-spécificité des LT CD8 innés dirigée contre le greffon.