



HAL
open science

Anomalies de la mémoire lymphocytaire T antivirale et infections virales en transplantation rénale

Manon Dekeyser

► **To cite this version:**

Manon Dekeyser. Anomalies de la mémoire lymphocytaire T antivirale et infections virales en transplantation rénale. Immunité adaptative. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS065 . tel-03146297

HAL Id: tel-03146297

<https://theses.hal.science/tel-03146297>

Submitted on 19 Feb 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Anomalies De La Mémoire Lymphocytaire T Antivirale Et Infections Virales En Transplantation Rénale

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université PARIS SUD

École doctorale n°569
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué
Spécialité de doctorat : Immunologie

Thèse présentée et soutenue à Le Kremlin Bicêtre,
le 18 Février 2019, par

Manon DEKEYSER

Composition du Jury :

Mr Pierre BOBE	PU (Université Paris Sud)	Président
Mme Guislaine CARCELAIN	PU-PH (Université Paris Diderot)	Rapporteur
Mr Gilles BLANCHO	PU-PH (Université de Nantes)	Rapporteur
Mr Denis GLOTZ	PU-PH (Université Paris Diderot)	Examineur
Mr Christophe LEGENDRE	PU-PH (Université Paris Descartes)	Examineur
Mr Yassine TAOUFIK	MCU-PH (Université Paris Sud)	Co-Directeur de thèse
Mr Antoine DURRBACH	PU-PH (Université Paris Sud)	Co-Directeur de thèse

Table des matières

Table des figures et tableaux	8
Table des annexes	9
Remerciements	10
Abréviations.....	12
Contexte et enjeux du travail de thèse	15
Introduction.....	16
Partie 1 - Immunologie Fondamentale : La Réponse Immune.....	17
1 La réponse immune, coopération entre immunité acquise et immunité innée	17
2 La mise en place de la réponse lymphocytaire T effectrice primaire	18
2.1 Les lymphocytes T naïfs	18
2.2 Rencontre antigénique et mise en place de la réponse lymphocytaire T.....	19
2.3 Activation lymphocytaire T et expansion clonale	20
2.3.1 <i>Signal 1 ou « synapse immunologique »</i> :.....	21
2.3.2 <i>Signal 2 ou « signal de costimulation »</i> :.....	22
2.3.3 <i>Signal 3 ou « signal de différenciation »</i> :.....	24
2.4 Différenciation lymphocytaire T CD4 : les lymphocytes T CD4 auxiliaires « <i>helpers</i> ».....	24
2.4.1 <i>Lymphocytes T CD4 T_H1</i>	25
2.4.2 <i>Lymphocytes T CD4 T_H2</i>	26
2.4.3 <i>Lymphocytes T CD4 T_H17</i>	26
2.4.4 <i>Lymphocytes T CD4 T_{FH}</i>	26
2.4.5 <i>Lymphocytes T CD4 régulateurs</i>	27
2.4.6 <i>Temporalité de la différenciation lymphocytaire T CD4</i>	27
2.5 Différenciation lymphocytaire T CD8 : les lymphocytes T CD8 effecteurs cytotoxiques	28
2.6 Migration des lymphocytes T effecteurs vers les foyers infectieux	28
2.7 Fonctions effectrices des lymphocytes T effecteurs	30
2.7.1 <i>Sécrétions de cytokines et de chimiokines</i>	30

2.7.2	<i>Cytotoxicité des lymphocytes T CD8</i>	32
2.8	Régulation négative de la réponse immune cellulaire.....	33
2.8.1	<i>Phase de contraction clonale des lymphocytes T effecteurs</i>	33
2.8.2	<i>Récepteurs inhibiteurs de la superfamille CD28</i>	33
2.8.3	<i>Rôle des LT régulateurs</i>	36
3	La mise en place de la réponse lymphocytaire T mémoire.....	37
3.1	Génération et maintien de la réponse lymphocytaire T mémoire.....	37
3.1.1	<i>Modèles de différenciation lymphocytaire</i>	38
	<i>Le modèle de différenciation linéaire</i>	38
	<i>Le modèle de différenciation asymétrique</i>	40
3.1.2	<i>Régulation transcriptionnelle</i>	41
	<i>Le couple antagoniste T-bet et EOMES</i>	41
	<i>FOXO1</i>	41
	<i>Le couple antagoniste BLIMP1/BCL-6</i>	42
	<i>La voie mTOR</i>	42
	<i>Autres facteurs de transcription</i>	42
3.1.3	<i>Implication des Lymphocytes T CD4 auxiliaires « helpers » dans la génération et maintien de la réponse mémoire lymphocytaire T CD8</i>	43
	<i>Rôle de l'interaction CD40-CD40L</i>	45
3.1.4	<i>Environnement cytokinique</i>	46
3.2	Propriétés fonctionnelles de l'immunité mémoire.....	47
3.3	Hétérogénéité des différentes sous-populations de lymphocytes T mémoires...48	
3.3.1	<i>Les cellules souches mémoires T (T_{SCM})</i>	49
3.3.2	<i>Les lymphocytes T centraux mémoires (T_{CM})</i>	49
3.3.3	<i>Les lymphocytes T effecteurs mémoires (T_{EM})</i>	49
3.3.4	<i>Les lymphocytes T effecteurs terminaux (T_{EMRA} ou T_{ET})</i>	50
3.3.5	<i>Les lymphocytes T résidents mémoires (T_{RM})</i>	50
3.4	Lien entre phénotype et fonctionnalité lymphocytaire.....	51
4	Anomalies fonctionnelles de la réponse mémoire et infections virales chroniques...53	

4.1	Signature fonctionnelle de la réponse lymphocytaire T mémoire antivirale	53
4.2	Délétion clonale T	55
4.3	Epuisement lymphocytaire T	55
4.4	Anergie lymphocytaire.....	59
Partie 2 - Immunologie Appliquée : La Transplantation Rénale.....		61
1	La transplantation rénale, un enjeu de santé publique	61
1.1	Epidémiologie.....	61
1.2	Histoire de la transplantation rénale	63
2	Reconnaissance allogénique et rejets d'allogreffe.....	63
2.1	Le mode de reconnaissance direct.....	65
2.2	Le mode de reconnaissance indirect.....	65
2.3	Le mode de reconnaissance semi-directe	66
2.4	Rejets d'allogreffe.....	68
3	Traitements immunosuppresseurs et mécanismes d'inhibition lymphocytaire	69
3.1	Traitement immunosuppresseur d'induction	70
3.1.1	<i>Anticorps polyclonaux anti-lymphocytaires.....</i>	<i>70</i>
3.1.2	<i>Inhibiteurs sélectifs du récepteur de haute affinité de l'IL-2 (anti-CD25)..</i>	<i>70</i>
3.2	Traitement immunosuppresseur d'entretien	71
3.2.1	<i>Les corticostéroïdes.....</i>	<i>71</i>
3.2.2	<i>Les inhibiteurs de la Calcineurine.....</i>	<i>71</i>
3.2.3	<i>Les inhibiteurs de la synthèse des bases puriques</i>	<i>72</i>
3.2.4	<i>Les inhibiteurs de la voie mTor</i>	<i>72</i>
3.3	Nouveaux traitements immunosuppresseurs	73
3.3.1	<i>Inhibiteur du second signal d'activation lymphocytaire</i>	<i>73</i>
3.3.2	<i>Autres traitements en cours de développement.....</i>	<i>74</i>
4	Complications infectieuses en transplantation rénale	76
4.1	Chronologie des infections, une épidémiologie particulière.....	76
4.2	Cas particulier des réactivations virales par défaut d'immuno-surveillance	78

4.2.1	<i>Les herpes virus humains</i>	78
	<i>Classification et structure virale</i>	78
	<i>Le Cytomégalo­virus (CMV)</i>	80
	<i>Épidémiologie, mode de transmission et physiopathologie</i>	80
	<i>Cycle de réplication virale</i>	80
	<i>Réponse immu­ne cellulaire spécifique du CMV chez le sujet immunocompé­tent</i>	81
	<i>Le CMV en transplan­ta­tion rénale : ges­tion du ris­que infec­tieux</i>	82
	<i>Le virus Epstein Barr (EBV)</i>	85
	<i>Épidémiologie, mode de transmission et physiopathologie</i>	85
	<i>Cycle de réplication virale</i>	85
	<i>Réponse immu­ne cellulaire spécifique de l'EBV chez le sujet immunocompé­tent</i>	86
	<i>L'EBV en transplan­ta­tion rénale : ges­tion du ris­que de lymphoprolifé­ration post-greffe</i>	87
4.2.2	<i>Les polyomavirus humains</i>	88
	<i>Classification, physiopathologie et structure virale</i>	88
	<i>Épidémiologie et mode de transmission</i>	90
	<i>Cycle de réplication virale</i>	91
	<i>Réponse immu­ne cellulaire spécifique des polyomavirus chez le sujet immunocompé­tent</i>	92
	<i>Complications des polyomavirus en situation d'immunosuppression</i>	93
	<i>Le virus BK et ris­que de néphropathie à BK-v : ges­tion du ris­que infec­tieux</i>	94
	<i>Le virus JC et ris­que de leuco-encé­phalopathie multifocale progressive</i>	103
5	<i>Surveillance immu­no-virologique du patient transplan­té rénal</i>	106
	Hypothese et objectifs du travail de these	109
	Résultats	111

Partie 1 - Evaluation du BK-v et des LT spécifiques du BK-v en transplantation rénale : résultats de l'étude MeTyK.....	113
Partie 2 - Méthode d'évaluation du risque individuel de Nx BK-v : brevet FR1855342	143
Partie 3 - Evaluation du JC-v et des LT spécifiques du JC-v en transplantation rénale	145
Discussion et perspectives	151
Partie 1 - Quelle est l'implication des lymphocytes T mémoires spécifiques du BK-v et les mécanismes physiopathologiques suspectés sur le risque de Nx BK-v ?.....	152
Partie 2 - Quel est l'impact des incompatibilités HLA sur le risque de Nx BK-v ? ...	156
Partie 3 - Y a-t-il des biomarqueurs individuels d'évaluation du risque de Nx BK-v chez un patient transplanté rénal ?.....	158
Partie 4 - Est-il possible de restaurer les capacités fonctionnelles des LT spécifiques du BK-v et de contrôler le risque de Nx BK-v ?	161
Conclusion.....	164
Annexes	166
Bibliographie	191

Table des figures et tableaux

FIGURE 1 : MISE EN PLACE DE L'IMMUNITE ADAPTATIVE LORS DE LA RENCONTRE AVEC UN ANTIGENE SPECIFIQUE (D'APRES (WHERRY ET AHMED 2004) - N: LT NAÏFS, E: LT EFFECTEURS, MEMORY: LT MEMOIRES).....	20
FIGURE 2 : ACTIVATION DES LT NAÏFS: ROLE DES 3 SIGNAUX D'ACTIVATION LYMPHOCYTAIRE (D'APRES (KAPSENBERG 2003))	21
FIGURE 3 : DIFFERENCIATION LYMPHOCYTAIRE ET FONCTIONS EFFECTRICES DES LT CD4 HELPERS (D'APRES (SWAIN, MCKINSTRY, ET STRUTT 2012))	25
FIGURE 4 : IDENTIFICATION DES PRINCIPAUX RECEPTEURS ACTIVATEURS ET INHIBITEURS DE LA SUPERFAMILLE CD28 (D'APRES (L. CHEN ET FLIES 2013))	34
FIGURE 5 : IMPLICATION DES RECEPTEURS ACTIVATEURS ET INHIBITEURS DE LA SUPERFAMILLE CD28 DANS LE CYCLE D'ACTIVATION LYMPHOCYTAIRE (D'APRES (L. CHEN ET FLIES 2013)).....	35
FIGURE 6 : GENERATION ET MAINTIEN DE LA REPOSE MEMOIRE LYMPHOCYTAIRE T SELON LE MODELE DE DIFFERENCIATION LINEAIRE (D'APRES (AHMED ET AL. 2009)).....	39
FIGURE 7 : GENERATION ET MAINTIEN DE LA REPOSE MEMOIRE LYMPHOCYTAIRE T SELON LE MODELE DE DIFFERENCIATION ASYMETRIQUE (D'APRES (ARSENIO, METZ, ET CHANG 2015)).....	40
FIGURE 8 : REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE ENTRAINANT DES DESTINS LYMPHOCYTAIRES DIFFERENTS (D'APRES (KALLIES 2008))	43
FIGURE 9 : AIDE LYMPHOCYTAIRE MEDIEE PAR LES LYMPHOCYTES T CD4 AU DEVELOPPEMENT ET AU MAINTIEN DE LA REPOSE T CD8 MEMOIRE (D'APRES (KAECH ET AHMED 2003))	45
FIGURE 10 : IMPLICATION DES CYTOKINES DANS L'ELABORATION ET LE MAINTIEN DE L'IMMUNITE T EFFECTRICE PRIMAIRE ET DE L'IMMUNITE MEMOIRE (D'APRES (SCHLUNS ET LEFRANÇOIS 2003)).....	47
FIGURE 11 : LIEN ENTRE PHENOTYPE ET FONCTIONNALITE LYMPHOCYTAIRE (D'APRES (RESTIFO ET GATTINONI 2013))	52
FIGURE 12 : INFECTIONS VIRALES ET ALTERATION DE LA FONCTIONNALITE LYMPHOCYTAIRE DEPENDANTE DE LA CHARGE ANTIGENIQUE (D'APRES (SEDER, DARRAH, ET ROEDERER 2008)).....	54
FIGURE 13 : COMPARAISON ENTRE UNE REPOSE LYMPHOCYTAIRE T MEMOIRE FONCTIONNELLE GENERE DANS LE CADRE DES INFECTIONS VIRALES AIGUES ET UN EPUISEMENT FONCTIONNEL DES LT ANTIVIRAUX GENERES DANS LE CADRE DES INFECTIONS VIRALES CHRONIQUES (D'APRES (WHERRY ET KURACHI 2015))	58
FIGURE 14 : DYNAMIQUE D'EVOLUTION DES INSCRIPTIONS SUR LISTE D'ATTENTE ET DES CAS DE TRANSPLANTATIONS RENALES ENTRE 1969 ET 2015 (D'APRES (EUROTRANSPLANT INTERNATIONAL FOUNDATION 2016))	62
FIGURE 15 : ALLORECONNAISSANCE D'UN GREFFON RENAL PAR LE SYSTEME IMMUNITAIRE DU RECEVEUR CONDUISANT A L'ELABORATION D'UNE REPOSE T EFFECTRICE ALLO-IMMUNE (D'APRES (HALLORAN 2004)).....	64
FIGURE 16 : MODES DE RECONNAISSANCE ALLOGENIQUE IMPLIQUES DANS L'INITIATION DE LA REPOSE IMMUNE DU RECEVEUR CONTRE L'ORGANE TRANSPLANTE (D'APRES (S. JIANG, HERRERA, ET LECHLER 2004))	67
FIGURE 17 : TRAITEMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS COURAMMENT UTILISES EN TRANSPLANTATION RENALE ET LEURS MECANISMES SPECIFIQUES D'INHIBITION LYMPHOCYTAIRE (D'APRES (HALLORAN 2004))	75
FIGURE 18 : CHRONOLOGIE DE SURVENUE DES INFECTIONS EN POST-TRANSPLANTATION (D'APRES (J. FISHMAN 2007)).....	77
FIGURE 19 : CLASSIFICATION DES HERPESVIRUS ET STRUCTURE DES VIRIONS (D'APRES (CROUGH ET KHANNA 2009)).....	79
FIGURE 20 : REACTIVATION VIRALE ET EFFETS DIRECTS ET INDIRECTS D'UNE INFECTION A CMV EN TRANSPLANTATION RENALE (D'APRES (KOTTON ET FISHMAN 2005)).....	83

FIGURE 21 : STRUCTURE GENOMIQUE ET REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES POLYOMAVIRUS HUMAINS (D'APRES (DALIANIS ET HIRSCH 2013) ET VIRALZONE.EXPAZY.ORG).....	89
FIGURE 22 : FREQUENCE DE REACTIVATION DU BK-V APRES TRANSPLANTATION RENALE EN TERMES DE VIRURIE, DE VIREMIE A BK-V ISOLEE, DE NX BK-V ET DE DYSFONCTION CHRONIQUE/PERTE DE GREFFONS RENAUX	95
FIGURE 23 : APPROCHE ACTUELLE DE LA NX BK-V, BASEE SUR L'EVALUATION DE LA CHARGE VIRALE SANGUINE DU BK-V ET SUR LA BIOPSIE DU GREFFON RENAL.	96
FIGURE 24 : LESIONS HISTOLOGIQUES SPECIFIQUES OBSERVEES DANS LA NX BK-V	98
FIGURE 25 : SURVEILLANCE IMMUNO-VIROLOGIQUE COMME OUTIL PERMETTANT D'EVALUER INDIVIDUELLEMENT LE RISQUE DE REACTIVATIONS VIRALES (D'APRES (SESTER ET AL. 2016))	107
FIGURE 26 : METHODE BIOLOGIQUE NON-INVASIVE D'EVALUATION DU RISQUE INDIVIDUEL DE NX BK-V BASEE SUR LA COMBINAISON DE BIOMARQUEURS INDEPENDANTS	143
FIGURE 27 : INDEX DE STRATIFICATION DE RISQUE DE NX BK-V OBTENU A PARTIR DE LA METHODE NEPHROVIR.....	144
FIGURE 28 : FLOW CHART DE L'ETUDE MELTYK.....	184
FIGURE 29 : PROTOCOLE EXPERIMENTAL D'EVALUATION DE LA FONCTIONNALITE LYMPHOCYTAIRE DES LT SPECIFIQUES DU BK-V (ICI, EVALUATION PAR PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE).....	190
TABLEAU 1 : NOMENCLATURE ET FONCTIONS DES PRINCIPALES CYTOKINES PRODUITES PAR LES LT.....	31
TABLEAU 2 : COMPARAISON DES DIFFERENTES FORMES D'ANOMALIES FONCTIONNELLES DE LA REPONSE T MEMOIRE	60
TABLEAU 3 : SEROPREVALENCE DES POLYOMAVIRUS HUMAINS A TRAVERS LE MONDE DANS LA POPULATION ADULTE.....	90
TABLEAU 4 : PERFORMANCES DE PREDICTION DU RISQUE DE NX BK-V EN FONCTION DE LA PCR BK-V SANGUINE QUANTITATIVE.....	97
TABLEAU 5 : STADES HISTOLOGIQUES DE LA NX BK-V ET PRONOSTIC RENAL ASSOCIE A L'ATTEINTE HISTOLOGIQUE	99
TABLEAU 6 : PROTOCOLES DE MINIMISATION DE L'IMMUNOSUPPRESSION COURAMMENT UTILISES DANS LA LITTERATURE.....	100
TABLEAU 7 : FACTEURS DE RISQUES DE NX BK-V	101

Table des annexes

ANNEXE 1 : DEKEYSER M., FRANÇOIS H., BEAUDREUIL S. AND DURRBACH A. (2015) POLYOMAVIRUS-SPECIFIC CELLULAR IMMUNITY: FROM BK-VIRUS-SPECIFIC CELLULAR IMMUNITY TO BK-VIRUS-ASSOCIATED NEPHROPATHY? FRONT. IMMUNOL. 6:307	167
ANNEXE 2 : DEKEYSER M., LADRIERE M., AUDONNET S., FRIMAT L. AND DE CARVALHO BITTENCOURT M. (2017) AN EARLY IMMEDIATE EARLY PROTEIN IE-1-SPECIFIC T-CELL POLYFUNCTIONALITY IS ASSOCIATED WITH A BETTER CONTROL OF CYTOMEGALOVIRUS REACTIVATION IN KIDNEY TRANSPLANTATION. KIDNEY INTERNATIONAL REPORTS. 2, 486-492.....	175
ANNEXE 3 : MATERIEL ET METHODES SUPPLEMENTAIRES	183

Remerciements

Je tiens à remercier vivement les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner ce travail et de l'enrichir par leurs connaissances, le Professeur Pierre BOBE pour avoir accepté la présidence de ce jury, les Professeurs Guislaine CARCELAIN et Gilles BLANCHO pour avoir accepté d'évaluer mon travail en qualité de rapporteurs, et les Professeurs Denis GLOTZ et Christophe LEGENDRE pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie très sincèrement le Docteur Yassine TAOUFIK et le Professeur Antoine DURRBACH de m'avoir accueillie dans leurs équipes, pour leurs soutiens et leurs encadrements tout au long de cette thèse. Je tiens à leurs exprimer ma reconnaissance pour leurs rigueurs, leurs exigences et leurs précisions scientifiques. Merci pour vos conseils éclairés, votre patience et votre gentillesse à mon égard.

Je tiens à remercier, très chaleureusement, les Docteurs Marie-Ghislaine de Goër de Herve et Houria CHAVEZ pour leurs aides concernant la réalisation des différentes techniques de laboratoire, leurs encadrements précieux, leurs conseils et leurs suivis attentifs. Je les remercie toutes 2 vivement pour la disponibilité, la gentillesse, et l'amitié qu'elles m'ont accordées.

Mes remerciements vont également à tous les membres du laboratoire U1184 pour leur accueil, leur bonne humeur et l'ambiance conviviale que nous avons partagé. Je tiens à remercier les Docteurs Camille LECUROUX, Christine BOURGEOIS et Roger LE GRAND pour le soutien et l'aide qu'ils ont pu m'apporter dans la réalisation de ce travail. Un grand merci à Adela, Bineta, Vixra, Elodie, Cyrielle, Salma, Maisa, Juliette, Audrey, Gaétanne, Philippe, Carole, Marie et Abderaouf pour leur amitié. Leur présence, leur soutien et leur bonne humeur m'accompagnent tous les jours au laboratoire.

Un grand merci aux Docteurs Michelle ELIAS, Séverine BEAUDREUIL, Anne GRUNENWALD, Edouard LEFEVRE et tous les autres néphrologues du service ainsi qu'à Mme Marie-Thérèse LEGAUD et tout le personnel infirmier pour leurs aides

précieuses concernant l'inclusion des patients et la collection des échantillons biologiques.

Un grand merci aux patients qui ont acceptés de participer à cette étude en fournissant les échantillons biologiques indispensables à la réalisation de ce travail.

Je remercie également l'INSERM et la SFNDT (Société Francophone de Néphrologie, Dialyse et Transplantation) pour leurs soutiens financiers.

Un grand Merci :

A Kayvan qui m'a aidé et soutenu pendant toute cette aventure que représente la thèse. Je ne saurais suffisamment te remercier pour ton investissement, ta gentillesse et ton cœur aussi profond que l'océan. Nous serons bientôt 3, une nouvelle aventure va commencer qui sera encore plus passionnante.

A mes parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée durant toutes mes années d'études. Je leur exprime tout mon amour et ma reconnaissance.

A ma famille et à mes amis pour leur présence, leur optimisme réconfortant et leur encouragement.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Abréviations

7-AAD : 7-Aminoactinomycin D

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

Bcl-2 : B-Cell Lymphoma 2

Bcl-6 : B-Cell Lymphoma 6 protein

BK-v : BK-virus

Blimp-1 : B Lymphocyte-Induced Maturation Protein-1

BTLA : B and T Lymphocyte Attenuator

CCL : Ligand des récepteurs aux Chimiokines CC

CCR : Récepteur aux Chimiokines CC

CD : Cluster de Différenciation

CD40L : CD40 Ligand

CEF peptide pool : pool de peptides de Cytomégalovirus, Epstein-Barr et

Influenza virus

CFSE : CarboxyFluoresceine Succimidyl Ester

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CPA : Cellule présentatrice de l'antigène

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Antigen-4

CXCL : Ligand des récepteurs aux Chemokines CXC

CXCR5 : Récepteur aux Chemokines CXC de type 5

EBV : Epstein-Barr Virus

Eomes : Eomesodermin

Fas-L : Fas ligand

FOXO1 : Forkhead box protein O1

FoxP3 : Forkhead box P3

GODT : Global Observatory On Donation And Transplantation

HLA : Human Leucocyte Antigen

HSV : Herpes Simplex Virus
ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1
IE-1 : Immediate Early Protein 1
IFN γ : Interféron- γ
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
JC-v : JC-virus
KLRG-1 : Killer cell Lectin-like Receptor subfamily G member 1
KTR : Patients Transplantés Rénaux
LCMV : Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LEMP : Leuco-Encéphalopathie Multifocale Progressive
LFA-1 : Lymphocyte Function-Associated Antigen 1
LT : Lymphocytes T
LT-Ag : Large-Tumor-Antigen
LTregs : Lymphocytes T Régulateurs
MPEC : Cellules Précurseurs Mémoires
mTOR : mammalian Target of Rapamycin
NCCR : Non Coding Control Region
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells
NF- κ B : Nuclear Factor-Kappa B
Nx BK-v : Néphropathie à BK-virus
PBMC : Cellules Mononuclées du Sang Total
PCR : Polymerase Chain Reaction
PD-1 : Programmed Death-1
pp65 : phosphoprotéine 65
S1P : Sphingosine-1-phosphate
SIDA : Syndrome d'Immuno-Déficiences Acquises
SLEC : Cellules Effectrices de Courte Durée de Vie
T-bet: T-box expressed in T-cells

TCM: Lymphocytes T centraux mémoires
TCR : T-cell receptor
TEM: Lymphocytes T effecteurs mémoires
TET ou TEMRA: Lymphocytes T effecteurs terminaux
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
Th: T Helper
Tim-3 : T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3
TNF α : Tumor Necrosis Factor- α
TRAIL: Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TRM: Lymphocytes T Résident Mémoires
TSCM: Cellules Souches Mémoires T
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VHB/C: Virus de l'hépatite B/C
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VLA-4 : Very Late Antigen de type 4
VP1 : Viral Protein 1

CONTEXTE ET ENJEUX DU TRAVAIL DE THESE

La transplantation rénale constitue le traitement le plus efficace de l'insuffisance rénale chronique terminale, en termes de survie et de qualité de vie des patients, avec un coût financier moindre. Du fait de la pénurie d'organe actuelle en transplantation, il est nécessaire d'accroître la durée de vie des greffons rénaux actuellement estimée à 13 ans. L'immunosuppression thérapeutique est ainsi indispensable pour contrôler la réponse immune allogénique et augmenter la survie des greffons.

L'immunosuppression thérapeutique est associée à des complications, notamment infectieuses. Les réactivations à *Polyomavirus*, BK-virus et JC-virus, sont des complications majeures en transplantation rénale, responsables de néphropathie à BK-v (Nx BK-v) et de leuco-encéphalopathie multifocale progressive (LEMP). Sans thérapeutique antivirale spécifique, ces infections virales mènent à la perte du rein transplanté ou au décès du patient. Le seul traitement actuellement reconnu est l'allègement de l'immunosuppression thérapeutique, exposant secondairement le patient à un risque de rejet d'allogreffe.

Le diagnostic des réactivations à *Polyomavirus* est basé sur un dépistage de la charge virale par PCR suivi d'une confirmation histologique dans le cadre des Nx BK-v ou d'une confirmation radiologique dans le cadre des LEMP. Or, ces marqueurs sont des marqueurs tardifs tandis que l'évolution de ces infections virales dépend de l'étendue des lésions histologiques, elle-même liée à l'intensité de la charge virale. Ainsi, la démarche diagnostique actuelle des réactivations à *Polyomavirus* en transplantation pose le souci d'être source de retards et de difficultés diagnostiques alors que la prise en charge thérapeutique de ces complications doit être la plus précoce possible afin d'éviter la survenue de lésions irréversibles.

Il apparaît donc important de développer de nouveaux outils en transplantation rénale afin de détecter précocement ces réactivations virales, voire de les anticiper, pour mieux tenter de les contrôler. L'altération de la réponse immune est un facteur crucial dans la pathogénie des réactivations à *Polyomavirus*. Ainsi, la caractérisation précise de la fonctionnalité des lymphocytes T spécifiques des *Polyomavirus* humains pourrait ouvrir de futures pistes diagnostiques et/ou thérapeutiques. Elle pourrait permettre de dépister les patients à risques de développer ces complications et pourrait contribuer au développement d'immunothérapies innovantes.

INTRODUCTION

« La science efface l'ignorance d'hier et révèle l'ignorance de demain. »

De David Gros

Partie 1 - Immunologie Fondamentale :

La Réponse Immune

1 La réponse immune, coopération entre immunité acquise et immunité innée

La réponse immune, par l'intermédiaire de l'immunité innée et de l'immunité adaptative, permet d'assurer l'intégrité de l'organisme en éliminant les éléments infectieux ou du soi altéré et en tolérant les éléments nécessaires au maintien de l'intégrité de l'organisme.

L'immunité innée constitue la première barrière de protection de l'organisme. Elle se compose de multiples types cellulaires, tel que les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les polynucléaires neutrophiles/éosinophiles/basophiles, les cellules Natural Killer, les cellules endothéliales, et de protéines tel que le système du complément. Il s'agit d'une réponse très rapide, de spécificité globale aux agressions de l'organisme, sans mise en place de mémoire immune. Les éléments de l'immunité innée reconnaissent des structures partagées par différentes classes de pathogènes (PAMP pour *pathogen-associated molecular pattern*) ou exprimées à la surface des cellules endommagées (DAMP pour *danger-associated molecular pattern*).

L'immunité adaptative assure une protection de l'organisme hautement spécifique. Son activation dépend de l'immunité innée et nécessite une reconnaissance antigénique spécifique. L'immunité cellulaire, médiée par les lymphocytes T (LT), oppose une défense contre les pathogènes intra-cellulaires, tandis que l'immunité humorale, médiée par les lymphocytes B et les plasmocytes, oppose une défense contre les pathogènes extra-cellulaires. Elle se caractérise par l'établissement d'une mémoire immune spécifique, conférant une meilleure efficacité lors d'une exposition ultérieure au même antigène. La mémoire immunologique est ainsi cruciale dans le processus de contrôle des infections chroniques ou persistantes.

2 La mise en place de la réponse lymphocytaire T effectrice primaire

2.1 Les lymphocytes T naïfs

Les LT dérivent des progéniteurs de la lignée myéloïde de la moelle osseuse. Ces progéniteurs lymphocytaires T migrent dans le thymus, où se déroule la sélection des cellules T avec l'acquisition d'un TCR (*T-cell receptor*) unique et spécifique et l'élimination des cellules dotées d'un TCR de spécificité inappropriée. Il en résulte une sélection lymphocytaire thymique stricte, avec la génération d'un pool de LT matures restreints au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), tolérant au soi et de spécificité antigénique restreinte (Klein et al. 2014). En l'absence de rencontre avec leur antigène spécifique, ces LT matures hautement spécifiques (aussi appelés LT naïfs) migrent dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate et tissus lymphoïdes secondaires associées aux muqueuses). Cette migration s'effectue par l'expression membranaire de CD62L (*L-selectin*) et de CCR7 (CD197). L'expression de CD62L à la surface lymphocytaire permet l'adhésion et la progression du LT sur l'endothélium vasculaire, tandis que l'adressage aux organes lymphoïdes secondaires se fait par attraction chimiotactique. Les chimiokines CCL19 et CCL21 sont sécrétées au sein des ganglions lymphatiques et se lient spécifiquement au CCR7. L'expression de CCR7 permet ainsi le recrutement des LT naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires (Masopust et Schenkel 2013).

Les LT naïfs sont ainsi caractérisés par l'expression des marqueurs de différenciation précoce suivants : CD45RA⁺ CD27⁺ CD62L⁺ CCR7⁺. En l'absence de rencontre antigénique spécifique, les LT naïfs circulent continuellement au sein des organes lymphoïdes secondaires (Hwang et al. 2017). Leur survie est assurée par l'interleukine (IL)-7 (Schluns et al. 2000; J. T. Tan et al. 2001) et les interactions avec le CMH du soi (Viret, Wong, et Janeway 1999). L'IL-7 est également impliqué dans le remodelage et l'organisation structurelle des organes lymphoïdes secondaires (Onder et al. 2012).

2.2 Rencontre antigénique et mise en place de la réponse lymphocytaire T

Après l'entrée dans l'organisme et la constitution du foyer infectieux par l'agent pathogène, ce dernier entraîne l'élaboration d'une réponse inflammatoire avec accumulation au sein du site infectieux de phagocytes et autres cellules de l'immunité innée capables d'ingérer et de détruire les agents pathogènes. La capture et l'ingestion du pathogène par les cellules dendritiques immatures entraînent leur maturation en cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Cette maturation permet l'amplification de l'apprêtement antigénique ainsi que l'augmentation de l'expression des molécules du CMH de classes I et II et des molécules de costimulation permettant une optimisation de la présentation antigénique.

Par l'expression membranaire de CCR7, les cellules dendritiques matures provenant de divers sites infectieux migrent vers les organes lymphoïdes secondaires afin d'activer les LT naïfs spécifiques du complexe CMH-peptide antigénique. D'autres cellules sont également capables de présenter efficacement les antigènes et jouent ainsi le rôle de CPA tels que les lymphocytes B matures, les macrophages activés ou les cellules épithéliales activées par des pathogènes.

La réponse lymphocytaire T ainsi induite comporte différentes phases successives :

- l'activation et l'expansion clonale,
- la différenciation en LT effecteurs permettant le contrôle de l'agent pathogène par l'intervention des LT CD4 (recrutement et activation des cellules immunes) et des LT CD8 (infiltration et destruction des agents infectieux),
- la phase de contraction clonale, signant la fin de la réponse primaire. Cette phase est cruciale par la mise en place de la mémoire lymphocytaire T de longue durée de vie (Harty et Badovinac 2008; Williams et Bevan 2007).

La **Figure 1** montre l'élaboration de la réponse lymphocytaire T après la rencontre antigénique.

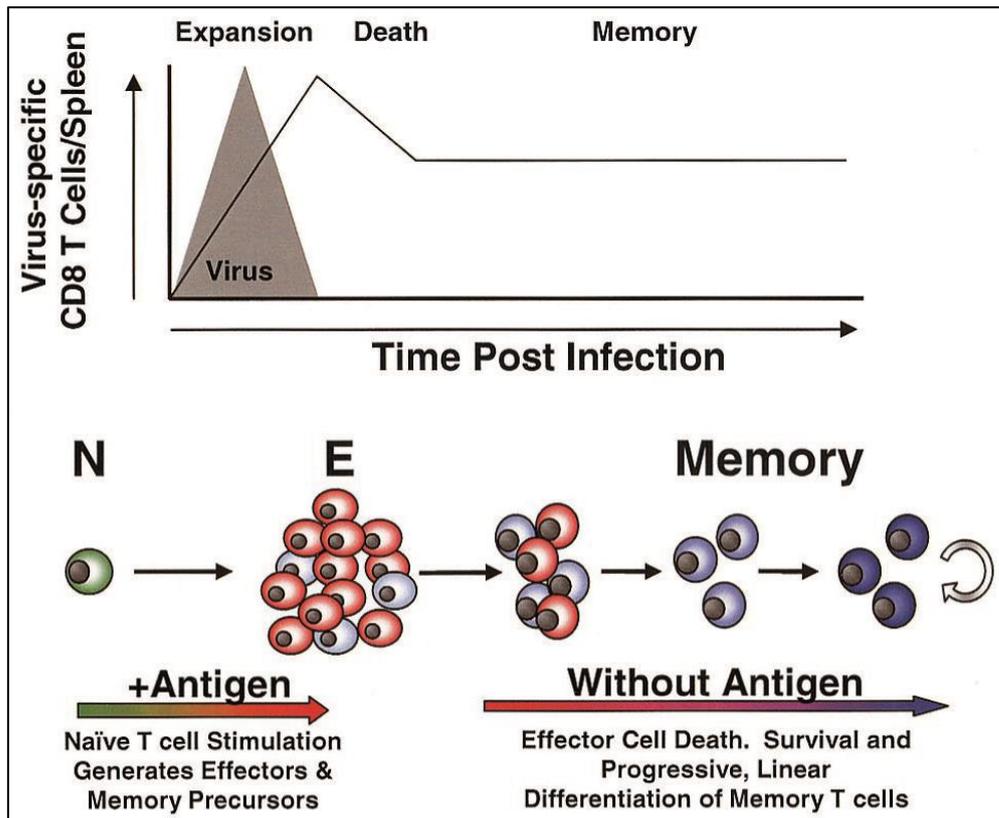


Figure 1 : Mise en place de l'immunité adaptative lors de la rencontre avec un antigène spécifique (d'après (Wherry et Ahmed 2004) - N: LT naïfs, E: LT effecteurs, Memory: LT mémoires)

2.3 Activation lymphocytaire T et expansion clonale

L'activation des LT naïfs par les CPA comprend 3 types de signaux, tous les 3 indispensables à la mise en place d'une réponse cellulaire effective. Le signal 1 correspond à l'interaction du complexe [peptide antigénique - molécule du CMH du soi] avec le TCR. Les signaux additionnels sont des signaux de costimulation impliqués dans la survie et l'expansion lymphocytaire T (signal 2) et des signaux de différenciation entraînant la polarisation des LT en différentes sous-populations de LT effecteurs (signal 3) (Bromley et al. 2001; Bour-Jordan et Blueston 2002; Kapsenberg 2003).

Les 3 signaux nécessaires à l'activation lymphocytaire sont représentés sur la **Figure 2**.

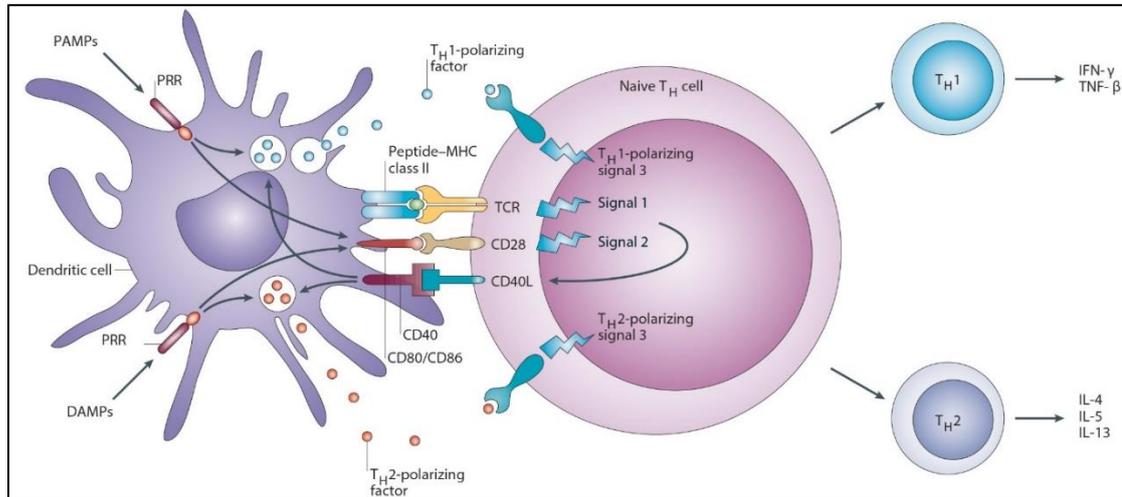


Figure 2 : Activation des LT naïfs: rôle des 3 signaux d'activation lymphocytaire (d'après (Kapsenberg 2003))

2.3.1 Signal 1 ou « synapse immunologique » :

Par l'intermédiaire de son TCR, un LT naïf reconnaît son antigène spécifique sous la forme du complexe [peptide antigénique - molécule du CMH]. Le TCR est une protéine transmembranaire de la super famille des immunoglobulines. Il s'agit d'un hétérodimère formé soit d'une chaîne α et d'une chaîne β unies par un pont disulfure pour les LT $_{\alpha\beta}$ (95 % des LT) ou d'une chaîne γ et d'une chaîne δ pour les LT $_{\gamma\delta}$ (5 % des LT). Par ailleurs, chaque LT exprime à sa surface un complexe moléculaire membranaire CD3, et une des deux molécules CD4 ou CD8. Alors que la reconnaissance antigénique se fait par le TCR, la transmission intracellulaire du signal passe par le complexe CD3.

Ce complexe CD3 est un complexe protéique membranaire appartenant à la super famille des immunoglobulines et constitué de 4 chaînes différentes, une chaîne γ , une δ et deux chaînes ϵ . Ces protéines transmembranaires s'associent avec le TCR et une chaîne ζ pour former le « complexe TCR - CD3 » permettant la transmission complète

du 1^{er} signal d'activation lymphocytaire. La partie intracellulaire des molécules CD3 contient un motif fortement conservé connu sous le nom d'ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Ce motif est essentiel pour la signalisation du TCR. La phosphorylation du motif ITAM sur les chaînes CD3 leur permet de lier l'enzyme ZAP70 (*zeta associated protein*), kinase importante pour la cascade de signalisation des LT (Call et al. 2002).

En plus de la liaison [peptide antigénique - molécule du CMH] à son TCR, les LT établissent des liens supplémentaires avec le CMH afin de stabiliser cette interaction et mettre en place une réponse lymphocytaire optimale. Les protéines CD4 et CD8 exprimées à la surface des LT sont ainsi requises et se lient respectivement aux molécules du CMH de classe II et I. La double spécificité de cette présentation antigénique explique également la restriction au CMH des réponses lymphocytaires T. Ainsi, les LT CD4 reconnaissent des fragments antigéniques longs, de 13 à 25 acides aminés, présentés par des molécules du CMH de classe II. Les LT CD8 sont eux activés par des fragments antigéniques plus courts, de 8 à 10 acides aminés, présentés par des molécules du CMH de classe I. Ces interactions spécifiques [CMH-molécule CD4 ou CD8] agissent comme des corécepteurs stabilisants et amplifiants la réponse lymphocytaire. Ils permettent avec les molécules LFA1 (LT) – ICAM1 (CPA) et CD2 (LT) – LFA3 (CPA) de former la synapse immunologique nécessaire à la transmission du signal intracellulaire (Dustin et Depoil 2011; Irvine et al. 2002). Cette première étape est nécessaire à la pré-activation du LT mais n'est pas suffisante à son activation.

2.3.2 Signal 2 ou « signal de costimulation » :

Ce signal de costimulation fait intervenir la liaison de protéines de surface des CPA (B7-1 ou CD80 et B7-2 ou CD86) au récepteur CD28 exprimé à la surface des LT.

L'engagement du « complexe TCR – CD3 » en présence d'une costimulation CD28/CD80-CD86 induit l'activation de facteurs de transcription, de type NFAT, AP1 et NF- κ B, qui régulent l'activation et la croissance lymphocytaire par la synthèse de

cytokines telle que l'IL-2 (X. Y. Zhou et al. 2002). L'activation de NFAT se fait de façon calcium-dépendante impliquant la calcineurine. Cette dernière est une phosphatase qui déphosphoryle NFAT et permet son passage intranucléaire. NFAT migre alors dans le noyau et participe à la transcription de gènes impliqués dans la régulation du cycle lymphocytaire (Hogan et al. 2003).

La costimulation par CD28 induit également la formation du récepteur de haute affinité pour l'IL-2. Les LT naïfs n'expriment à leur surface que les chaînes $\beta\gamma$ qui constituent un récepteur d'affinité modérée pour l'IL-2. La costimulation par CD28 déclenche la synthèse de la chaîne α (CD25). Son association aux chaînes $\beta\gamma$ permet alors la formation d'un récepteur de haute affinité pour l'IL-2. La production et la liaison de l'IL-2 à son récepteur déclenche alors l'entrée du LT naïf en phase G1 du cycle cellulaire, permettant ainsi la survie et la prolifération lymphocytaire T (Gaffen 2001). Récemment, il a été démontré que l'IL-7 est également impliqué dans l'activation lymphocytaire T en stimulant la production d'IL-2 et de la chaîne α (CD25) du récepteur pour l'IL-2 (Shmarov et al. 2016).

Il s'ensuit une phase de prolifération intense de 5 à 8 jours après l'activation lymphocytaire (Arens et Schoenberger 2010). Cette expansion clonale aboutie à la formation de clones de cellules T effectrices de spécificité antigénique identique. Il a été mis en évidence qu'un LT CD4 spécifique de l'antigène activé génère en moyenne plus de 20 cellules filles. La coopération des signaux dépendants de l'engagement du TCR et de CD28 détermine également le degré de l'expansion clonale primaire en augmentant à la fois la proportion des cellules T en division et le nombre de division cellulaire (Gudmundsdottir, Wells, et Turka 1999). Pendant la phase de prolifération induite par l'IL-2, les LT acquièrent leur phénotype effecteur. Ainsi, chez toutes cellules effectrices, la rencontre ultérieure avec son antigène spécifique déclenchera une réponse immune indépendante de la costimulation. A l'inverse, l'engagement initial du TCR en l'absence de costimulation entraîne une inactivation fonctionnelle des LT à une stimulation ultérieure, appelé aussi anergie lymphocytaire (Fathman et Lineberry 2007).

2.3.3 Signal 3 ou « signal de différenciation » :

Les LT se différencient en plusieurs sous-populations effectrices fonctionnellement différentes selon l'environnement cytokinique auxquelles elles ont été exposées. Ainsi, la polarisation de la différenciation lymphocytaire dépend largement des cytokines produites par les CPA et autres cellules de l'immunité innée (IL-12, IL-21, interférons (IFN) de type I ($\alpha\beta$) ou IFN γ , ...) (Kapsenberg 2003). Si les LT CD8 se différencient assez uniformément en LT effecteurs cytotoxiques, les LT CD4 se différencient en sous-populations effectrices distinctes afin d'orienter spécifiquement la réponse immune au pathogène.

2.4 Différenciation lymphocytaire T CD4 : les lymphocytes T CD4 auxiliaires « *helpers* »

Les LT CD4 naïfs peuvent ainsi se différencier en 5 sous-populations de LT CD4 « *helpers* » : les LT CD4 de type T_h1, T_h2, T_h17, T_h et les LT CD4 régulateurs. Ces sous-populations se distinguent par une production cytokinique spécifique, responsable du recrutement et de l'activation de cellules immunes spécifiques. L'orientation de la différenciation lymphocytaire CD4 dépend en majeure partie du milieu cytokinique produit par les cellules de l'immunité innée en réponse aux pathogènes (J. Zhu, Yamane, et Paul 2010; Fang et Zhu 2017).

La **Figure 3** montre l'orientation de la différenciation lymphocytaire T CD4 en fonction du milieu cytokinique environnant.

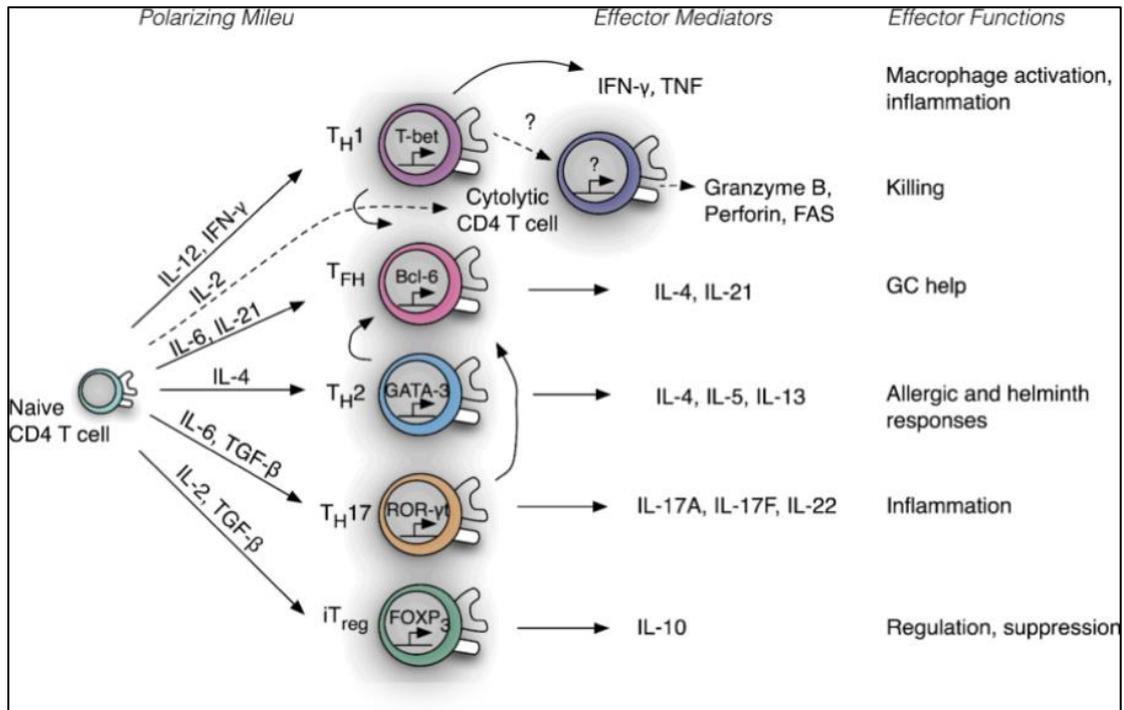


Figure 3 : Différenciation lymphocytaire et fonctions effectrices des LT CD4 helpers (d'après (Swain, McKinstry, et Strutt 2012))

2.4.1 Lymphocytes T CD4 TH1

Les LT CD4 T_{H1} coordonnent la réponse aux pathogènes intra-cellulaires (viral ou bactérien). Les cytokines IL-12 et IFN- γ orientent la différenciation des LT CD4 vers la voie T_{H1} par l'intermédiaire du facteur de transcription T-bet. Les T_{H1} sont indispensables à la formation des LT CD8 effecteurs via la sécrétion d'IL-2, activent les macrophages par la sécrétion d'IFN γ et de TNF α et stimulent l'immunité humorale en aboutissant à la production d'anticorps opsonisants. Les T_{H1} sécrètent également de l'IL-3 et du GM-CSF. Ces cytokines ont pour rôle de stimuler les progéniteurs hématopoïétiques et induisent ainsi la production de polynucléaires neutrophiles et de macrophages (Wan 2010; Iwasaki et Medzhitov 2015).

2.4.2 Lymphocytes T CD4 T_H2

Les LT CD4 T_H2 coordonnent la réponse aux pathogènes extra-cellulaires. La différenciation vers la voie T_H2 est favorisée par l'IL-4 et dépend du facteur de transcription GATA3. Les T_H2 sont impliqués dans la maturation des lymphocytes B en plasmocytes matures via la sécrétion d'IL-4, IL-5 et d'IL-13. Les T_H2 sécrètent également de l'IL-3, de l'IL-5 et du GM-CSF. Cette voie de différenciation permet d'éliminer les pathogènes extracellulaires et les helminthes par la production d'anticorps spécifiques ou par l'action dédiée des polynucléaires éosinophiles. Cette voie est également impliquée dans les manifestations allergiques, via l'activation des mastocytes et des polynucléaires éosinophiles (Wan 2010; Iwasaki et Medzhitov 2015).

2.4.3 Lymphocytes T CD4 T_H17

En présence d'IL6 et de TGF β , les LT CD4 naïfs sont orientés vers la voie T_H17. Les T_H17 sont largement impliqués dans la défense contre les bactéries extracellulaires et les infections fongiques, notamment au niveau cutanéomuqueux. Ils amplifient la réaction inflammatoire aiguë en recrutant précocement des polynucléaires neutrophiles. En effet, les T_H17 sécrètent des cytokines/chimiokines chemo-attractives (IL-17A, IL-17F et IL-22). Ces cytokines stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales endommagées, entraînant ainsi le recrutement des cellules de l'immunité innée au sein du site infectieux (Littman et Rudensky 2010).

2.4.4 Lymphocytes T CD4 T_{FH}

De découverte récente, les LT CD4 T_{FH} sont indispensables à la formation et au maintien des centres germinatifs au sein des organes lymphoïdes secondaires (Crotty 2011). Les cytokines IL-6 et IL-21 orientent la différenciation des LT CD4 vers la voie T_{FH} par l'intermédiaire du facteur de transcription Bcl-6 (Hatzi et al. 2015). Ces T_{FH} expriment le récepteur de chimiokine CXCR5 et migrent ainsi vers les follicules B des organes lymphoïdes secondaires, où elles soutiennent la différenciation et la maturation

des lymphocytes B via la sécrétion d'IL-4 et d'IL-21 (Laurent, Fazilleau, et Brousset 2010). Ces cellules peuvent également sécréter d'autres cytokines comme l'IL-4, l'IFN γ et l'IL-17 qui sont associées respectivement avec les lignées cellulaires T_h2, T_h1 et T_h17 (Yu et al. 2009).

2.4.5 Lymphocytes T CD4 régulateurs

Les LT CD4 régulateurs (LT_{regs}) représentent 5 à 10 % des LT CD4 totaux et sont impliqués dans le contrôle des réactions immunes en assurant la tolérance immunitaire aux antigènes du soi, la prévention des maladies auto-immunes et le contrôle des réactions d'hypersensibilité. Ces cellules se caractérisent par une expression constitutive de CD25, une faible expression de CD127 (sous-unité α du récepteur à l'IL-7) et l'expression du facteur de transcription FoxP3 (Josefowicz, Lu, et Rudensky 2012). Ces cellules exercent une activité immunosuppressive en inhibant l'activation, la prolifération et les fonctions effectrices des LT activés.

Plusieurs mécanismes interviennent, incluant une compétition vis-à-vis de l'IL-2 (phénomène de déprivation d'IL-2), la sécrétion de cytokines inhibitrices tel que l'IL-10 ou le TGF- β , ou une inhibition lymphocytaire par contact cellulaire direct (via l'interaction de molécules inhibitrices comme CTLA-4) ou par cytotoxicité directe (Vignali, Collison, et Workman 2008).

2.4.6 Temporalité de la différenciation lymphocytaire T CD4

Les T_h17 représentent la première sous-population de LT effecteurs générés en réponse à une infection (Fossiez et al. 1996). Une délétion sélective du récepteur de l'IL-17 dans des modèles murins est associée à une surmortalité à 48h d'une infection à *Klebsiella pneumoniae* par un retard de recrutement des polynucléaires neutrophiles sur le site infectieux (Ye et al. 2001). A l'inverse, la différenciation vers les voies T_h1 ou T_h2 se développe durant les stades plus tardifs de l'infection, l'élimination complète du pathogène lors des infections prolongées ou chroniques requérant des activités

effectrices hautement spécialisées (Oth et al. 2014). Les voies T_{h1} ou T_{h17} sont aussi impliquées dans le développement des maladies auto-immunes tandis que la voie T_{h2} est impliquée dans les réactions allergiques. La différenciation lymphocytaire T_{h1} - T_{h2} est mutuellement antagoniste, l'expression de T-bet régulant négativement l'expression de GATA3 et réciproquement. Cependant, une relative plasticité a été mise en évidence au niveau des sous-population T_{h17} et LT_{regs} (L. Zhou, Chong, et Littman 2009).

2.5 Différenciation lymphocytaire T CD8 : les lymphocytes T CD8 effecteurs cytotoxiques

Les LT CD8 sont activés en présence des signaux 1 et 2, prolifèrent et se différencient en LT CD8 effecteurs cytotoxiques sous l'influence des $IFN_{\alpha\beta}$ (Kolumam et al. 2005; Curtsinger et al. 2005) ou de l'IL-21 (Zeng et al. 2005).

Néanmoins, l'activation lymphocytaire T CD8 nécessite une aide supplémentaire apportée par les LT CD4. Les LT CD4 helpers stimulent l'expression des molécules CD80/CD86 et CD40 à la surface des CPA, renforçant ainsi le signal de costimulation. Cette aide à l'activation CD8 peut se faire de façon simultanée, la CPA interagissant en même temps avec un LT CD8 naïf et un LT CD4 T_{h1} ou de façon retardée, la CPA ayant été préalablement stimulée par un LT CD4 T_{h1} .

2.6 Migration des lymphocytes T effecteurs vers les foyers infectieux

L'activation complète et l'expansion clonale d'un LT naïf prend 4 à 5 jours. Les cellules effectrices générées doivent ensuite quitter les ganglions lymphatiques pour gagner le site infectieux grâce à l'acquisition de nouvelles chimiokines et molécules d'adhérence (Krummel, Bartumeus, et Gérard 2016).

Sortie des LT effecteurs des organes lymphoïdes secondaires

Les LT effecteurs quittent les organes lymphoïdes secondaires grâce à la diminution de l'expression des récepteurs de domiciliation lymphatique (CCR7 et CD62L) et l'augmentation de l'expression du récepteur au Sphingosine-1-phosphate (S1P). Les ganglions lymphatiques étant pauvres en S1P, cette concentration augmente au niveau des organes périphériques et permet l'attraction chimiotactique des LT effecteurs. Ceci aboutit à la sortie des lymphocytes des organes lymphoïdes secondaires (Cyster et Schwab 2012).

Migration et entrée des LT effecteurs aux sites inflammatoires

Après l'activation lymphocytaire, les LT CD4 T_H1 et les LT CD8 effecteurs expriment rapidement CXCR3. Ce récepteur de chimiokines a pour ligands CXCL9, CXCL10 et CXCL11, chimiokines largement produites par les cellules endothéliales lors d'une réaction inflammatoire (Groom et Luster 2011). CXCR3 régule la migration et le recrutement des lymphocytes vers les sites infectieux, en induisant l'expression membranaire d'intégrines. L'intégrine VLA-4 est exprimée à la surface lymphocytaire. VLA-4 se lie spécifiquement à la molécule d'adhérence VCAM-1 présente sur les cellules endothéliales activées. L'interaction VLA-4/VCAM-1 permet l'adhésion du LT à l'endothélium vasculaire et sa migration vers le site inflammatoire (Thatte et al. 2003). Les LT effecteurs surexpriment également les molécules d'adhésion lymphocytaire LFA1 et CD2. Ceci induit l'adhésion et l'extravasation lymphocytaire dans les épithéliums cibles (Pribila et al. 2004). L'expression du programme d'adressage des LT effecteurs au site infecté est médiée par le site ganglionnaire d'activation du LT naïf correspondant. Par exemple, une activation lymphocytaire au niveau des ganglions lymphatiques drainant l'intestin aboutit à l'expression de molécules d'adressage des LT effecteurs vers la muqueuse intestinale (intégrine $\alpha 4\beta 7$ et CCR9) (Iwata et al. 2004). Inversement, une activation lymphocytaire au niveau des ganglions lymphatiques drainant la peau aboutit à l'expression de molécules d'adressage des LT effecteurs au niveau cutané (E et P-selectin ligands, CCR4 et CCR10) (Campbell et Butcher 2002).

2.7 Fonctions effectrices des lymphocytes T effecteurs

Toutes les fonctions lymphocytaires effectrices impliquent l'interaction d'un LT effecteur avec une cellule cible de même spécificité antigénique. Le contact initial d'un LT effecteur avec sa cellule cible se fait par l'intermédiaire de molécules d'adhérence non spécifique (LFA-1/ICAM-1 et CD2/CD58). Ce contact est transitoire à moins que le LT effecteur ne reconnaisse son antigène spécifique. Cette liaison est alors renforcée, entraîne la transmigration du lymphocyte à travers la barrière épithéliale et la libération focalisée des molécules effectrices.

2.7.1 Sécrétions de cytokines et de chimiokines

Les LT CD4 effecteurs assurent des fonctions de sécrétions cytokiniques différentes selon leur voie de différenciation lymphocytaire. Les cytokines étant des protéines solubles, elles agissent à la fois localement sur les cellules cibles mais aussi à distance en favorisant le recrutement des cellules immunocompétentes sur le site infecté. Les cytokines ont de multiples effets biologiques tels que l'initiation de la prolifération ou de la différenciation cellulaire, la production de nouvelles cytokines/chimiokines par les cellules immunocompétentes ou encore l'induction d'un état d'apoptose. Les LT CD8 effecteurs exercent des fonctions de sécrétions cytokiniques de type IFN- γ , TNF- γ et lymphotoxine- α . Ces cytokines inhibent directement la réplication virale en induisant l'apoptose des cellules infectées, favorisent le recrutement et l'activation des macrophages sur le site infecté et induisent une augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe I (Harty, Tvinnereim, et White 2000). Ces sécrétions cytokiniques sont indispensables au contrôle des infections virales, indépendamment des activités cytotoxiques des LT CD8 effecteurs (Goulding et al. 2014; Bekker et al. 2001). Des chimiokines sont également co-sécrétées avec l'IFN- γ (CCL3, CCL4 et CCL5). Elles jouent un rôle important de chimio-attraction et d'activation des macrophages en possédant une activité synergique avec l'IFN- γ (Dorner et al. 2002) .

Le Tableau 1 représente les principales cytokines produites par les LT.

Tableau 1 : Nomenclature et fonctions des principales cytokines produites par les LT(d'après (Murphy et Weaver 2017))

Cytokine	Cellule T productrice	Effets sur					Effet de l'inactivation du gène
		Cellules B	Cellules T	Macrophages	Cellules hématopoïétiques	Autres cellules somatiques	
Interleukin-2 (IL-2)	Naïves, T _H 1, certains CD8	Stimule la croissance	Croissance et différenciation	-	Stimule la croissance des cellules NK	-	Empêche le développement des T _{REG}
Interferon-γ (IFN-γ)	T _H 1, CTL	-	Inhibe les voies T _H 2 et T _H 17	Activation, ↑ CMH classes I et II	Active les cellules NK	Activité antivirale, ↑ CMH classes I et II	Susceptibilité aux mycobactéries et à certains virus
Lymphotoxin-α (LT-α, TNF-β)	T _H 1, certains CTL	Inhibition	Cytotoxicité	Activation, Induction de production de NO	Active les neutrophiles	Tue les fibroblastes et les cellules tumorales	Absence de ganglions lymphatiques, Rate déstructurée
Interleukin-4 (IL-4)	T _H 2, T _{FH}	Activation, Induction d'IgG1 et d'IgE ↑ CMH classe II	Croissance, Survie	Activation des macrophages dans la zone marginale	Stimule la croissance des mastocytes	-	Absence de T _H 2
Interleukin-5 (IL-5)	T _H 2	-	-	-	Croissance et différenciation des mastocytes	-	Diminution des éosinophiles
Interleukin-13 (IL-13)	T _H 2	Commutation de classes IgG1 et IgE	-	Macrophages dans la zone marginale	-	Stimule la production de mucus	Altération de la réponse anti-helminthes
Interleukin-17 (IL-17)	T _H 17	-	-	-	Stimule le recrutement des neutrophiles	Stimule la sécrétion de chimiokines par les fibroblastes et les cellules épithéliales	Altération de la réponse anti-bactérienne
Interleukin-22 (IL-22)	T _H 17	-	-	-	-	Stimule la production de peptides antimicrobiens	Altération de la réponse anti-bactérienne
Transforming growth factor-β (TGF-β)	T _{Reg}	Inhibe la croissance Commutation de classes vers IgA	Différenciation T _H 17, Inhibe les voies T _H 1 et T _H 2	Inhibe l'activation	Active les neutrophiles	Inhibe/stimule la croissance cellulaire	Empêche le développement des T _{REG} - Mort à 10 semaines
Interleukin-10 (IL-10)	T _{Reg}	↑ CMH classe II	Inhibe la voie T _H 1	Inhibe la libération de cytokines	Costimule la croissance des mastocytes	-	Maladies inflammatoires de l'intestin
Interleukin-3 (IL-3)	T _H 1, T _H 2, T _H 17, certains CTL	-	-	-	Facteur de croissance pour les cellules progénitrices hématopoïétiques	-	-
Tumor necrosis factor-α (TNF-α)	T _H 1, T _H 17 CTL	-	-	Activation, Induction de production de NO	-	Active l'endothélium microvasculaire	Septicémies à bactéries Gram-négatives
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	T _H 1, T _H 17, certains T _H 2, certains CTL	Différenciation	-	Activation, Différenciation des cellules dendritiques	Stimule la myélopoïèse	-	-

2.7.2 Cytotoxicité des lymphocytes T CD8

Du fait de la réplication intracytoplasmique des infections virales et autres pathogènes intracellulaires, l'élimination des cellules infectées est indispensable au maintien de l'intégrité de l'organisme. Les LT CD8 effecteurs cytotoxiques assurent cette fonction par contact cellulaire direct avec leurs cellules cibles (synapse immune cytotoxique (Dustin et Long 2010)).

L'activité lytique s'exerce par 2 voies principales (Halle, Halle, et Förster 2017) :

- la cytotoxicité directe dépendante de la voie perforines / granzymes : Les LT cytotoxiques libèrent des protéines cytotoxiques préformées et contenues dans les granules sécrétoires nommées perforine et granzyme. Les perforines forment des pores transitoires au niveau de la membrane plasmique de la cellule cible. Ceci permet, soit l'entrée massive de milieu extracellulaire entraînant la nécrose de la cellule cible, soit l'entrée rapide de granzyme au niveau cellulaire qui active la voie des caspases induisant ainsi l'apoptose de la cellule cible (Lopez et al. 2013).
- la cytotoxicité directe dépendante de la voie Fas / Fas-ligand : Les LT cytotoxiques expriment à leur surface le ligand du récepteur Fas, ce récepteur de mort cellulaire étant quant à lui exprimé à la surface des cellules cibles. L'activation du récepteur Fas par son ligand induit l'activation de la voie des caspases (notamment la caspase 8) induisant l'apoptose de la cellule cible.

Ainsi, la fonction cytotoxique des LT CD8 entraîne un signal de mort cellulaire et d'apoptose de la cellule cible (Siegel 2006). Les cellules apoptotiques sont rapidement prises en charge et éliminées par les cellules phagocytaires (dont les macrophages tissulaires). Cette mort cellulaire programmée permet le maintien des particules pathogènes à l'intérieur des corps apoptotiques et la régulation du processus inflammatoire, contrairement à la nécrose cellulaire pro-inflammatoire (Taylor, Cullen, et Martin 2008).

2.8 Régulation négative de la réponse immune cellulaire

Après le contrôle de l'agent pathogène, la réponse immune est régulée négativement afin d'éviter tout dommage tissulaire excessif et maintenir l'homéostasie de l'organisme. Cette régulation de l'activité du système immunitaire permet également de limiter les risques d'auto-immunité ou de syndrome prolifératif pouvant survenir lors de l'accumulation de lymphocytes.

Les mécanismes de contrôle mis en jeu sont de 3 types.

2.8.1 Phase de contraction clonale des lymphocytes T effecteurs

En réponse à l'expansion clonale secondaire à une infection, cette phase de contraction clonale permet l'élimination de près de 90% des LT effecteurs, le pool de LT survivants servant à générer les LT mémoires (Kaech, Wherry, et Ahmed 2002). Les mécanismes d'actions impliquent les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose par l'intermédiaire de l'activation des caspases (Krammer, Arnold, et Lavrik 2007).

L'induction de la mort cellulaire se fait en réponse à 2 facteurs :

- l'activation lymphocytaire aboutissant à l'expression du récepteur de mort cellulaire Fas (*activation-induced cell death* (Arakaki et al. 2014)),
- la déprivation cytokinique (*activated cell autonomous death* (Hildeman et al. 2002)).

Le rôle de la charge antigénique dans l'initiation de la contraction clonale reste débattu. S'il a été démontré que la charge antigénique régule l'induction de la mort cellulaire (une forte charge antigénique empêchant la contraction clonale), la phase de contraction clonale semble néanmoins être un processus concomitant de celui de l'expansion clonale (Garrod et al. 2012).

2.8.2 Récepteurs inhibiteurs de la superfamille CD28

Des récepteurs inhibiteurs appartenant à la superfamille CD28 contribuent également à réguler la réponse immune. L'expression de ces récepteurs inhibiteurs est

fortement corrélée au niveau de différenciation ou d'activation lymphocytaire (Legat et al. 2013). Ces récepteurs comprennent de façon non exhaustive PD-1 (*Programmed Death-1*), CTLA4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*), BTLA (*B and T Lymphocyte Attenuator*) et TIM-3 (*T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3*) (Legat et al. 2013; C. Zhu et al. 2005). CTLA4 se lie de façon spécifique à CD80-86 mais avec une plus grande avidité que CD28 permettant ainsi une compétition entre CD28 et CTLA4. PD-1 se lie spécifiquement à ses ligands PD-L1 (ou B7-H1) et PD-L2 (ou B7-DC) tandis que BTLA se lie à HVEM (*Herpesvirus Entry Mediator*) et TIM-3 à Galectin-9.

La Figure 4 décrit les principaux récepteurs de la superfamille CD28.

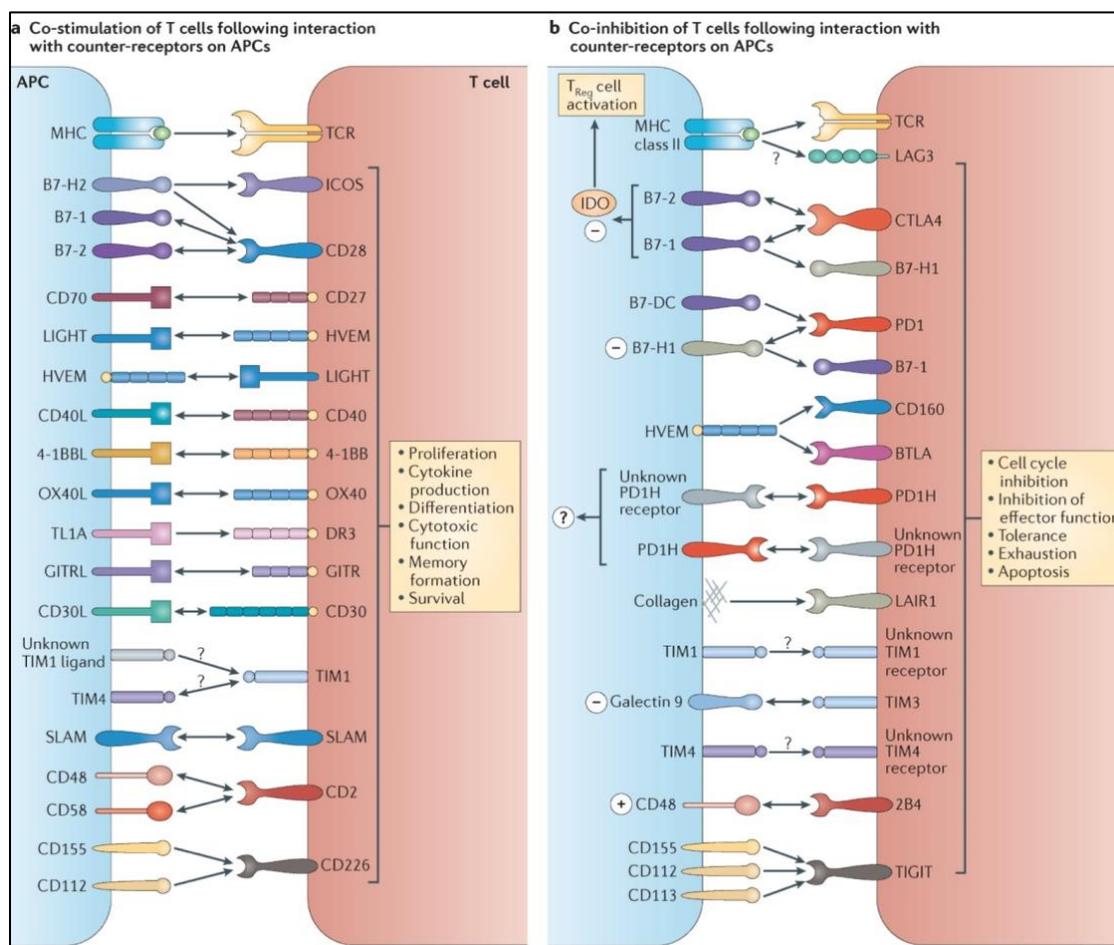


Figure 4 : Identification des principaux récepteurs activateurs et inhibiteurs de la superfamille CD28 (d'après (L. Chen et Flies 2013))

Après l'activation lymphocytaire, les récepteurs inhibiteurs sont exprimés à la surface des LT effecteurs. Leurs engagements entraînent l'inactivation des voies de signalisation impliquées dans l'activation et la survie cellulaire. Il en résulte une diminution des capacités de survie avec diminution des capacités de sécrétions cytokiniques, de prolifération et de différenciation lymphocytaire. Ainsi, l'action de ces récepteurs inhibiteurs est cruciale pour restreindre une réponse immune excessive et prévenir le développement de lésions tissulaires et/ou de maladies auto-immunes.

La **Figure 5** indique les voies de signalisations impliquées dans le cycle d'activation lymphocytaire et les interactions entre les récepteurs activateurs et inhibiteurs de la superfamille CD28 (L. Chen et Flies 2013).

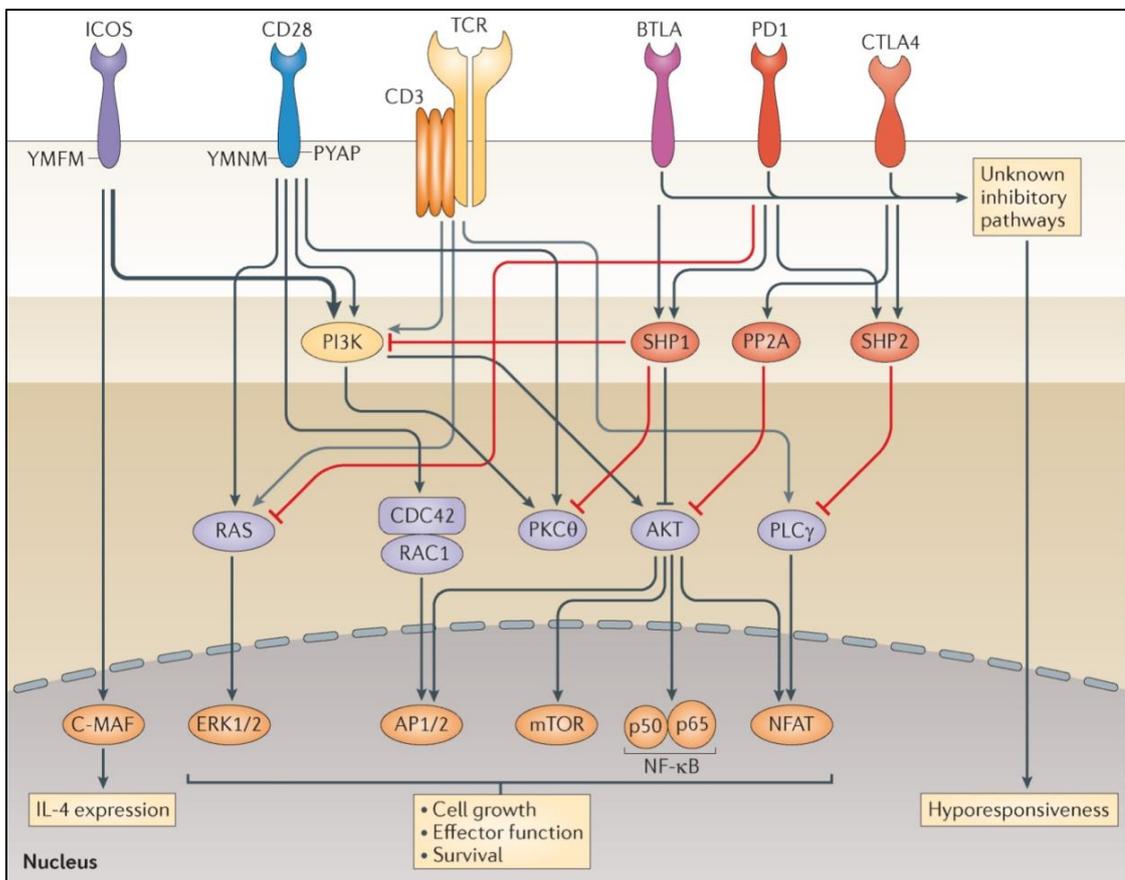


Figure 5 : Implication des récepteurs activateurs et inhibiteurs de la superfamille CD28 dans le cycle d'activation lymphocytaire (d'après (L. Chen et Flies 2013))

2.8.3 Rôle des LT régulateurs

Les LT CD4 régulateurs (LT_{regs}) représentent 5 à 10 % du pool de LT CD4 totaux et peuvent être naturellement générés dans le thymus (nTreg) ou induits en périphérie (iTreg). Ces LT sont caractérisés par l'expression constitutive de CD25 (sous-unité α du récepteur à l'IL-2) et l'expression du facteur de transcription FoxP3. Ils sont dépendant de l'IL-2 pour assurer leur homéostasie et leur fonction immunosuppressive (Antony et al. 2006; Goudy et al. 2011).

Les LT_{regs} exercent leurs fonctions de diverses façons :

- la sécrétion de cytokines inhibitrices telles que l'IL-10, l'IL-35 ou le TGF- β ,
- la capture sélective de l'IL-2 entraînant un phénomène de déprivation cytokinique inhibant l'expansion des LT effecteurs,
- des capacités de cytotoxicité dépendante de la voie perforine-granzyme,
- l'inhibition lymphocytaire par contact cellulaire direct via CTLA-4 (Vignali, Collison, et Workman 2008).

Les LT_{regs} sont indispensables à la mise en place précoce de la réponse CD8 primaire et au maintien des réponses immunitaires mémoires (de Goër de Herve et al. 2012). Ainsi, la déplétion des LT_{regs} au cours d'une infection à *herpesvirus* chez la souris était responsable d'une évolution infectieuse fatale. Cette évolution était marquée par une augmentation de la charge virale, une diminution des quantités d'IFN γ sécrétées et un retard à l'arrivée sur le site infectieux des cellules effectrices. Les LT_{regs} semblaient ainsi permettre le recrutement et l'entrée des cellules immunes au niveau local (Lund et al. 2008). Ces cellules ont également un rôle dans l'induction d'une réponse effectrice primaire de haute avidité et la génération d'une réponse mémoire effective en stabilisant l'interaction CPA/LT naïfs (Pace et al. 2012). Ces cellules régulatrices sont également largement impliquées dans le contrôle des réactions auto-immunes en participant à la tolérance immunitaire des antigènes du soi (Liston et Gray 2014).

3 La mise en place de la réponse lymphocytaire T mémoire

Au-delà du contrôle initial de l'épisode infectieux, l'immunité cellulaire a pour fonction essentielle la mise en place d'une mémoire immunologique de longue durée de vie. Dans le cadre du modèle infectieux de la variole, l'étude de l'immunité anti-virale a mise en évidence la persistance d'une immunité mémoire protectrice 20 à 30 ans après le contact antigénique initial (Hsieh et al. 2004). Si la réponse mémoire de type humorale était stable, la réponse mémoire de type cellulaire déclinait au cours du temps avec une demi-vie évaluée entre 8 et 15 ans (Hammarlund et al. 2010, 2003). Le maintien au long cours d'une immunité mémoire efficace est ainsi crucial à la survie de l'organisme, notamment dans le cadre des infections virales avec persistance du virus à l'état latent (cas des *herpesvirus*, *polyomavirus*, ...).

La différenciation en LT mémoires comprend la formation de populations distinctes, orientées soit vers un potentiel prolifératif assurant la reconstitution de l'immunité mémoire, soit vers un potentiel effecteur assurant une protection rapide et efficace de l'organisme. On dénombre actuellement cinq stades de LT mémoires : les cellules souches mémoires T (T_{SCM}), les LT centraux mémoires (T_{CM}), les LT effecteurs mémoires (T_{EM}), les LT effecteurs terminaux (T_{EMRA} ou T_{ET}) et les LT résidents mémoires (T_{RM}) (*cf infra*).

3.1 Génération et maintien de la réponse lymphocytaire T mémoire

La rencontre avec le pathogène aboutie à l'émergence de deux populations distinctes de LT ayant rencontré l'antigène, les cellules effectrices de courte durée de vie (SLEC, cellules sénescents en phase terminale de différenciation $KLRG1^{high}$ $IL-7Receptor^{low}$) et les cellules précurseurs mémoires (MPEC, cellules $KLRG1^{low}$ $IL-7Receptor^{high}$) (Kaech et Wherry 2007). Au cours de la réponse immune, des cellules précurseurs de l'immunité mémoire sont identifiées très précocement au sein de la population effectrice, par l'expression du récepteur à l'IL-7. Son expression est down-régulé dans les 48 premières heures suivant une infection puis réexprimé au 8^{ème} jour

par une petite population de LT. Ces LT constituent le pool de cellules précurseurs de l'immunité mémoire, ces cellules étant dotées de quantité élevée de molécules anti-apoptotiques et possédant des capacités de renouvellement et de réponse secondaire effective lors d'un contact antigénique ultérieur. Le transfert adoptif de ces cellules aboutit préférentiellement au développement de LT de phénotype mémoire et confère une protection infectieuse à long terme (Kaech et al. 2003). L'expression de la molécule d'adhésion cellulaire CD44 semble jouer un rôle primordial dans l'élaboration de la réponse lymphocytaire T mémoire. Son mécanisme d'action pourrait être d'inhiber l'expression du récepteur de mort cellulaire Fas, permettant une résistance cellulaire à l'apoptose (Mitchell et Williams 2010). Dans un modèle d'infection à *Influenza virus* de souris déficientes pour CD44, la rencontre primaire de l'antigène aboutissait à une réponse CD4 de type T_h1 mais était associée à une impossibilité à générer une réponse lymphocytaire T CD4 mémoire. CD44 assurait ainsi la survie des cellules effectrices de type T_h1 et leur engagement dans la voie de différenciation mémoire en limitant la mort cellulaire médiée par Fas et en activant les voies de signalisation de survie cellulaire (Baaten et al. 2010).

3.1.1 Modèles de différenciation lymphocytaire

Les mécanismes assurant l'élaboration et le maintien de la réponse lymphocytaire T mémoire sont encore débattus. Néanmoins, deux modèles de génération de l'immunité mémoire sont proposés, un modèle de différenciation linéaire et un modèle de différenciation parallèle (Ahmed et al. 2009; Espinosa, Samy, et Kirk 2016) :

Le modèle de différenciation linéaire

Il s'agit d'un modèle linéaire de progression où tous les LT mémoires dérivent des LT effecteurs. Un LT effecteur va s'orienter dans deux voies distinctes de différenciation lymphocytaire : soit en devenant une cellule sénescence de type SLEC destinée à mourir par apoptose, soit en devenant un LT mémoire de type T_{EM}, qui pourra contribuer à maintenir la réponse mémoire de longue durée de vie en générant des T_{CM}

(Wherry, Teichgräber, et al. 2003). L'émergence de cette population de LT mémoires survient au moment de la contraction clonale et persiste après la résolution de l'épisode infectieux initial (Maris et al. 2003). Ainsi, dans un modèle murin permettant de suivre le devenir des LT effecteurs au décours d'une infection primaire, il a été démontré que les LT mémoires répondeurs lors d'un deuxième contact antigénique dérivait de cellules effectrices cytotoxiques générées lors de l'infection primaire (Bannard, Kraman, et Fearon 2009). L'orientation d'un LT effecteur en SLEC ou sa différenciation en LT mémoire dépend de facteurs tels que la durée et la force de l'engagement du TCR ou du milieu cytokinique environnant (Cui et Kaech 2010; Sarkar et al. 2008). Un tel modèle n'est cependant pas entièrement satisfaisant si on prend en considération les capacités de prolifération et de différenciation des LT mémoires, capacités se rapportant plus à celles de cellules indifférenciées. Ce modèle de différenciation linéaire sous-entend ainsi une dédifférenciation de cellules effectrices différenciées vers un phénotype de cellules mémoires multipotentes indifférenciées.

La **Figure 6** représente la génération de la réponse lymphocytaire T mémoire selon le modèle de différenciation linéaire.

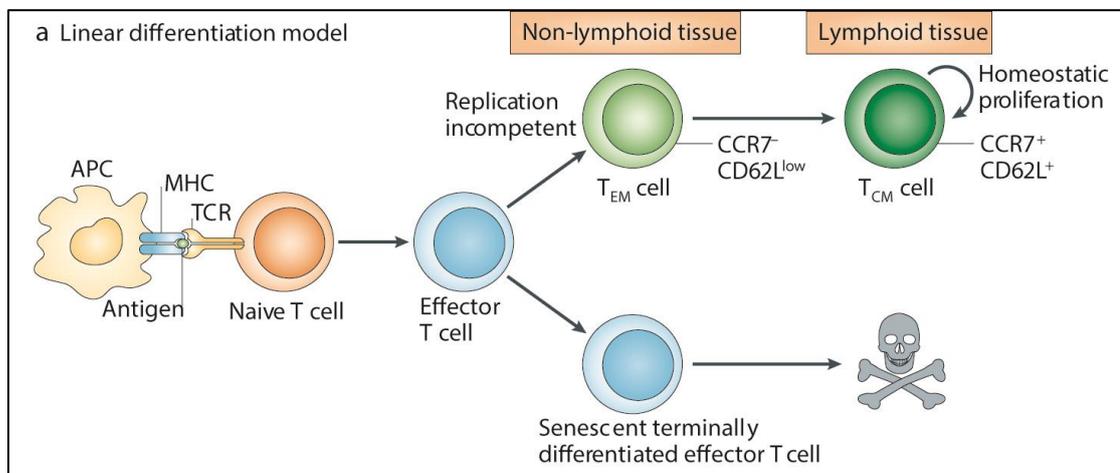


Figure 6 : Génération et maintien de la réponse mémoire lymphocytaire T selon le modèle de différenciation linéaire (d'après (Ahmed et al. 2009))

Le modèle de différenciation asymétrique

Pour prendre en compte cette notion de cellules effectrices différenciées et de cellules mémoires multipotentes indifférenciées, un autre modèle a été suggéré. Ce modèle propose qu'après la rencontre avec l'antigène, un LT activé aurait la capacité de se diviser en 2 cellules filles de phénotype distinct, une cellule fille de phénotype effecteur différenciée et une cellule fille de phénotype mémoire indifférenciée (Fearon 2007). Des études ont montré qu'un seul LT naïf activé pouvait être à l'origine d'un pool de SLEC mais également d'un pool de MPEC (Gerlach et al. 2010; Stemberger et al. 2007). Cette asymétrie de la première division cellulaire résulte de la polarisation du LT activé par la formation de la synapse immunologique et l'acquisition de programmes transcriptionnels distincts (Chang et al. 2011). Ainsi, le pôle cellulaire proche de la synapse immunologique aboutie à la formation de SLEC tandis que le pôle cellulaire opposé aboutie à la formation de MPEC (Arsenio, Metz, et Chang 2015; Chang, Wherry, et Goldrath 2014). La cellule fille proximale possédait un profil d'expression génique orienté vers les fonctions lymphocytaires effectrices ($IFN\gamma$ et granzyme B), tandis que la cellule fille distale possédait un profil d'expression génique orienté vers les fonctions lymphocytaires mémoires (IL-7R et CD62L) (Chang et al. 2007).

La **Figure 7** représente la génération de la réponse lymphocytaire T mémoire selon le modèle de différenciation asymétrique.

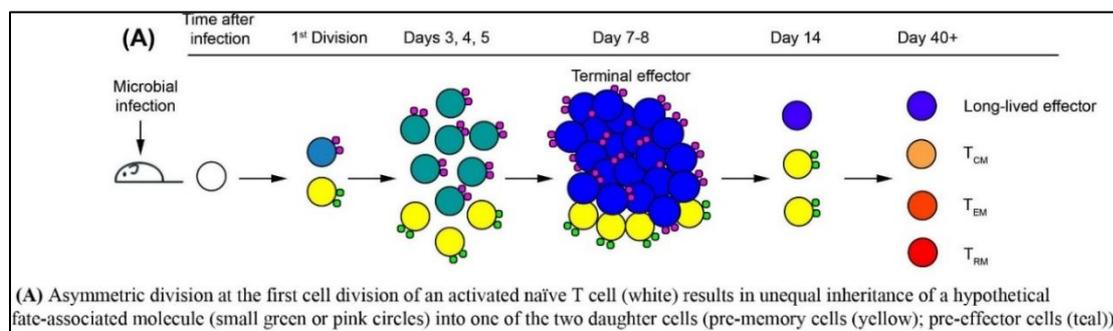


Figure 7 : Génération et maintien de la réponse mémoire lymphocytaire T selon le modèle de différenciation asymétrique (d'après (Arsenio, Metz, et Chang 2015))

3.1.2 Régulation transcriptionnelle

La différenciation lymphocytaire en SLEC ou en MPEC est le résultat de modifications transcriptionnelles (Chang, Wherry, et Goldrath 2014). Cette orientation lymphocytaire est dictée par des signaux provenant du microenvironnement influençant eux-mêmes la régulation des facteurs de transcription. Un environnement cytokinique pro-inflammatoire tel qu'un niveau élevé d'IL-12 induit la génération de SLEC (Pipkin et al. 2010; Joshi et al. 2007). A l'inverse, un niveau bas d'IL-12 ou une sécrétion soutenue d'IL-2 (Pipkin et al. 2010), d'IL-10 ou d'IL-21 (Cui et al. 2011) induit la différenciation en MPEC. L'expression sélective du récepteur à l'IL-7 (CD127) sur les LT CD8 induit la formation de MPEC (Kaech et al. 2003).

Les principaux facteurs de transcription connus sont :

Le couple antagoniste T-bet et EOMES

Dans le cadre des infections à *Listeria monocytogenes*, le rôle de l'IL-12 passe par l'activation de T-bet et la répression d'EOMES (Eomesodermin). Après la résolution de l'infection aiguë, le niveau d'IL-12 décline, permettant l'expression d'EOMES et la formation de MPEC (Takemoto et al. 2006). T-bet et EOMES sont ainsi deux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation lymphocytaire, T-bet étant impliqué dans la génération des SLEC (Joshi et al. 2007) et EOMES dans celle des MPEC (Banerjee et al. 2010).

FOXO1

FOXO1 est nécessaire au développement d'une immunité mémoire fonctionnelle à long terme (Tejera et al. 2013). Dans des modèles murins déficients pour FOXO1, une réponse effectrice était générée lors de l'épisode infectieux initial. Cependant, à distance de l'épisode infectieux, les LT CD8 conservaient un phénotype SLEC, sans phénotype mémoire identifiable (Hess Michelini et al. 2013). L'impact de FOXO1 sur la

différenciation en LT mémoires passe par l'inhibition de T-bet et l'activation d'EOMES (Rao et al. 2012).

Le couple antagoniste BLIMP1/BCL-6

Le facteur de transcription BLIMP1 entraîne la différenciation des LT CD8 en SLEC, en réprimant le développement des MPEC (Rutishauser et al. 2009; Kallies et al. 2009). BLIMP1 est antagonisé par différents facteurs de transcription tels que BCL-6 ou BCL-11b. Ces facteurs de transcription promeuvent le développement et la survie à long terme des MPEC (Pepper et al. 2011; Abboud et al. 2016).

La voie mTOR

La voie mTOR semble très impliquée dans la différenciation lymphocytaire (Araki, Youngblood, et Ahmed 2010). Par l'intermédiaire de l'IL-12, la kinase de la voie mTOR est capable de réguler l'expression de T-bet et d'EOMES, induisant ainsi la formation de SLEC. Le blocage pharmacologique de la voie mTOR entraîne l'expression d'EOMES et la formation de MPEC (Rao et al. 2010).

Autres facteurs de transcription

Récemment, de nouveaux facteurs de transcription tels que Runx2 ont également été impliqués dans la différenciation en MPEC, la perte Runx2 étant associée à la diminution du nombre de cellules KLRG1^{low} IL-7Receptor^{high} (Olesin et al. 2018).

La **Figure 8** illustre le rôle des facteurs de transcription dans la différenciation lymphocytaire en SLEC et MPEC.

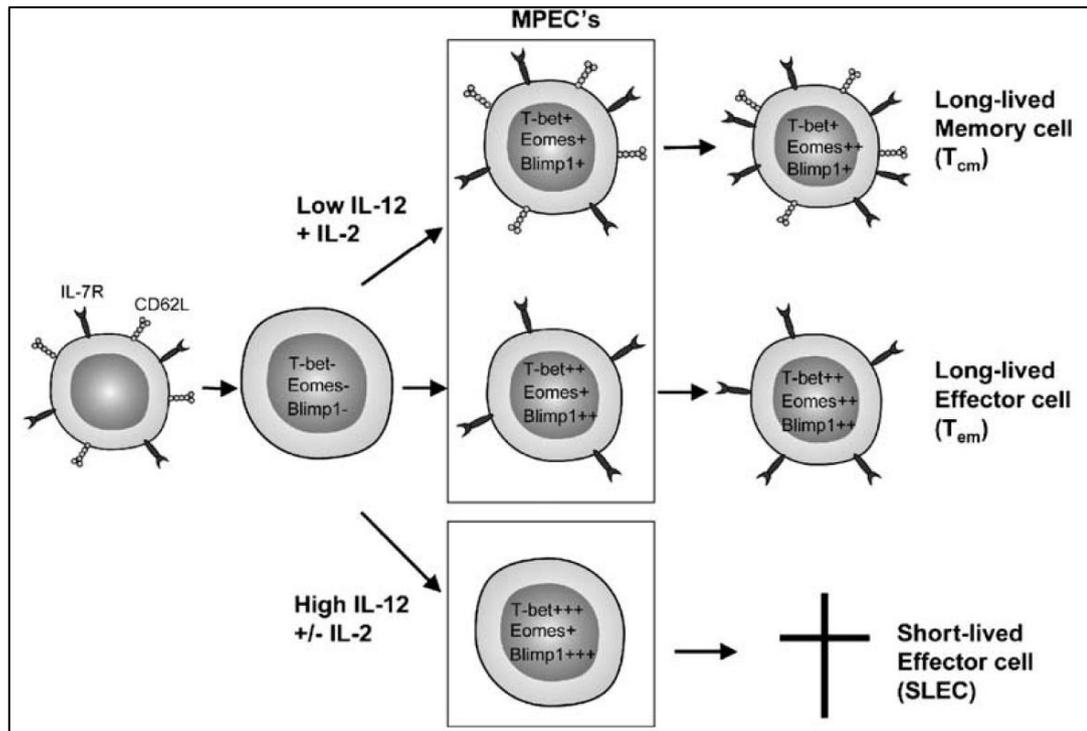


Figure 8 : Régulation transcriptionnelle entraînant des destins lymphocytaires différents (d'après (Kallies 2008))

3.1.3 Implication des Lymphocytes T CD4 auxiliaires « helpers » dans la génération et maintien de la réponse mémoire lymphocytaire T CD8

Les LT CD4 helpers sont indispensables à l'élaboration d'une réponse T CD8 mémoire efficace (Laidlaw, Craft, et Kaech 2016). L'absence d'aide lymphocytaire CD4 est caractérisée par la génération de LT effecteurs de type SLEC, mais est associée à une incapacité à développer une réponse T CD8 mémoire fonctionnelle (Janssen et al. 2003). En l'absence d'aide CD4, un LT CD8 va acquérir un phénotype effecteur mais sera plus sensible à l'apoptose lors d'une restimulation ultérieure par la surexpression de la molécule TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) (Janssen et al. 2005). Notre groupe a précédemment montré qu'en l'absence de LT CD4 régulateurs lors de la

rencontre antigénique primaire, les LT CD8 mémoires ainsi générés proliféraient peu et étaient incapables de se différencier en LT effecteurs secondaires (de Goër de Herve et al. 2012). Les LT CD4 régulateurs agissaient en limitant l'exposition des précurseurs mémoires CD8 à l'IL-2 (de Goër de Herve et al. 2012).

Très récemment, notre groupe a étudié le rôle des LT CD4 T_{FH} sur la génération des précurseurs mémoires MPEC. Le stade très précoce des précurseurs mémoires T CD8 peut être identifié par l'expression de CXCR5. L'expression de CXCR5 entraîne la relocalisation des MPEC dans la zone inter-folliculaire T-B des centres germinatifs, où ils reçoivent l'aide des LT_{FH} pour devenir des cellules mémoires de longue durée de vie hautement compétentes. L'aide médiée par les LT_{FH} est médiée par l'interaction CD40/CD40L et l'IL-21 (Thèse d'Immunologie de Mme Maisa Abdoh).

L'aide lymphocytaire T CD4 est également requise lors de la réactivation antigénique des LT CD8 mémoires afin d'assurer une expansion secondaire et une différenciation optimale en cellules effectrices secondaires (de Goër de Herve et al., 2008). Notre équipe a démontré que des LT CD4 hétérospécifiques interagissant avec les mêmes CPA pouvaient fournir une aide effective aux LT CD8 mémoires, et notamment en situation de défaut de la mémoire lymphocytaire T CD4 homospécifique (de Goër de Herve et al. 2008).

La **Figure 9** illustre l'aide lymphocytaire CD4 dans le développement et le maintien de la réponse T CD8 mémoire.

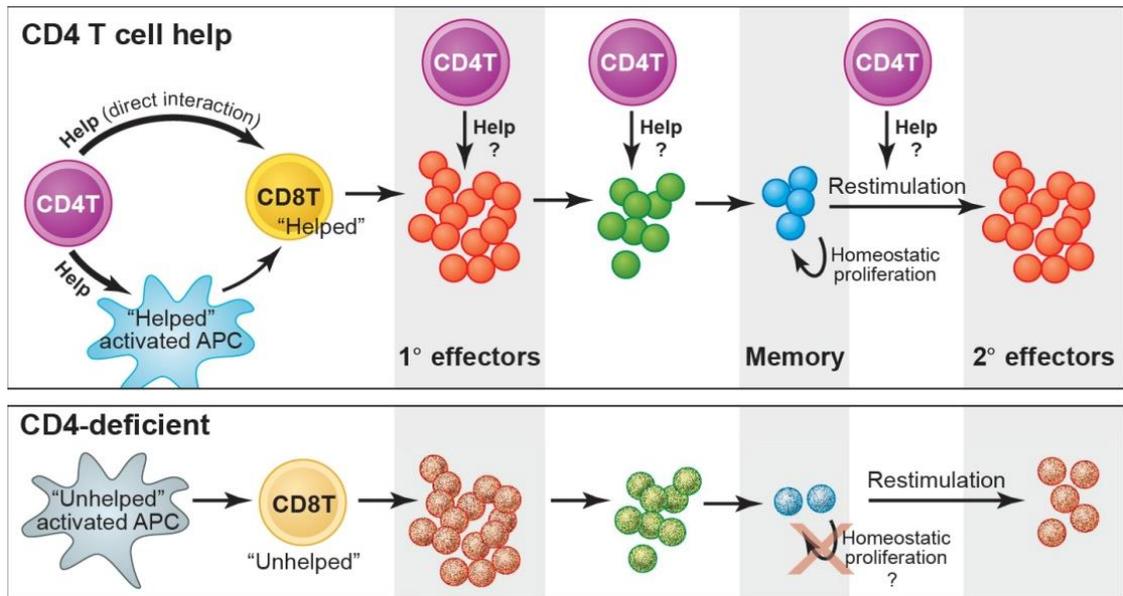


Figure 9 : Aide lymphocytaire médiée par les lymphocytes T CD4 au développement et au maintien de la réponse T CD8 mémoire (d'après (Kaech et Ahmed 2003))

Rôle de l'interaction CD40-CD40L

Cette aide CD4 requière un contact cellulaire direct et implique notamment l'interaction CD40-CD40L (de Goër de Herve et al. 2010, 4; Arens et Schoenberger 2010). Après une stimulation antigénique, les LT CD4 activés expriment la molécule de surface CD40 ligand (CD40L) alors que les CPA activées expriment la molécule CD40. L'interaction CD40-CD40L induit l'expression de CD80/CD86 sur la CPA, permettant l'activation efficace des LT CD8 naïfs (Schoenberger et al. 1998). En outre, des stimulations par un anticorps agoniste CD40 en l'absence de LT CD4 se sont révélées suffisantes *in vitro* et *in vivo* pour induire des réponses T CD8 efficaces (Schoenberger et al. 1998; Bennett et al. 1998). Les LT CD8 activés peuvent également exprimer CD40 et recevoir ainsi une aide lymphocytaire directement médiée par les LT CD4 (Bourgeois, Rocha, et Tanchot 2002; de Goër de Herve et al. 2010, 4).

3.1.4 Environnement cytokinique

Si l'homéostasie des LT mémoires dépend de l'environnement cytokinique avoisinant, les cytokines impliquées sont différentes de celles impliquées dans la survie des LT naïfs (Schluns et Lefrançois 2003). Ainsi, la survie des LT mémoires dépend largement de l'IL-7 et de l'IL-15. Ces deux cytokines se sont révélées indispensables à la survie des LT CD8 mémoires, les souris déficientes pour l'IL-15 étant incapables de générer une immunité CD8 mémoire (Kennedy et al. 2000).

L'IL-7 est essentiellement produite par les cellules épithéliales des organes lymphoïdes primaires et secondaires (Shitara et al. 2013; Onder et al. 2012). Cette cytokine permet le maintien à long terme des LT mémoires en stimulant leur survie et leur capacité proliférative indépendamment de la présence de l'antigène (Shmarov et al. 2016; Bradley, Haynes, et Swain 2005; Seddon, Tomlinson, et Zamoyska 2003). L'IL-7 permet également d'abaisser le niveau de restimulation lymphocytaire en augmentant le niveau d'expression de CD25 sur les LT mémoires de type T_{CM} , T_{EM} et T_{EMRA} . L'IL-7 était également capable d'augmenter les fonctions effectrices des LT activés en augmentant leurs niveaux de production d'IL-2, d'IL-10 et d'IFN- γ (Shmarov et al. 2016).

L'IL-15 est produite par les macrophages ou les cellules dendritiques activés mais peu par les LT eux-mêmes (Mattei et al. 2001). Cette cytokine a été impliquée comme médiateur de l'aide fournie par les LT CD4, son apport exogène en l'absence de CD4 permettant la génération d'une réponse mémoire effective. L'IL-15 diminue l'expression de la molécule pro-apoptotique Bax et augmente l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-X(L), entraînant un signal de survie lymphocytaire (Oh et al. 2008). Ainsi, un LT CD4 helper pourrait induire l'expression d'IL-15 par la CPA présentant l'antigène au LT CD8 et permettre la génération d'une immunité mémoire spécifique de longue durée de vie (Oh et al. 2008).

De façon intéressante, l'IL-2 a également été identifiée comme un facteur contribuant à l'homéostasie de la mémoire lymphocytaire T et semble jouer un rôle primordial dans la genèse d'une mémoire CD8 efficace. Si une exposition prolongée à

l'IL-2 favorise la génération d'effecteurs de type SLEC (Kalia et al. 2010; Pipkin et al. 2010), l'IL-2 est néanmoins crucial pour l'élaboration d'une réponse CD8 mémoire efficace lors d'un contact antigénique ultérieur (Williams, Tyznik, et Bevan 2006). Ceci suggère une influence importante sur la différenciation lymphocytaire de l'amplitude et/ou de la durée de l'exposition à l'IL-2. L'IL-2 entraîne la sécrétion lymphocytaire de la protéine *NGFI-A binding protein 2*, entraînant la suppression de TRAIL et permettant une expansion lymphocytaire secondaire (Wolkers et al. 2012). Par ailleurs, la sécrétion d'IL-2 induit l'expression du récepteur à l'IL-7, permettant ainsi l'interaction de l'IL-7 avec son récepteur et la survie des LT mémoires (Dooms et al. 2007).

La **Figure 10** montre l'impact des différentes cytokines dans l'élaboration et le maintien de la réponse immune.

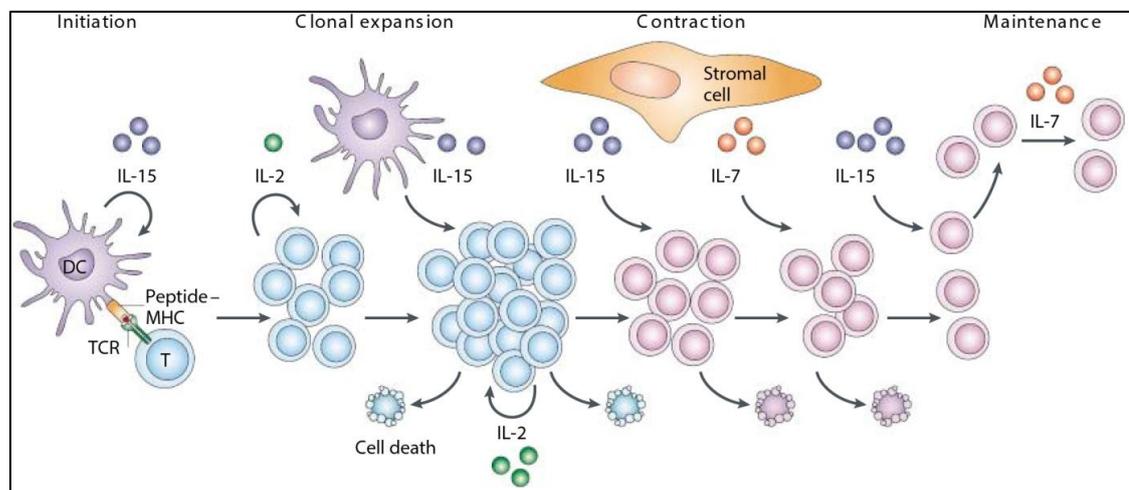


Figure 10 : Implication des cytokines dans l'élaboration et le maintien de l'immunité T effectrice primaire et de l'immunité mémoire (d'après (Schluns et Lefrançois 2003))

3.2 Propriétés fonctionnelles de l'immunité mémoire

L'immunité mémoire dispose de propriétés fonctionnelles différentes de celles de la réponse effectrice primaire, permettant ainsi une réponse immune plus rapide et plus

efficace lors de la rencontre ultérieure avec l'antigène (London, Lodge, et Abbas 2000). La fréquence des LT CD8 mémoires spécifiques d'un antigène est plus de 1000 fois supérieure à celle d'un LT naïf spécifique de ce même antigène (Blattman et al. 2002). Leur TCR semble également de plus forte affinité, résultant de l'activation préférentielle des LT ayant la plus forte spécificité antigénique. Ainsi, les T_{SCM} spécifiques du Cytomégalo virus possèdent un TCR de haute affinité pour l'antigène virale pp65, assurant de ce fait une meilleure fonctionnalité de l'immunité mémoire antivirale (Miyama et al. 2017). Le seuil de restimulation lymphocytaire est également moins élevé. Cette amélioration des capacités de restimulation antigénique s'explique par une sensibilisation accrue des voies de signalisation impliquées dans l'engagement du TCR (Teixeiro et al. 2009; Kersh et al. 2003). Les LT mémoires possèdent une cinétique de réponse lymphocytaire plus rapide en termes de sécrétions cytokiniques, de prolifération et de cytotoxicité, et cela en réponse à une charge antigénique moindre (Strutt et al. 2012; Rogers, Dubey, et Swain 2000). Une autre propriété importante est la redistribution des LT mémoires, à l'entrée des ganglions lymphatiques de drainage ou directement à l'intérieur des tissus, permettant leur réactivation rapide (Kastenmüller et al. 2013). Cette redistribution s'accompagne d'une surexpression des molécules d'adhésion cellulaire, CD2 et LFA-1, permettant l'adressage des lymphocytes vers les épithéliums cibles et facilitant leur rencontre avec les CPA présentant l'antigène pathogène (Ito et al. 1995).

3.3 Hétérogénéité des différentes sous-populations de lymphocytes T mémoires

Les différentes sous-populations de LT mémoires sont distinguées selon leurs fonctionnalités, leurs localisations distinctes et l'expression spécifiques de récepteurs de surface (Harari et al. 2006; Appay et al. 2008; S. N. Mueller et al. 2013).

Cinq stades de LT mémoires sont actuellement décrits.

3.3.1 Les cellules souches mémoires T (T_{SCM})

Les cellules souches mémoires T (T_{SCM} pour « Stem-Cells Memory T cells ») représentent 2 à 3% des LT circulants. Elles sont caractérisées par la co-expression de marqueurs de différenciation précoce ($CD27^+ CD45RA^+ CCR7^+$) et tardive ($CD95^+$) et sont localisées préférentiellement dans les organes lymphoïdes secondaires (Gattinoni et al. 2011).

Majoritairement polyfonctionnelles, ces cellules sont dotées de grandes capacités de prolifération et de sécrétions cytokiniques. Dotées de fonctions d'auto-renouvellement et de différenciation en T_{CM} , T_{EM} et T_{ET} , les T_{SCM} constituent probablement le réservoir de l'immunité mémoire de longue durée de vie (Lugli et al. 2013; Costa Del Amo et al. 2018).

3.3.2 Les lymphocytes T centraux mémoires (T_{CM})

Les LT centraux mémoires (T_{CM}) sont caractérisés par les marqueurs suivants : $CD44^{high} CD45RA^- CD45RO^+ CD95^+ CD27^+ CCR7^+ CD62L^+$.

Localisées préférentiellement dans les ganglions lymphatiques, ces cellules sont dotées de capacités prolifératives par synthèse autonome d'IL-2, sont capables de restimuler efficacement les CPA lors d'un contact antigénique ultérieur et peuvent se différencier en T_{EM} et T_{ET} . Ne possédant pas de fonctions effectrices immédiates, les T_{CM} permettent d'initier plus rapidement une réponse immune efficace lors d'une rencontre ultérieure avec l'antigène (Sallusto et al. 1999; Sallusto, Geginat, et Lanzavecchia 2004).

3.3.3 Les lymphocytes T effecteurs mémoires (T_{EM})

Les LT effecteurs mémoires (T_{EM}) sont caractérisés par les marqueurs suivants : $CD44^{high} CD45RA^- CD45RO^+ CD95^+ CD27^- CCR7^- CD62L^-$.

Localisées préférentiellement dans les tissus périphériques, ces cellules sont dotées de capacités effectrices immédiates en termes de sécrétions cytokiniques (IFN γ et TNF α) et de cytotoxicité. Elles ont des capacités prolifératives limitées et peuvent se différencier en T_{ET}. Les T_{EM} assurent ainsi un contrôle rapide et efficace lors d'une réinfection secondaire (Sallusto et al. 1999; Sallusto, Geginat, et Lanzavecchia 2004).

3.3.4 Les lymphocytes T effecteurs terminaux (T_{EMRA} ou T_{ET})

Les LT effecteurs terminaux (T_{EMRA} ou T_{ET}) représentent le stade terminal de la différenciation lymphocytaire et sont caractérisés par les marqueurs suivants : CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD95⁺ KLRG1⁺ CD27⁻ CCR7⁻ CD62L⁻.

Il s'agit de cellules à fortes capacités effectrices (sécrétions d'IFN γ , de TNF α et de cytotoxicité directe) mais à faibles capacités prolifératives ou de différenciation lymphocytaire (Geginat, Lanzavecchia, et Sallusto 2003). Ce dernier point a été remis en cause par la mise en évidence de capacité proliférative et de dédifférenciation en T_{EM} en situation de réactivation virale. Ces capacités étaient néanmoins dépendantes d'une aide lymphocytaire CD4 ou d'un environnement cytokinique comprenant de l'IL-2, de l'IL-15 ou de l'IL-21 (van Leeuwen et al. 2002). Le marqueur de sénescence CD57 pourrait permettre d'identifier les T_{ET} dotés ou non de capacité de dédifférenciation. En effet, les T_{ET} CD57⁻ étaient dotés de capacités de prolifération et de différenciation en T_{EM} tandis que les T_{ET} CD57⁺ en étaient incapables (Verma et al. 2017).

3.3.5 Les lymphocytes T résidents mémoires (T_{RM})

Au cours des dernières années, une nouvelle population de LT mémoires a été mise en évidence : les LT résidents mémoires (T_{RM}) (S. N. Mueller et Mackay 2016; Park et Kupper 2015). Ces T_{RM} sont caractérisés par les marqueurs suivants : CD103⁺ CD69⁺ CD45RA⁻ CCR7⁻ (Mackay et al. 2013). Les T_{RM} résident au long cours au niveau des organes (reins, cerveau, foie) ou dans les tissus associés aux muqueuses (peau, intestins, poumons ou tractus génital) (X. Jiang et al. 2012; Teijaro et al. 2011) et

confèrent à l'organisme une immunité locale hautement efficace (Behr et al. 2018; Gebhardt et al. 2009). Ces cellules possèdent des fonctions effectrices supérieures à celles des T_{CM} ou des T_{EM} (X. Jiang et al. 2012; Teijaro et al. 2011). De façon intéressante, dans le contexte des infections cutanées, les T_{RM} ne sont pas localiser uniquement au niveau du site infectieux mais colonisent l'ensemble du tissu, fournissant une protection immune efficace à l'ensemble de l'organe (X. Jiang et al. 2012).

La génération des T_{RM} est encore peu décrite. Néanmoins, elle semble distincte de celle des LT mémoires circulants en impliquant une présentation antigénique par des CPA exprimant spécifiquement le récepteur DNGR-1 (Iborra et al. 2016). Au niveau cutané, la différenciation des T_{RM} se fait à partir des cellules KLRG1⁻ produites lors de la phase précoce de la réponse immune. L'IL-15 et le TGF β semblent impliqués dans la formation et la survie des T_{RM} cutanés (Mackay et al. 2013). Contrairement aux T_{CM} et aux T_{EM} qui peuvent transiter entre les organes lymphoïdes secondaires et les tissus périphériques (Marzo, Yagita, et Lefrançois 2007), les T_{RM} restent localiser au niveau tissulaire du fait d'une régulation négative des molécules associées à la migration cellulaire, comme le récepteur à S1P (Skon et al. 2013).

3.4 Lien entre phénotype et fonctionnalité lymphocytaire

Ainsi, le phénotype et la fonctionnalité lymphocytaires sont intrinsèquement liés et dépendent de voies de différenciation lymphocytaire souvent antagonistes (Kaech et Cui 2012; Crotty, Johnston, et Schoenberger 2010).

Un phénotype indifférencié est associé à de plus grandes capacités de prolifération, d'auto-renouvellement et de différenciation lymphocytaire. Ce phénotype est induit par les facteurs de transcription tels qu'EOMES, FOXO1 ou BCL-6.

A l'inverse, un phénotype de différenciation terminale est associé à des plus grandes capacités effectrices (sécrétions cytokiniques et cytotoxicité) avec des capacités faibles voir nulles de prolifération et/ou de différenciation lymphocytaire. Ce phénotype

est induit par les facteurs de transcription tels que T-bet ou BLIMP-1 (Kaech et Cui 2012; Restifo et Gattinoni 2013).

La Figure 11 ci-dessous illustre cette notion.

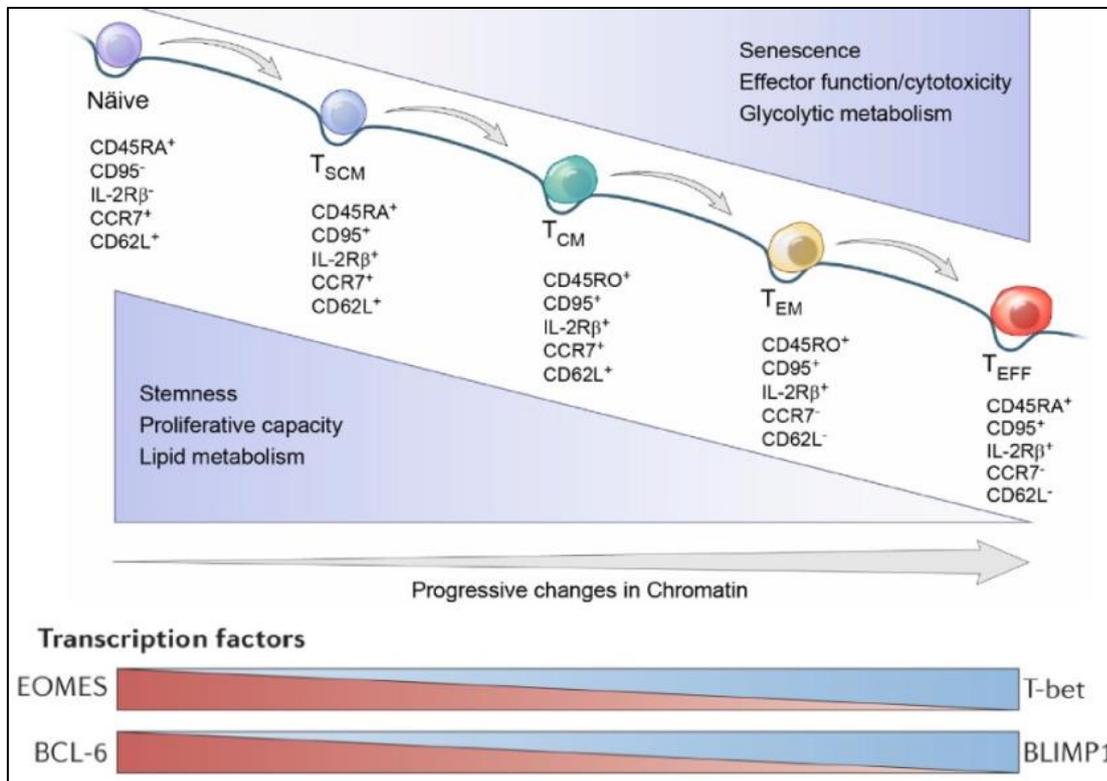


Figure 11 : Lien entre phénotype et fonctionnalité lymphocytaire (d'après (Restifo et Gattinoni 2013))

4 Anomalies fonctionnelles de la réponse mémoire et infections virales chroniques

On distingue trois types d'infections virales selon le niveau de persistance antigénique à la fin de l'épisode infectieux initial.

Les infections virales aiguës sont caractérisées par une clairance antigénique complète et la résolution définitive de l'infection (cas des infections à *Influenzavirus*, *poxvirus*, ...).

Les infections virales chroniques contrôlées par le système immunitaire sont caractérisées par la persistance du virus à l'état latent dans l'organisme. L'exposition prolongée au système immunitaire se fait avec une faible charge antigénique et des épisodes de réactivation virale souvent infracliniques (cas des infections à *herpesvirus* ou à *polyomavirus*).

Les infections virales chroniques non contrôlées par le système immunitaire sont caractérisées par la persistance active du virus dans l'organisme. L'exposition prolongée au système immunitaire se fait avec une forte charge antigénique et une infection virale active (cas des infections au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), aux virus de l'hépatite B (VHB), de l'hépatite C (VHC), ... où la réplication virale est active avec des conséquences organiques fonctionnelles).

4.1 Signature fonctionnelle de la réponse lymphocytaire T mémoire antivirale

Ces modèles d'infections virales sont caractérisés par des LT antiviraux de fonctionnalité différente selon la pression antigénique exercée, avec l'instauration chez l'hôte d'une « signature lymphocytaire fonctionnelle » (Seder, Darrah, et Roederer 2008; Pantaleo et Harari 2006). Cette signature fonctionnelle est la caractérisation de la fonctionnalité des LT antiviraux (van Aalderen et al. 2015).

La polyfonctionnalité lymphocytaire a été proposée comme marqueur d'efficacité de l'immunité antivirale dans le contrôle des infections virales chroniques (Harari et al. 2006; Seder, Darrah, et Roederer 2008). Cette polyfonctionnalité pourrait être le reflet

de la qualité de la réponse immune, potentiellement plus importante que son seul aspect quantitatif. Ainsi, dans le cadre des infections virales chroniques contrôlées telles que les infections à Cytomégalovirus (CMV), on constate l'apparition d'une population de LT polyfonctionnels (LT sécréteurs d'IL-2, d'IFN γ et d'IL-2/IFN γ). A l'inverse, dans le cadre des infections virales chroniques non contrôlées telles que les infections à VIH, on constate l'émergence majoritaire d'une population de LT_{ET} monofonctionnels sécréteurs d'IFN γ , entrant dans le cadre d'un épuisement fonctionnel des LT spécifiques du VIH (Harari et al. 2006). De façon intéressante, chez les patients infectés par le VIH avec une charge virale indétectable, ces capacités de sécrétions cytokiniques multiples étaient restaurées (Riou et al. 2012). De même, la capacité de prolifération des LT CD4 spécifiques du VIH était associée à un meilleur contrôle de l'infection (McNeil et al. 2001; Rosenberg et al. 1997).

La **Figure 12** ci-dessous illustre l'altération de la fonctionnalité lymphocytaire selon la pression antigénique virale exercée et la notion de « signature fonctionnelle » identifiable chez l'hôte.

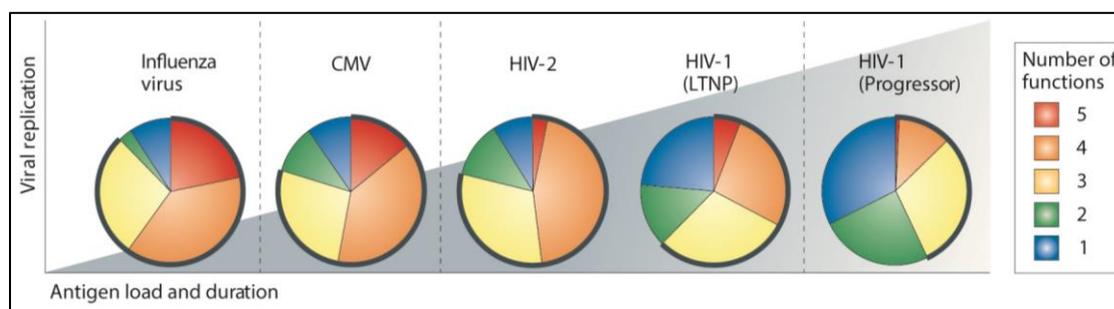


Figure 12 : Infections virales et altération de la fonctionnalité lymphocytaire dépendante de la charge antigénique (d'après (Seder, Darrah, et Roederer 2008))

4.2 Délétion clonale T

Au cours des infections virales chroniques avec stimulation antigénique continue, une altération de la régulation de la survie homéostatique des LT mémoires antiviraux a été décrite. En effet, contrairement au maintien autonome des LT mémoires antiviraux générés lors des infections virales aiguës, les LT mémoires générés lors des infections virales chroniques ne peuvent persister en l'absence de stimulation antigénique continue (Shin et al. 2007). Ces LT mémoires ne sont pas capables de proliférer indépendamment de la présence de l'antigène et répondent faiblement à l'IL-7 et l'IL-15 par down-régulation de leurs récepteurs (Wherry et al. 2004; Lang et al. 2005).

Dans des modèles d'infection chronique à *lymphocytic choriomeningitis virus*, une délétion clonale des LT spécifiques d'épitopes viraux immunodominants a été mis en évidence (Gallimore et al. 1998; Wherry, Blattman, et al. 2003). La force de la pression antigénique semblait orienter la dysfonction lymphocytaire. Les épitopes immunodominants conduisaient à une délétion des LT correspondants tandis que les épitopes non-immunodominants conduisaient à un épuisement lymphocytaire fonctionnel (Wherry, Blattman, et al. 2003).

4.3 Epuisement lymphocytaire T

Cet  tat d'épuisement lymphocytaire associe une altération des fonctions effectrices, un profil transcriptionnel distinct et l'expression de récepteurs inhibiteurs tels que PD-1, CTLA-4, TIGIT, TIM-3 ou LAG-3 (Wherry et Kurachi 2015; Markwick et al. 2015; Blackburn et al. 2009). Le niveau de co-expressions des récepteurs inhibiteurs était corrélé au niveau d'épuisement des LT antiviraux et à la charge virale (Blackburn et al. 2009).

Les LT générés dans le cadre d'une infection virale chronique ont une altération de l'expression des gènes impliqués dans la mobilité lymphocytaire, dans les capacités de cytotoxicité ou de sécrétions cytokiniques, ainsi que de profondes déficiences métaboliques et énergétiques (Wherry et al. 2007). L'altération de la fonctionnalité des LT CD8 antiviraux survient de manière hiérarchique. La production d'IL-2 et les

capacités de cytotoxicité sont les premières fonctions à disparaître, suivie par la sécrétion de TNF α puis d'IFN γ (Wherry, Blattman, et al. 2003). Il est important de noter que ces LT hypofonctionnels ne sont pas totalement inertes. En effet, la déplétion complète des LT CD8 lors d'une infection chronique à *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) dans un modèle de macaque entraînait une exacerbation de la virémie avec progression rapide au stade SIDA (Schmitz et al. 1999).

La régulation de la fonctionnalité lymphocytaire par l'intermédiaire des récepteurs inhibiteurs et l'altération des fonctions effectrices semblent nécessaires pour éviter la survenue de lésions tissulaires excessives après la résolution de l'épisode infectieux (Okazaki et al. 2013; Cornberg et al. 2013). En effet, dans un modèle murin d'hépatite à *Adenovirus*, un déficit en PD-1 était associé à une clairance virale plus rapide mais également à la survenue de lésions d'hépatite plus sévère (Iwai et al. 2003).

La survenue de cet état d'épuisement lymphocytaire est probablement d'origine multifactorielle, impliquant notamment le niveau et la durée de la stimulation antigénique (Wherry, Blattman, et al. 2003), l'activation des récepteurs inhibiteurs (Quigley et al. 2010), un défaut d'aide lymphocytaire T CD4 (Matloubian, Concepcion, et Ahmed 1994) ou encore un environnement cytokinique propice. L'IL-10 semble notamment induire cet état d'épuisement lymphocytaire, un déficit en IL-10 aboutissant à l'émergence d'une réponse immune fonctionnelle et un contrôle efficace des infections virales chroniques (Brooks et al. 2006). Ainsi, par l'intermédiaire de la sécrétion d'IL-10, les LT_{REG} pourraient réguler la fonctionnalité lymphocytaire afin de supprimer une réponse inflammatoire chronique trop délétère (Rouse, Sarangi, et Suvas 2006).

Différents niveaux d'épuisement lymphocytaire ont été décrits selon le niveau d'expression de PD-1 ou des facteurs de transcription T-bet et EOMES (Paley et al. 2012; Staron et al. 2014; Shin et al. 2009). Ainsi, deux populations distinctes de LT CD8 épuisés coexistent au cours des infections virales chroniques (Paley et al. 2012) :

- les LT CD8 T-bet^{high} PD-1^{int} encore dotées d'un potentiel prolifératif, leur fonctionnalité pouvant être restaurée sous certaines conditions et
- les LT CD8 EOMES^{high} PD-1^{high} ne possédant plus de capacité proliférative et

représentant le stade terminal irréversible de l'épuisement lymphocytaire.

Ces deux sous-populations lymphocytaires sont probablement liées selon une relation « progéniteur – progéniture terminale », les LT CD8 T-bet^{high} PD-1^{int} se différenciant en LT CD8 EOMES^{high} PD-1^{high} (Paley et al. 2012). Récemment, le marqueur CD39 a été décrit comme un marqueur terminal irréversible d'épuisement lymphocytaire T CD8 (Gupta et al. 2015). Les LT CD8 exprimant CD39 étaient également Eomes^{high} PD1^{high}. Cette population était exclusivement présente en cas d'infection virale chronique et n'exerçait aucune activité de sécrétions cytokiniques ou de prolifération.

La **Figure 13** ci-dessous illustre les différences de fonctions et de phénotype entre une réponse T mémoire fonctionnelle et un épuisement lymphocytaire.

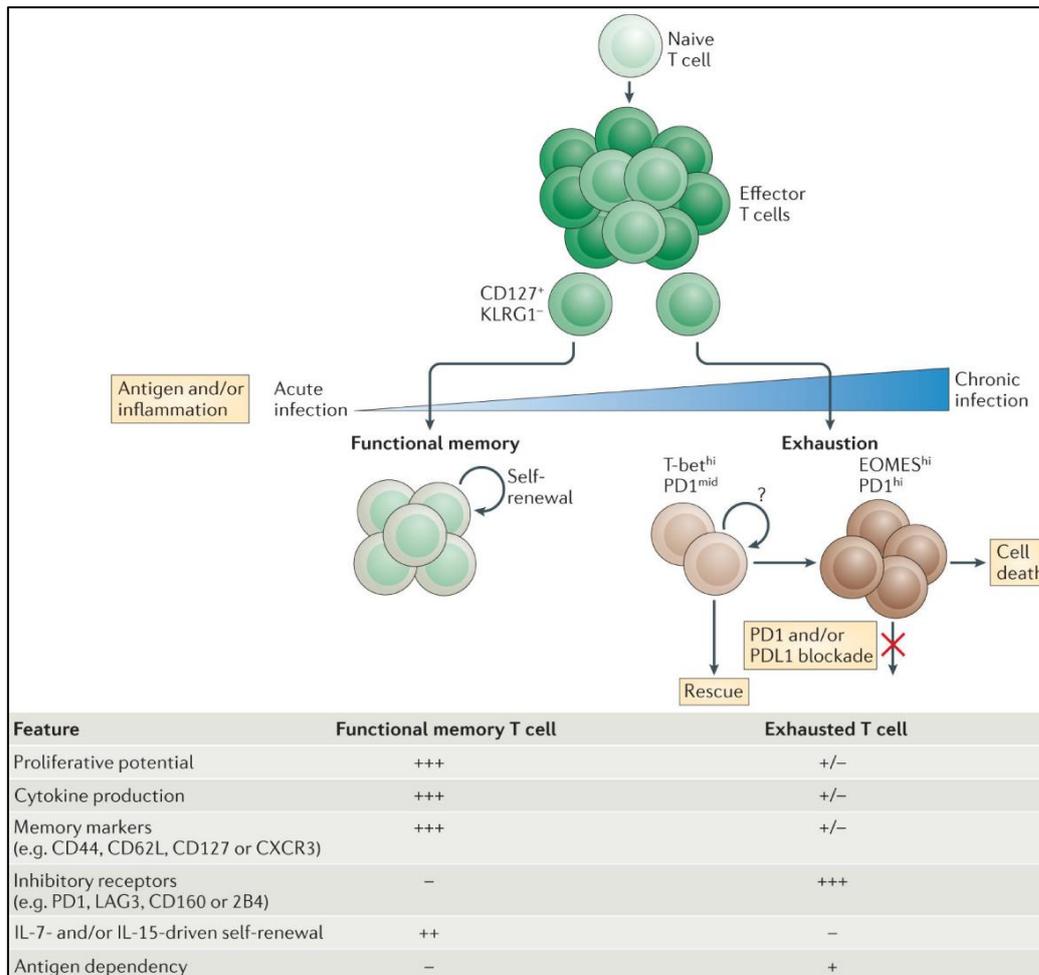


Figure 13 : Comparaison entre une réponse lymphocytaire T mémoire fonctionnelle générée dans le cadre des infections virales aiguës et un épuisement fonctionnel des LT antiviraux générés dans le cadre des infections virales chroniques (d'après (Wherry et Kurachi 2015))

4.4 Anergie lymphocytaire

Un autre état de dysfonction lymphocytaire distinct de l'épuisement a été décrit. Il s'agit de l'anergie lymphocytaire. La première description de cet état a été réalisée en 1987. La culture de LT en présence de CPA aux conditions de présentation antigénique altérées aboutissait à un état d'hyporéactivité lymphocytaire. Lors d'une restimulation antigénique ultérieure, ces LT étaient incapables de produire de l'IL-2 ou de proliférer (Jenkins et Schwartz 1987). Cet état semble crucial au maintien de la tolérance immune périphérique en induisant une inactivation lymphocytaire fonctionnelle spécifique faisant suite à la rencontre antigénique (Onishi et al. 2008; Schwartz 2003). Ainsi, l'établissement d'un état anergique semble être un des mécanismes mis en place par l'organisme permettant d'assurer la tolérance immune adaptative (Schietinger et Greenberg 2014; Choi et Schwartz 2007).

Une anergie lymphocytaire est le résultat d'une activation suboptimale d'un LT naïf lors de sa rencontre initiale avec l'antigène. Plusieurs mécanismes aboutissant à cette activation lymphocytaire suboptimale ont été décrits. Une reconnaissance antigénique primaire survenant en l'absence de signaux de costimulation induits dans un contexte pro-inflammatoire (CD80 et CD86) ou en présence de signaux inhibiteurs (CTLA-4) aboutissaient à cet état (Rochman et al. 2015; Wells et al. 2001). Un état anergique a également été décrit dans les suites d'un engagement d'un TCR de faible avidité antigénique ou faisant suite à une présentation antigénique altérée et/ou insuffisante (Mirshahidi, Huang, et Sadegh-Nasseri 2001; Korb et al. 1999; Sadegh-Nasseri et al. 2010). Cette activation suboptimale d'un LT spécifique de l'antigène ne permet pas la mise en place d'une réponse immune efficace, entraînant une hyporéactivité lymphocytaire et une tolérance antigénique.

L'anergie lymphocytaire associe ainsi une altération des fonctions effectrices en termes de prolifération et de sécrétions cytokiniques (Rochman et al. 2015), une expression soutenue des récepteurs inhibiteurs et un profil transcriptionnel spécifique (Fathman et Lineberry 2007; Delgoffe et Powell 2015). Le profil d'expression génique lors d'un état anergique est différent de celui retrouvé dans un état d'épuisement,

soulignant les différentes voies métaboliques impliquées dans la génération de ces deux statuts dysfonctionnels distincts (Macián et al. 2002; Wherry et al. 2007). Les mécanismes sous-jacents de l'anergie impliquent une inhibition de la voie MAP kinase aboutissant à l'absence de production d'IL-2.

Le **Tableau 2** illustre les différences entre un état d'épuisement et d'anergie lymphocytaire.

Tableau 2 : Comparaison des différentes formes d'anomalies fonctionnelles de la réponse T mémoire (d'après (Wherry et Kurachi 2015))

Feature	Exhaustion	Anergy
Main cause	Excessive and continuous stimulation	Suboptimal stimulation
Nature and time frame	Persistent overstimulation of signal 1 and signal 3 leads to progressive loss of effector and memory function (typically within a few weeks)	When signal 2 and/or signal 3 are either absent or weak at priming, T cell dysfunction occurs at an earlier time point (typically within a few days)
Proliferative capacity	Low	Low
Effector function	Low to moderate	None or low
Expression of inhibitory markers	High (and multiple markers are expressed)	High (and multiple markers are expressed)
Telomerase activity	Low	?
Primed properly	Yes	No

Question mark depicts unknown effects. KLRG1, killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1; NK, natural killer.

Partie 2 - Immunologie Appliquée :

La Transplantation Rénale

1 La transplantation rénale, un enjeu de santé publique

1.1 Epidémiologie

L'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) représente l'altération définitive de la fonction rénale nécessitant le recours à un traitement de suppléance rénale (par dialyse ou transplantation). L'IRCT est défini par un débit de filtration glomérulaire (DFG) strictement inférieur à 15 ml/min/1,73m² tandis que le recours aux techniques de suppléances rénales a habituellement lieu vers un DFG à 10 ml/min/1,73m² (Levey et al. 2005; Haute Autorité de Santé (HAS) 2002).

La transplantation rénale s'est actuellement imposée comme la méthode de référence de suppléance rénale et représente la première activité de transplantation d'organes solides au niveau mondial (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group 2009; Global Observatory On Donation And Transplantation 2017). Comparé au maintien en dialyse, la transplantation rénale offre de meilleurs résultats en termes de survie et de qualité de vie (Tonelli et al. 2011), avec un coût financier moindre (Laupacis et al. 1996).

Au niveau mondial en 2015, l'observatoire global pour le don d'organe et la transplantation (Global Observatory On Donation And Transplantation - GODT, organisme émanant de l'Organisation Mondiale de la Santé) recensait 126 670 patients transplantés tous organes confondus, dont 84 381 (soit 67%) patient transplantés rénaux avec une augmentation de 5.5% d'activité par rapport à 2014 (source : GODT - <http://www.transplant-observatory.org/organ-donation-transplantation-activities-2015-report-2/>). Pour la même année en France, le nombre estimé de patients porteurs d'un greffon rénal fonctionnel était de 36 729, soit une prévalence de 552,4 cas/million d'habitants, représentant ainsi 44,6% des 82 295 patients traités pour insuffisance rénale

chronique terminale (source : Agence de la Biomédecine – <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2015/donnees/organes/06-rein/synthese.htm>).

L'activité de transplantation rénale en France était de 3 488 greffes, soit 52,4 pmh, en constante augmentation depuis 2010 (Agence de la Biomédecine 2017). Malgré cette hausse d'activité, la progression des inscriptions sur liste d'attente a été constante depuis 2000, expliquant une pénurie actuelle de greffons. Le nombre de candidats est de 4,7 personnes pour 1 greffon, avec une médiane d'attente de 18,5 mois. Cette inadéquation entre le nombre de patients sur liste d'attente et le nombre effectif de transplantation rénale est également retrouvée en Europe (Eurotransplant International Foundation 2016). Ces données expliquent les politiques actuelles de santé publique de promotion de la transplantation et du don d'organe.

La **Figure 14** illustre la dynamique d'évolution des inscriptions sur liste d'attente et les cas effectifs de transplantation rénale entre 1969 et 2015.

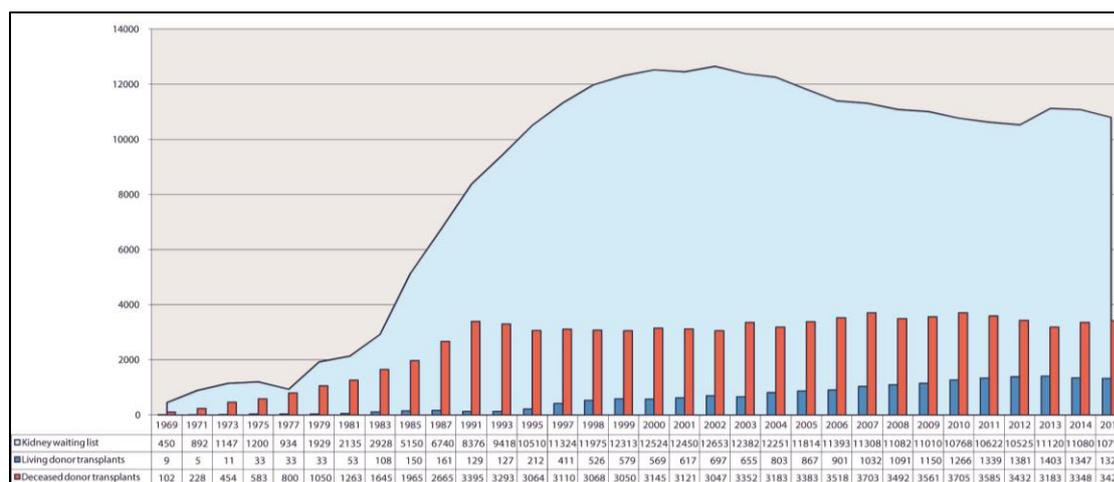


Figure 14 : Dynamique d'évolution des inscriptions sur liste d'attente et des cas de transplantations rénales entre 1969 et 2015 (d'après (Eurotransplant International Foundation 2016))

1.2 Histoire de la transplantation rénale

Bien que l'acte chirurgical inhérent à la transplantation rénale soit connu depuis 1910, la première transplantation rénale avec une survie à long terme (9 ans) du receveur et du greffon n'a été possible qu'en 1954 à partir d'un couple donneur/receveur de jumeaux homozygotes (Merrill et al. 1956). Ce premier succès historique illustre le rôle de la réponse immune de l'hôte contre l'organe étranger.

L'activité de transplantation rénale n'a pu se développer qu'à partir du moment où les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la réponse immune ont été en partie élucidés et maîtrisés (Morris 2004). Le taux de succès après transplantation rénale à partir de donneurs non apparentés a progressivement augmenté dans les années 1970 avec l'arrivée des traitements immunosuppresseurs tels que l'Azathioprine et les corticostéroïdes. Le début des années 1980 a été marqué par l'arrivée de la Ciclosporine. Cette puissante molécule immunosuppressive a entraîné l'essor des transplantations d'organes solides à travers le monde, permettant une survie des greffons au-delà de 80% la première année post-transplantation. Depuis le début des années 2000, de nouvelles molécules immunosuppressives ont été développées, contribuant toujours plus à améliorer la survie des allogreffes (Sayegh et Carpenter 2004).

Ainsi, au cours des 20 dernières années, la survie des greffons dans la 1^{ère} année post-transplantation a été significativement améliorée (de 80% en 1989 à 92% en 2009). Cependant, la survie médiane des greffons rénaux, actuellement évaluée à 14 ans, reste stable malgré l'immunosuppression utilisée (Agence de la Biomédecine (ABM) 2017).

2 Reconnaissance allogénique et rejets d'allogreffe

La réponse du système immunitaire du receveur vis-à-vis d'un organe transplanté se produit en trois phases successives :

- la phase de reconnaissance des alloantigènes de l'organe transplanté,
- la phase d'activation lymphocytaire,
- puis la phase de réponse immune effectrice.

En l'absence d'immunosuppression, les LT effecteurs spécifiques des alloantigènes vont infiltrer massivement le greffon et aboutir irrémédiablement au rejet et à la perte de celui-ci (Halloran 2004).

La **Figure 15** ci-dessous illustre la reconnaissance allogénique et la réponse immune développée vis-à-vis d'un organe transplanté.

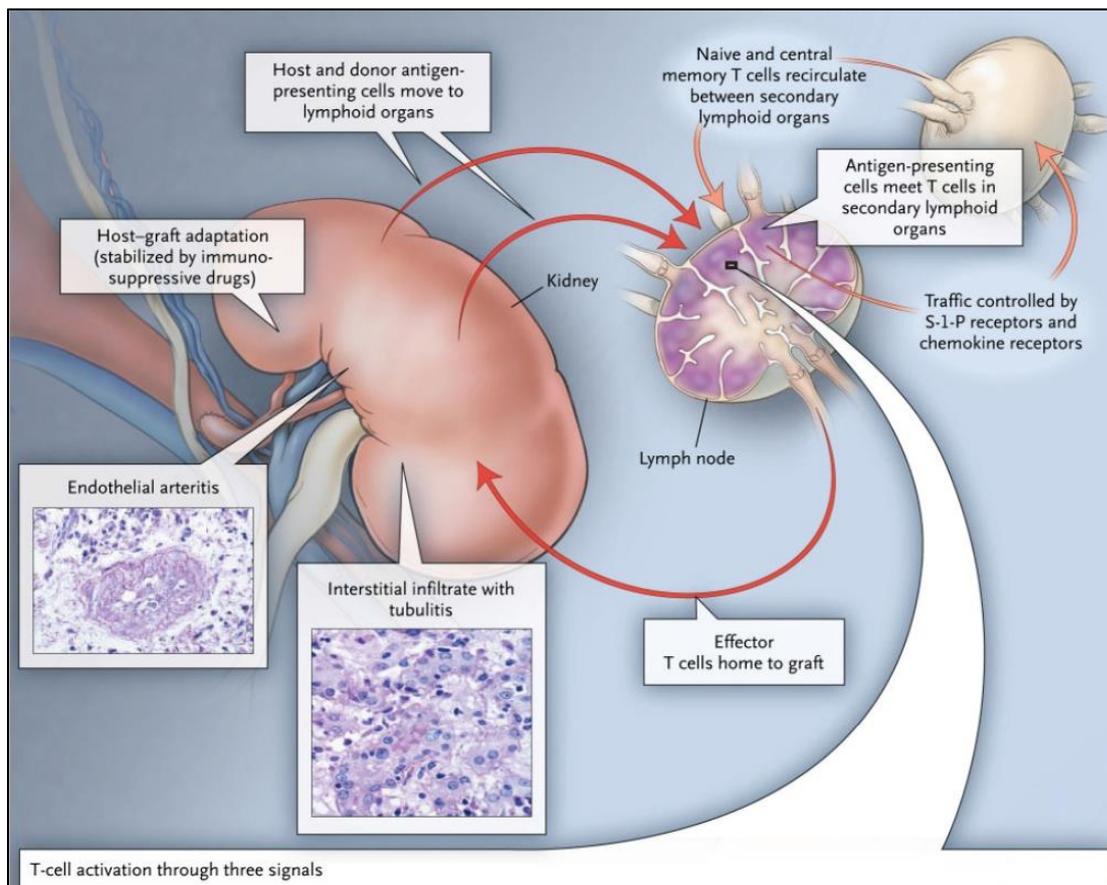


Figure 15 : Alloreconnaissance d'un greffon rénal par le système immunitaire du receveur conduisant à l'élaboration d'une réponse T effectrice allo-immune (d'après (Halloran 2004))

La reconnaissance allogénique du greffon intervient dès l'acte chirurgical de transplantation et implique trois modes de reconnaissance (S. Jiang, Herrera, et Lechler 2004).

2.1 Le mode de reconnaissance direct

Les LT du receveur reconnaissent les alloantigènes présentés par les CPA du donneur. Initialement contenues dans l'organe transplanté, les CPA du donneur migrent dans les ganglions lymphatiques du receveur et sont responsables d'une reconnaissance directe des molécules du CMH allogénique. Ce mode de reconnaissance lymphocytaire implique donc une présentation antigénique du complexe [CMH allogénique – peptide allogénique] par les CPA du donneur. L'activation des LT du receveur par un CMH totalement étranger est rendu possible par un mécanisme de mimétisme moléculaire. Le CMH allogénique a la capacité de mimer la structure tridimensionnelle des complexes « CMH du soi – peptide étranger », le peptide intervenant peu dans la reconnaissance allogénique (Macdonald et al. 2009; Sherman et Chattopadhyay 1993). Ainsi, la plupart des CMH allogéniques présents sur les CPA du donneur sont capables de stimuler les LT du receveur, l'avidité des TCR pour ces CMH étant extrêmement forte. On estime qu'entre 2 et 10% des LT totaux d'un individu sont capables de reconnaître directement un CMH allogénique, expliquant l'intensité de la réponse immune dirigée contre l'organe transplanté (Lindahl et Wilson 1977; Whitelegg et al. 2005).

2.2 Le mode de reconnaissance indirect

Les LT du receveur reconnaissent des peptides issus d'alloantigènes du greffon et présentés par les CPA du receveur. Ce mode de reconnaissance lymphocytaire implique ici une présentation antigénique de type [CMH du receveur – peptide allogénique du donneur]. Les CPA du receveur colonisent le greffon et captent des alloantigènes provenant des cellules épithéliales de l'organe transplanté. Dans un modèle murin de transplantation cardiaque, cette présentation antigénique était capable d'induire une

réponse lymphocytaire allogénique responsable d'un rejet du greffon cardiaque (Honjo, Xu, et Bucy 2004).

2.3 Le mode de reconnaissance semi-directe

Récemment découvert, ce mode implique l'acquisition par les CPA du receveur de complexes CMH allogéniques provenant du donneur, tout en assurant également une présentation antigénique indirecte. Ainsi, une même CPA du receveur est capable de présenter à la fois les complexes [CMH allogénique du donneur – peptide allogénique du donneur] et les complexes [CMH autologue du receveur – peptide allogénique du donneur] (Herrera et al. 2004; Smyth et al. 2006).

Durant les trois premiers mois de la transplantation, la reconnaissance allogénique est initialement de type direct. Avec la décroissance des CPA issues du donneur, la reconnaissance allogénique se fait ensuite préférentiellement selon les modes indirect et semi-direct (Baker et al. 2001).

La Figure 16 ci-dessous illustre les différents modes impliqués dans l'initiation de la réponse immune allogénique au cours du temps.

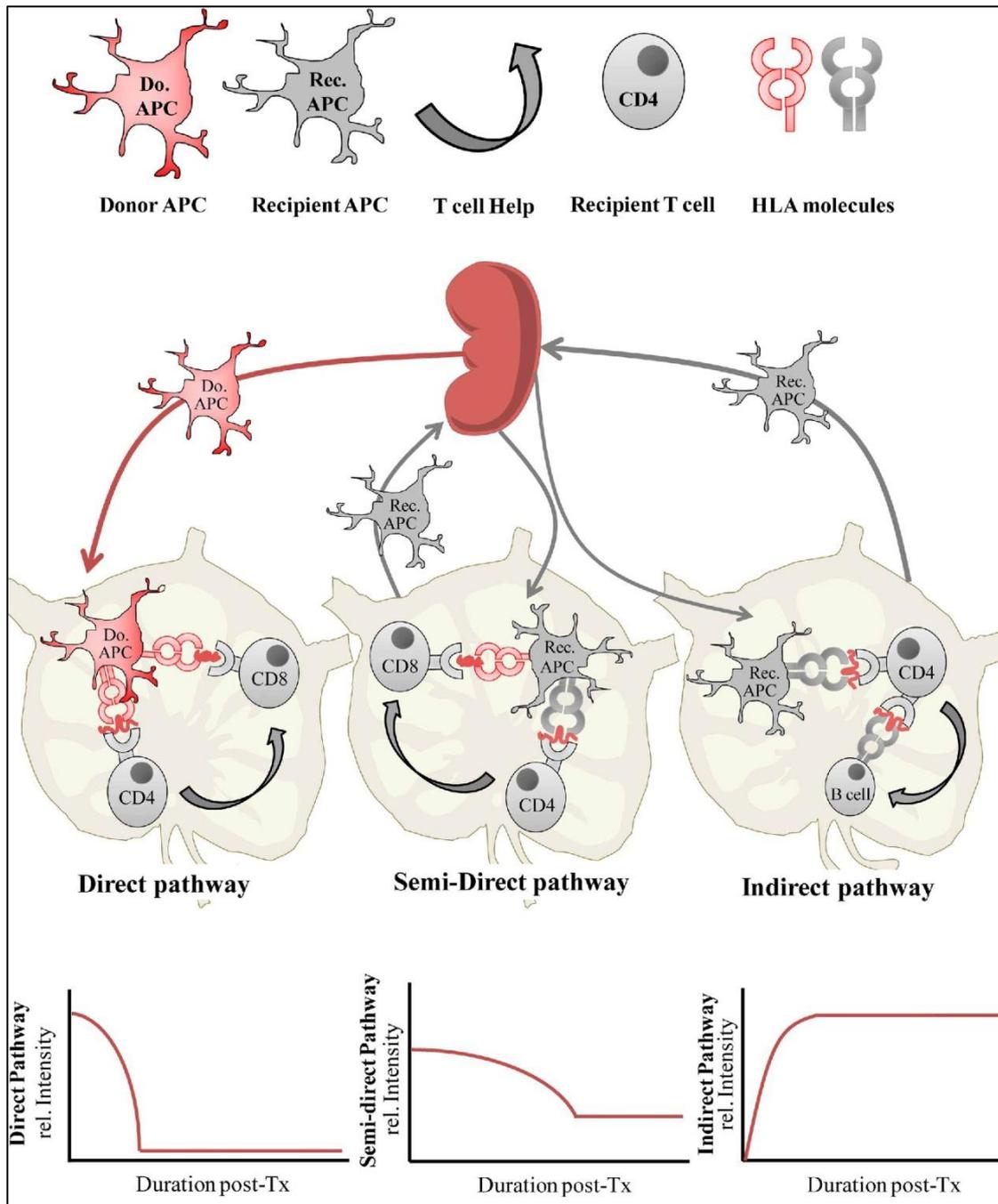


Figure 16 : Modes de reconnaissance allogénique impliqués dans l'initiation de la réponse immune du receveur contre l'organe transplanté (d'après (S. Jiang, Herrera, et Lechler 2004))

2.4 Rejets d'allogreffe

Différents types de rejet d'allogreffe ont été décrits en fonction de critères cinétiques, anatomopathologiques et des mécanismes immunitaires sous-jacents (Solez et Racusen 2013; Cornell, Smith, et Colvin 2008).

Le rejet hyper-aigu se manifeste dans les premières heures suivant la transplantation. Induit par la présence d'anticorps naturels préformés chez le receveur (tels que les anticorps anti-groupe sanguin ABO) ou lors d'une immunisation antérieure vis-à-vis du donneur, la fixation de ces anticorps sur l'endothélium vasculaire du greffon va activer la voie classique du complément et aboutir à la formation du complexe d'attaque membranaire, entraînant la destruction massive de l'organe transplanté. Dans le cadre des transplantations rénales, ce type de rejet est extrêmement rare du fait du strict respect de la compatibilité ABO et de l'évaluation de la compatibilité immunologique entre le donneur et le receveur comme étape préalable indispensable à la réalisation de la transplantation (Montgomery et al. 2011).

Le rejet aigu cellulaire se manifeste classiquement dans la première année post-greffe. Il est la conséquence de l'initiation de la réponse cellulaire T par une reconnaissance allogénique directe aboutissant à une activation lymphocytaire intense et rapide de type polyclonale. Grâce aux protocoles d'immunosuppression actuellement utilisés, ce type de rejet est relativement bien maîtrisé, son impact sur la fonction du greffon étant faible (survie à 1 an à près de 95%). Son risque de survenue s'est stabilisé à près de 15% dans la population des patients transplantés rénaux (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group 2009). Contrairement au rejet cellulaire, le rejet de type humoral, médié par les lymphocytes B, est de moins bon pronostic et représente un vrai challenge thérapeutique, les agents thérapeutiques utilisés ne permettant pas d'éliminer les allo-anticorps spécifiquement dirigés contre l'organe transplanté (Legendre et al. 2014).

Le rejet chronique se manifeste classiquement au-delà de la première année post-greffe. Il est responsable d'une fibrose accélérée avec perte précoce des greffons. Les mécanismes mis en jeu sont encore incertains. Ils pourraient impliquer à la fois des

mécanismes cellulaires et humoraux, les patients présentant des allo-anticorps spécifiques du greffon développant plus de rejet chronique (Palomar et al. 2005). Basé sur la disparition progressive des CPA du donneur, le mode de reconnaissance allogénique indirect a été initialement proposé comme un acteur majeur dans la survenue des rejets chroniques (Baker et al. 2001). Une fréquence accrue des LT capables d'alloreconnaissance indirecte a été mise en évidence sur plusieurs modèles expérimentaux puis confirmée chez des patients porteurs d'un rejet chronique d'allogreffe (Lee et al. 2001; Hornick et al. 2000; Vella et al. 1997). Cependant, la découverte récente de la reconnaissance semi-directe remet en cause l'implication exclusive du mode de reconnaissance allogénique indirect dans l'induction des rejets chroniques. Une activation lymphocytaire de type polyclonale pourrait persister tout au long de transplantation par l'intermédiaire de la reconnaissance allogénique semi-direct et participer ainsi à l'initiation d'un rejet chronique (Smyth et al. 2006).

3 Traitements immunosuppresseurs et mécanismes d'inhibition lymphocytaire

L'immunosuppression actuelle associe plusieurs molécules inhibants différents niveaux du cycle d'activation lymphocytaire. Ceci permet de bloquer efficacement et de façon synergique la réponse immune, tout en réduisant la toxicité inhérente à chaque immunosuppresseur (Halloran 2004).

Basée sur des recommandations internationales (KDIGO 2009), on distingue trois phases d'utilisation des thérapies immunosuppressives :

- un traitement initial d'induction permettant une immunosuppression puissante et rapide lors de l'initiation de la transplantation,
- un traitement d'entretien permettant une immunosuppression continue et bien tolérée,
- l'utilisation ponctuelle de stratégies immunosuppressives lors d'un épisode de rejet.

3.1 Traitement immunosuppresseur d'induction

On distingue deux agents utilisés dans ce type de traitement.

3.1.1 Anticorps polyclonaux anti-lymphocytaires

Ces anticorps déplétants polyclonaux ont des mécanismes d'action multiples. Ils sont dirigés contre des molécules de surface telles que CD2, CD3, CD4 ou des molécules impliquées dans les migrations leucocytaires et induisent la mort cellulaire par apoptose (Préville et al. 2001). Ils sont associés à une moindre incidence des rejets aigus de greffe, notamment chez les patients à haut risque immunologique (Noël et al. 2009; Brennan et al. 2006), mais induisent également une lymphopénie T profonde et durable avec un effet rémanent sur plusieurs années (Bamoulid et al. 2017). Cette lymphopénie prédominante sur les CD4 a été associée à un sur-risque de morbi-mortalité en post-greffe, en termes de complications infectieuses et néoplasiques (Ducloux et al. 2010; Brennan et al. 2006).

3.1.2 Inhibiteurs sélectifs du récepteur de haute affinité de l'IL-2 (anti-CD25)

Ces anticorps monoclonaux se fixent à la chaîne α du récepteur de l'IL-2, empêchant la formation du récepteur de haute affinité pour l'IL-2 et l'activation lymphocytaire. Sans induire de mort cellulaire, les anticorps anti-CD25 inhibent le signal de prolifération lymphocytaire.

Plusieurs études en populations à faible risque immunologique ont démontré une efficacité similaire entre ces deux molécules en termes de prévention primaire des rejets, avec un meilleur profil de tolérance pour les anticorps anti-CD25 (Mourad et al. 2004; Lebranchu et al. 2002). Il est néanmoins important de noter que dans les populations à haut risque immunologique, les anticorps polyclonaux déplétants ont montré une efficacité supérieure en termes de prévention primaire des rejets aigus (Brennan et al. 2006). L'utilisation de ce puissant agent déplétant est ainsi d'autant plus indiquée chez les patients à haut risque immunologique.

3.2 Traitement immunosuppresseur d'entretien

Les recommandations internationales préconisent une association de molécules immunosuppressives, incluant un inhibiteur de la Calcineurine et un agent antiprolifératif, associés ou non à une corticothérapie au long cours (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group 2009).

3.2.1 Les corticostéroïdes

Ces agents thérapeutiques agissent comme agonistes des récepteurs des glucocorticoïdes. Leurs effets immunosuppresseurs sont multiples et synergiques permettant d'inhiber la réponse immune en promouvant un état anti-inflammatoire. Molécules lipophiles traversant librement les membranes cellulaires, le complexe corticoïde-récepteur des glucocorticoïdes transloque dans le noyau et bloque le $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Il en résulte une inhibition de la synthèse de cytokines pro-inflammatoire (IL-1, IL-2, IL-6 ou IFN- γ).

A fortes doses, les corticoïdes entraînent une apoptose des LT, préférentiellement de type CD4. Ils possèdent également une action inhibitrice sur la maturation des cellules dendritiques, leur conférant un état pro-toléroène (Rhen et Cidlowski 2005).

3.2.2 Les inhibiteurs de la Calcineurine

La ciclosporine et le tacrolimus sont classés comme inhibiteurs de la calcineurine. Ils bloquent la transmission intranucléaire du premier signal d'activation lymphocytaire en ciblant spécifiquement la calcineurine. Malgré leurs nombreux effets secondaires (dont une néphrotoxicité irréversible à long terme), ces deux molécules représentent la pierre angulaire du traitement immunosuppresseur actuel. Leur mécanisme d'action passe par leur fixation membranaire à des cibles protéiques spécifiques, respectivement la cyclophiline et la FK-binding protein 12. Les complexes ainsi formés se lient à la calcineurine, bloquent son action de déphosphorylation de NFAT et empêchent la translocation nucléaire de ce facteur de transcription. De ce fait, les inhibiteurs de la calcineurine inhibent la synthèse d'IL-2 et l'activation lymphocytaire T (Clipstone et Crabtree 1993).

3.2.3 Les inhibiteurs de la synthèse des bases puriques

L'acide mycophénolique ou sa prodrogue, le mycophénolate mofétil, sont couramment utilisés. Ces molécules sont des inhibiteurs sélectifs de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), enzyme principalement impliquée dans la synthèse des bases puriques. Ces agents thérapeutiques inhibent la synthèse *de novo* des purines, bloquant ainsi la synthèse d'ADN, le passage du cycle cellulaire en phase S et *in fine* la prolifération lymphocytaire. L'action de l'acide mycophénolique est liée au fait que les lymphocytes sont majoritairement tributaires de l'expression de l'IMPDH pour la synthèse des bases puriques, entraînant ainsi une inhibition assez spécifique de la prolifération lymphocytaire.

Un autre effet de l'acide mycophénolique est un effet anti-inflammatoire avec des effets d'inhibition de la maturation des CPA, d'inhibition du recrutement de leucocytes ou d'induction de l'apoptose des LT (Allison et Eugui 2005).

3.2.4 Les inhibiteurs de la voie mTor

Le sirolimus et l'évérolimus sont les deux molécules les plus couramment utilisées. Ces agents thérapeutiques inhibent la voie mTOR, voie de signalisation impliquée dans l'initiation et la progression du cycle cellulaire (Wullschleger, Loewith, et Hall 2006). Les inhibiteurs de mTor bloquent le passage du cycle cellulaire à la phase S, empêchant ainsi la prolifération lymphocytaire (Sehgal 1998).

L'intérêt des inhibiteurs de mTOR pourrait reposer sur leurs effets antiprolifératifs, bénéfiques à long terme sur la dysfonction chronique du greffon et le risque néoplasique (Oberbauer et al. 2005; Campistol et al. 2006). Une étude sur le maintien à 3 mois post-greffe du sirolimus avec arrêt des inhibiteurs de la Calcineurine a montré que les inhibiteurs de mTOR ralentissaient l'évolution de la dysfonction chronique du greffon (Oberbauer et al. 2005). Ces molécules sont également décrites pour avoir un effet antiviral important (Bowman, Brueckner, et Doligalski 2018). Cependant, l'utilisation de ces molécules en pratique clinique est rendue difficile du fait de profils d'efficacité et de tolérance limités.

3.3 Nouveaux traitements immunosuppresseurs

3.3.1 Inhibiteur du second signal d'activation lymphocytaire

Le CTLA4-Ig (Belatacept) est une protéine de fusion, associant la molécule CTLA4 avec le fragment F_c d'une immunoglobuline G (Larsen et al. 2005). Le CTLA4-Ig entre en compétition avec la molécule de co-signal lymphocytaire CD28 et entraîne ainsi un signal d'inhibition lymphocytaire. Cette molécule très prometteuse, car dénuée de toute toxicité rénale, a récemment obtenu l'autorisation de mise sur le marché en traitement préventif des rejets de greffe (Wekerle et Grinyó 2012).

Le suivi sur 7 ans de patients transplantés rénaux retrouvait une amélioration significative de la survie des patients et des greffons dans le groupe traité par Belatacept comparé à celui traité par inhibiteurs de la Calcineurine (Vincenti et al. 2016). Bien que le Belatacept soit associé à une survenue plus fréquente de rejet aiguë cellulaire dans la première année post-greffe, ceux-ci n'avaient pas d'impact délétère sur la fonction du greffon à long terme (Vincenti et al. 2010; Wen et al. 2016).

De façon intéressante, le Belatacept a également été associé à une diminution du risque de survenue *de novo* d'anticorps spécifiques du donneur à la fois dans des modèles animaux (Young et al. 2016; E. J. Kim et al. 2014) mais également sur des cohortes de patients (Everly et al. 2017). Ces données font suspecter un effet protecteur du Belatacept contre la survenue d'une immunisation de type humorale. Il a été démontré que le CTLA4-Ig impact directement les centres germinatifs et les LT CD4 de type T_{FH}, empêchant ainsi la commutation isotypique des lymphocytes B activés (E. J. Kim et al. 2014; Sage et al. 2014).

Cependant, un des effets secondaires importants associés à l'utilisation du Belatacept était une augmentation de l'incidence des syndromes lymphoprolifératifs induits par l'Epstein-Barr Virus (EBV) chez les receveurs d'allogreffes rénales séronégatifs pour ce virus. Il en résulte une contre-indication stricte d'utilisation de ce traitement dans la population de patients non immunisés contre l'EBV.

3.3.2 Autres traitements en cours de développement

Une piste prometteuse porte sur l'inhibition de l'interaction CD40-CD40L dans des modèles de transplantation chez des primates non humains (S. C. Kim et al. 2017; Cordoba et al. 2015). Cet anticorps devrait diminuer l'activation des CPA, et de ce fait la densité d'expression des molécules de cosignaux. Par ailleurs, il est vraisemblable que cette molécule prévienne une immunisation de type humorale du fait de l'importance de l'interaction CD40-CD40L dans l'activation lymphocytaire B (van Kooten et Banchereau 2000).

D'autres molécules sont également en cours de développement tels que des molécules inhibitrices du premier signal d'activation lymphocytaire (inhibition pharmacologique des MAP kinases, ...) ou d'autres inhibant le trafic et l'adressage lymphocytaire (inhibiteur de S1P empêchant la sortie des LT des organes lymphoïdes secondaires).

La **Figure 17** ci-dessous représente les traitements immunosuppresseurs couramment utilisés en transplantation rénale et leurs mécanismes spécifiques d'inhibition lymphocytaire.

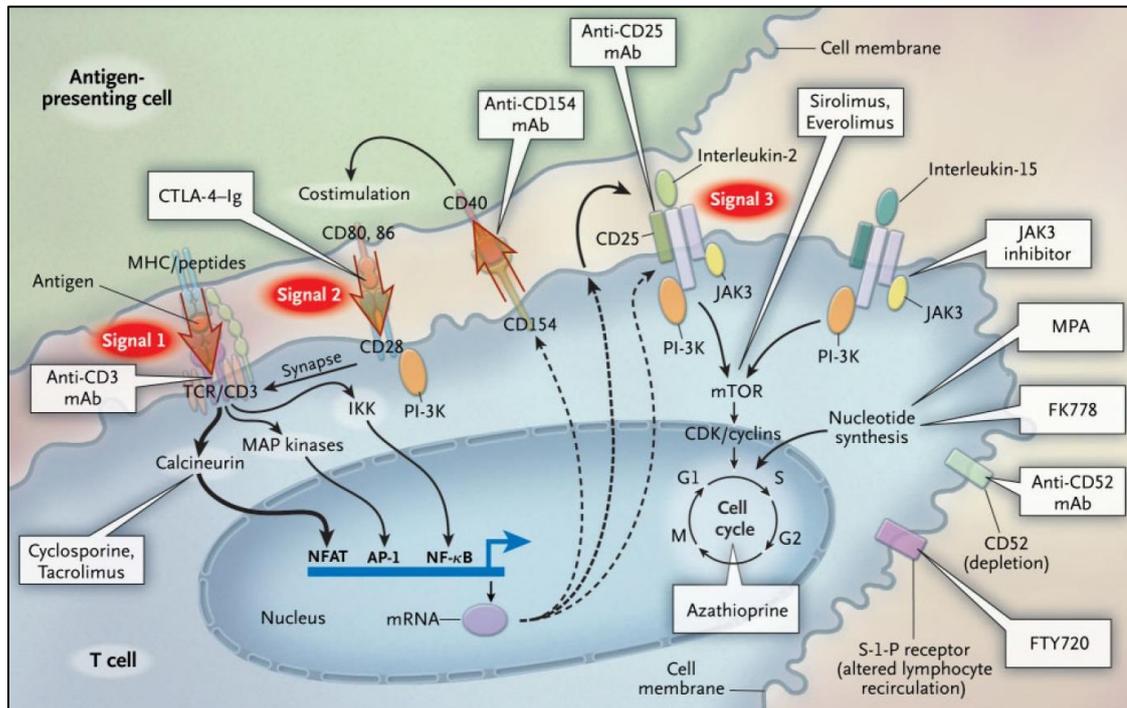


Figure 17 : Traitements immunosuppresseurs couramment utilisés en transplantation rénale et leurs mécanismes spécifiques d'inhibition lymphocytaire (d'après (Halloran 2004))

Le choix des protocoles immunosuppresseurs et donc du niveau d'immunosuppression thérapeutique sera fonction de différents critères, tels que le risque immunologique et les caractéristiques du receveur ou la qualité du greffon.

Néanmoins, il est actuellement impossible d'évaluer de façon personnalisé le niveau d'immunosuppression thérapeutique induit à un patient. L'établissement d'un équilibre entre réduction du risque de rejet et complications infectieuses et/ou néoplasiques liées à un excès d'immunosuppression reste donc une priorité.

4 Complications infectieuses en transplantation rénale

4.1 Chronologie des infections, une épidémiologie particulière

Les complications infectieuses en transplantation font partie des complications les plus fréquentes du traitement immunosuppresseur, touchant plus de 50% des patients transplantés dans la première année de greffe et responsable de décès dans 15 à 20% des cas (Briggs 2001). Bien que le risque infectieux perdure tout au long de la greffe, ce risque est majeur la 1^{ère} année.

La fréquence et le type d'infection varient en fonction de la période post-transplantation. On distingue classiquement trois phases :

- les infections survenant dans le premier mois post-greffe : Les infections postopératoires sont les plus classiques et sont souvent caractérisées par un taux élevé d'infections bactériennes multi-résistantes. Les infections transmises par le greffon (infections bactériennes ou à levures) sont plus rares mais extrêmement graves. Les infections opportunistes ne sont pas habituelles à cette période, sauf lors d'une immunosuppression importante préexistante à la transplantation.
- les infections survenant entre le 2^{ème} et le 6^{ème} mois : Les infections opportunistes de type bactériennes (pneumocystose, tuberculose, ...) et ou virales (réactivations virales secondaires aux *herpesvirus* ou aux *polyomavirus*) sont majoritaires, l'immunosuppression étant maximale. Depuis la mise en place systématique des prophylaxies anti-*herpesvirus* et anti-pneumocystose, ce risque infectieux a néanmoins diminué.
- les infections survenant au-delà du 6^{ème} mois : l'immunosuppression est en général progressivement allégée et la susceptibilité du patient aux infections est alors dépendante de la fonction du greffon rénal. En cas de bonne fonction du

greffon, le risque infectieux est légèrement supérieur à celui de la population générale. Par contre, en cas de dysfonction importante du greffon, les patients sont alors particulièrement exposés aux infections opportunistes. On assiste également à l'émergence des néoplasies viro-induites (J. Fishman 2007).

La Figure 18 ci-dessous représente la chronologie particulière de survenue des infections en post-transplantation.

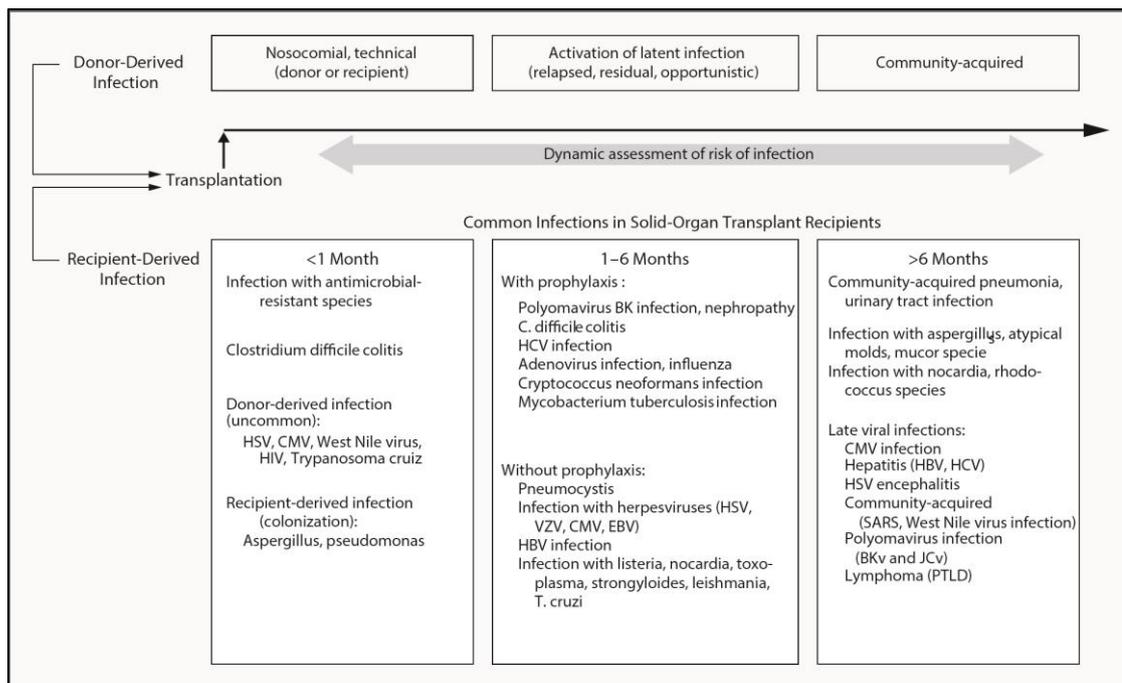


Figure 18 : Chronologie de survenue des infections en post-transplantation (d'après (J. Fishman 2007))

4.2 Cas particulier des réactivations virales par défaut d'immuno-surveillance

Tandis que les infections opportunistes de type bactériennes ou fongiques sont actuellement moins fréquentes, les infections virales, telles que les réactivations de virus du type *herpesvirus* ou *polyomavirus*, restent extrêmement problématiques (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group 2009). Dans les suites des primo-infections, ces virus ont la propriété de persister de façon latente dans l'organisme et de se réactiver ultérieurement en situation d'immunosuppression pour donner des infections récurrentes. Indépendamment des effets directs du pathogène, ces réactivations virales possèdent également des effets indirects, exposant le patient à un risque accru d'infection opportuniste, de néoplasie viro-induites (lymphome post-transplantation, sarcome de Kaposi, ...) ou de risque de rejet d'allo-greffe (Kotton et Fishman 2005).

4.2.1 Les herpes virus humains

Classification et structure virale

Virus ubiquitaires chez l'homme, huit espèces distinctes d'*Herpesviridae* sont actuellement connues et regroupées en 3 sous-familles.

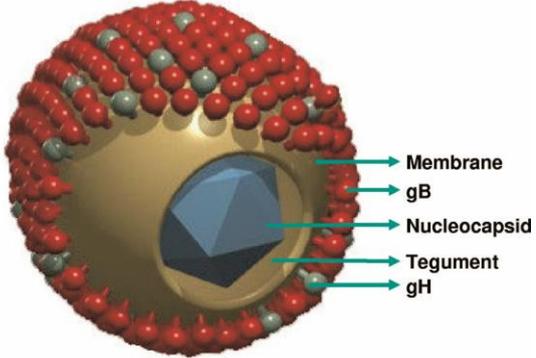
On distingue les *Alphaherpesvirinae* regroupant les *herpesvirus simplex* de types 1 et 2 (HSV-1 and -2) et le virus varicelle zona (VZV), les *Betaherpesvirinae* regroupant le cytomegalovirus (CMV) et les *herpesvirus humain* de types 6 et 7 (HHV-7), les *Gammaherpesvirinae* regroupant le virus Epstein-Barr (EBV) et l'*herpesvirus humain* de type 8 associé au sarcome de Kaposi (HHV-8) (Roizmann et al. 1992).

Les infections à *herpesvirus* correspondent à des modèles d'infections virales chroniques contrôlées par le système immunitaire en situation d'immunocompétence. Ainsi, après la primo-infection, le cycle naturel des *herpesvirus* oscille entre l'installation d'une latence virale et des épisodes de réactivations survenants en situation d'immunosuppression transitoires ou persistantes.

De structure virale semblable, les *herpesvirus* sont des virus enveloppés à ADN. Le virion est constitué d'une nucléocapside renfermant un ADN bicaténaire linéaire de grande taille (125 à 240 kb). La nucléocapside est elle-même enveloppée d'une matrice protéique (le tégument), secondairement recouverte d'une bicouche lipidique contenant des glycoprotéines virales (Roizmann et al. 1992).

La **Figure 19** schématise la classification des *herpesvirus* et identifie la structure des virions.

Classification of human herpesviruses			
Herpesvirus	Abbreviation		Size (kb)
	Common	Formal	
Alphaherpesvirinae			
Simplexvirus			
Herpes simplex virus type 1	HSV-1	HHV-1	152
Herpes simplex virus type 2	HSV-2	HHV-2	155
Varicellovirus			
Varicella-zoster virus	VZV	HHV-3	125
Betaherpesvirinae			
Cytomegalovirus			
HCMV	HCMV	HHV-5	227-236
Roseolovirus			
Human herpesvirus type 6	HHV-6	HHV-6	159-162
Human herpesvirus type 7	HHV-7	HHV-7	144-153
Gammaherpesvirinae			
EBV			
E BV	EBV	HHV-4	172-173
Rhadinovirus			
Human herpesvirus type 8	HHV-8	HHV-8	134-138



Structure of human herpesvirus virion

Figure 19 : Classification des herpesvirus et structure des virions (d'après (Crough et Khanna 2009))

Bien que tous les *herpesvirus* puissent se réactiver et induire des pathologies spécifiques en post-transplantation, les deux principales réactivations virales rencontrées par ordre de fréquence sont le Cytomégalovirus et l'Epstein Barr virus.

Le Cytomégalo­virus (CMV)

Épidémiologie, mode de transmission et physiopathologie

Le CMV est un virus ubiquitaire, avec une prévalence mondiale variant de 50 à 90 % (Lopo et al. 2011; Bate, Dollard, et Cannon 2010). La séroprévalence augmente avec l'âge, le sexe féminin et un niveau socio-économique bas (Cannon, Schmid, et Hyde 2010). De transmission large (via la salive, les expositions transplacentaires, l'allaitement maternel, les contacts sexuels, les transfusions sanguines ou les greffes d'organes ou de tissus), le réservoir du virus est strictement humain. La primo-infection chez les sujets immunocompétents est le plus souvent asymptomatique ou s'exprime par un syndrome pseudo-grippal. Le virus établit secondairement une latence virale dans les cellules mononuclées de la moëlle osseuse ou du sang périphérique, avec des épisodes de réactivations virales infracliniques en situation d'immunocompétence (Crough et Khanna 2009).

Cycle de réplication virale

L'infection est initiée par l'entrée du virus dans la cellule grâce à la fixation du virion à la membrane cellulaire puis fusion des deux membranes. Cette étape aboutie à la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule cible. Il n'existe pas de récepteur spécifique connu du CMV, les glycoprotéines de l'enveloppe virale interagissant avec de nombreuses protéines cellulaires. Le principal récepteur actuellement décrit est le récepteur du facteur de croissance épithéliale.

Après l'entrée du virus dans les cellules, la nucléocapside passe dans le noyau où les protéines structurales de la capsid sont dégradées et l'ADN viral libéré. Le cycle de réplication du CMV est long (96 à 120 heures). La transcription des gènes viraux s'effectue selon 3 phases coordonnées en cascade :

- une phase de réplication très précoce (phase IE pour Immediate Early) : les protéines produites régulent la transcription de leurs propres gènes et activent les promoteurs précoces et tardifs de la réplication virale. Les deux protéines essentielles à l'initiation du cycle viral sont les protéines IE1 et IE2.

- une phase de réplication précoce (phase E pour Early) aboutissant à la production des protéines de structure et d'enzymes impliquées dans la réplication virale comme l'ADN-polymérase. La réplication du génome débute à la 12^{ème} heure.
- une phase de réplication tardive (phase L pour Late) où le génome viral est dupliqué et les protéines structurales synthétisées.

Les nucléocapsides ainsi formées retournent dans le noyau pour être assemblés à l'ADN viral, traversent la membrane nucléaire et migrent vers le cytoplasme. Elles acquièrent à ce moment-là les protéines du tégment (dont la protéine pp65). Une fois intracytoplasmique, les virions sont ensuite excrétés dans le milieu extérieur où ils acquièrent alors la bicouche lipidique et entraînent la mort de la cellule hôte au 4-5^{ème} jour (Crough et Khanna 2009).

Réponse immunitaire cellulaire spécifique du CMV chez le sujet immunocompétent

L'infection par le CMV laisse une empreinte majeure dans le répertoire lymphocytaire T avec l'élaboration d'une forte réponse de type Th1 (Harari, Zimmerli, et Pantaleo 2004). Dans une population de porteurs sains, la réponse cellulaire spécifique du CMV représentait près de 10% des LT CD4 et CD8 totaux (Sylwester et al. 2005; Khan et al. 2004). Parmi plus de 200 épitopes antigéniques, deux peptides antigéniques immunodominants sont largement reconnus: l'Immediate Early protein 1 (IE-1) et la phosphoprotéine 65 (pp65) (van de Berg et al. 2008; Villacres et al. 2004).

L'infection à CMV correspond à un modèle d'exposition antigénique prolongée au système immunitaire avec persistance virale et faible charge antigénique. Il en résulte une stimulation chronique de l'immunité cellulaire avec instauration d'une forte réponse immunitaire de type polyfonctionnelle (Lachmann et al. 2012; Harari et al. 2006). La comparaison de la réponse lymphocytaire T en réponse à différents modèles infectieux (tétanos, *herpesvirus* et HIV) retrouvait des LT spécifiques du CMV polyfonctionnelles (LT CD4 et CD8 dotés de capacités de sécrétions cytokiniques multiples de type IL-2,

IL-2/IFN- γ et IFN- γ et associés à des capacités prolifératives) (Jackson et al. 2017; Harari et al. 2005; Zimmerli et al. 2005). De façon intéressante, il a été démontré que même si l'état de différenciation lymphocytaire des LT spécifiques du CMV était majoritairement représenté par des T_{EM} et T_{ET}, ces cellules étaient dotées de capacités de polyfonctionnalité importantes (Jackson et al. 2017; Riou et al. 2012).

Le CMV en transplantation rénale : gestion du risque infectieux

En transplantation rénale, l'infection par le CMV demeure une des infections virales les plus fréquentes avec une morbi-mortalité non négligeable pour le patient et le greffon (Kotton et al. 2018; J. A. Fishman 2013).

Trois modes d'infection à CMV sont possibles :

- la primo-infection d'un receveur séronégatif pour le CMV à partir d'un greffon ou d'une transfusion de donneur séropositif,
- la réinfection par une nouvelle souche de CMV,
- la réactivation d'une infection latente chez un receveur préalablement immunisé.

Une infection à CMV est définie par la détection d'une réplication virale sanguine en l'absence de symptômes tandis qu'une maladie à CMV est définie par une infection à CMV accompagnée de signes cliniques et/ou biologiques (Kotton et al. 2018). Le tableau le plus fréquent est celui d'un syndrome pseudo-grippal avec cytolyse hépatique. Il peut s'y associer des atteintes spécifiques d'organes (forme invasive de la maladie à CMV). L'atteinte digestive est très fréquente chez les patients transplantés rénaux (I. Helanterä et al. 2014). Sur une large cohorte de patients transplantés rénaux, la fréquence globale de l'infection à CMV était de 23.6% tandis que celle des maladies à CMV était de 19.2%, avec une médiane de réactivation virale à 11 semaines post-transplantation (I. Helanterä et al. 2014).

Le diagnostic virologique repose sur la mise en évidence d'une réplication du CMV par PCR plasmatique quantitative. Dans les formes invasives digestives ou pulmonaires, la PCR peut être positive sur le tissu concerné mais négative au niveau plasmatique (Kotton et al. 2018).

La survenue d'une infection à CMV est également associée à un risque accru de rejet d'allogreffe et/ou d'infections opportunistes (Linares et al. 2011). Ce sur-risque s'explique par les effets indirects d'une réplication du CMV tels que l'induction d'un état pro-inflammatoire ou une stimulation croisée de la réponse allo-immune (Kotton et Fishman 2005).

La **Figure 20** ci-dessous illustre les effets directs et indirects d'une réactivation du CMV en situation d'immunosuppression.

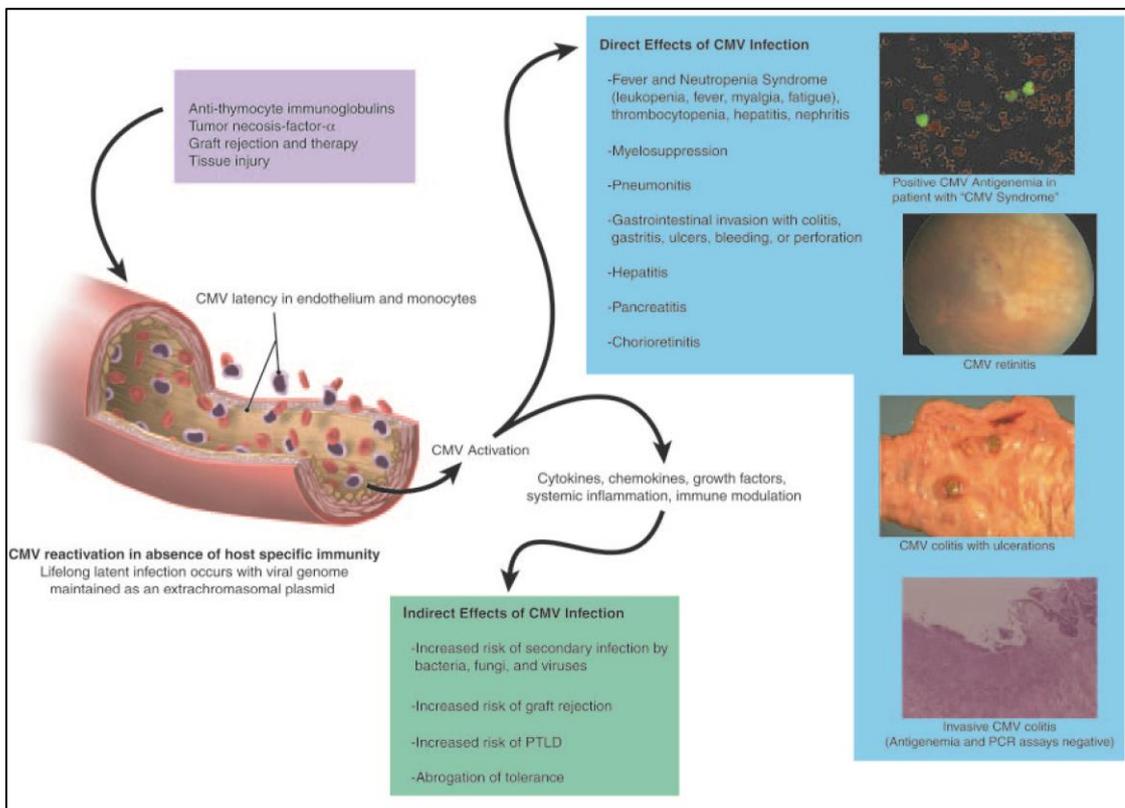


Figure 20 : Réactivation virale et effets directs et indirects d'une infection à CMV en transplantation rénale (d'après (Kotton et Fishman 2005))

La prise en charge du CMV a fait l'objet en 2013 d'une conférence de consensus quant à la gestion du diagnostic, du monitoring et du traitement approprié (Kotton et al. 2013). Concernant les patients séronégatifs transplantés avec un donneur séropositif pour le CMV (D+/R-), une prophylaxie systématique anti-CMV de 3 à 6 mois est recommandée en post-transplantation (traitement systématique par valganciclovir, inhibiteur de l'ADN polymérase).

Concernant les patients séropositifs pour le CMV avant la transplantation, il n'y a pas de recommandation consensuelle. Deux attitudes thérapeutiques sont proposées : une prophylaxie systématique anti-CMV ou une stratégie préemptive. La stratégie préemptive est basée sur la détection précoce d'une répllication plasmatique à CMV et l'initiation d'un traitement curatif au-delà d'une valeur seuil de charge virale (Kotton et al. 2013). Des méta-analyses récentes comparant ces deux stratégies étaient plutôt en faveur d'un traitement prophylactique systématique du fait d'une diminution du risque de survenue de maladie à CMV, d'une diminution du risque de réactivation des autres *herpesvirus* ainsi que d'une diminution d'incidence des rejets d'allogreffe (Hodson et al. 2013; Rawal et al. 2012; Witzke et al. 2012). Cependant, la prophylaxie systématique pose la question des effets secondaires et du coût financier liés à l'utilisation prolongée des antiviraux, ainsi que l'apparition de résistance virale au ganciclovir (Myhre et al. 2011).

Le virus Epstein Barr (EBV)

Épidémiologie, mode de transmission et physiopathologie

Affectant la quasi-totalité des individus, la primo-infection EBV survient habituellement dans l'enfance ou l'adolescence. Elle est le plus souvent asymptomatique ou caractérisée par un tableau de mononucléose infectieuse. La transmission du virus se fait par voie salivaire, l'entrée du virus dans l'organisme se faisant au niveau des voies aériennes supérieures (Balfour, Dunmire, et Hogquist 2015). Chez les sujets immunocompétents, le rôle de l'EBV dans l'oncogenèse du carcinome du nasopharynx, des lymphomes de Burkitt et des lymphomes de Hodgkin est maintenant bien démontré (Cohen 2000). L'EBV est capable *in vitro* d'immortaliser des lymphocytes B en lignées de cellules lymphoblastoïdes et d'activer le pro-oncogène *c-myc*. L'expression de ce pro-oncogène résulte en une augmentation des capacités de prolifération tumorales des cellules lymphoblastoïdes (Inghirami et al. 1990).

Cycle de réplication virale

L'infection est initiée par l'entrée du virus dans les cellules épithéliales oropharyngées et les lymphocytes B. L'EBV se fixe sur la membrane cellulaire par interaction entre la glycoprotéine gp350 de l'enveloppe virale et le récepteur CD21. De façon commune aux *herpesvirus*, le cycle de réplication virale comprend une phase de réplication très précoce, une phase de réplication précoce et une phase de réplication latente.

L'EBV induit deux types d'infections cellulaires :

- une infection répllicative (appelée également cycle lytique) où des particules virales sont excrétées dans le milieu extérieur, aboutissant à la mort de la cellule,
- une infection non productive (appelée également phase de latence) dans laquelle seul certains gènes sont exprimés, permettant la survie de la cellule infectée.

L'infection à EBV induit ainsi l'activation des lymphocytes B infectés aux niveaux de centres germinatifs, aboutissant à une prolifération lymphocytaire B de type

polyclonale. Les protéines EBNA2 (protéine nucléaire) et LMP (protéine membranaire) jouent un rôle déterminant dans la transformation cellulaire et l'immortalisation des lymphocytes B activés (Küppers 2003). Chez l'hôte immunocompétent, cette prolifération lymphocytaire B est rapidement contrôlée par le système immunitaire (Cohen 2000).

Réponse immunitaire cellulaire spécifique de l'EBV chez le sujet immunocompétent

L'infection à EBV induit une stimulation chronique et répétée du système immunitaire avec l'établissement d'une réponse cellulaire de type T_h1 augmentant avec l'âge. Le suivi pendant 12 mois de porteurs sains de l'EBV a mis en évidence la survenue d'au moins une réactivation EBV asymptomatique chez 12 des 14 individus suivis. Ces épisodes de réactivation virale étaient associées à l'augmentation d'activité d'un clone lymphocytaire T CD8 spécifique (Vogl et al. 2012). Dans une cohorte de porteurs sains de l'EBV, les individus âgés de plus de 50 ans avaient une fréquence plus élevée de LT sécréteurs de cytokines (IL-2, IFN- γ , TNF- α et IL-6) comparé aux sujets de moins de 50 ans (Cárdenas Sierra et al. 2014). De façon intéressante, les capacités de réponse des LT spécifiques de l'EBV semblent dépendantes d'une co-infection avec le CMV. En effet, dans une population âgée, l'amplitude de la réponse T spécifique de l'EBV était stable chez les sujets coinfectés par le CMV, tandis que cette réponse augmentait chez les sujets non infectés par le CMV (Khan et al. 2004). Les réponses lymphocytaires de type CD4 et CD8 spécifiques de l'EBV apparaissent néanmoins dotées de capacités distinctes en termes de fréquence, d'ampleur de réponse spécifique et d'immunodominance (Martinez et Krams 2017). Parmi les nombreux épitopes antigéniques viraux, les peptides immunodominants reconnus par les LT CD8 spécifiques de l'EBV sont les protéines de réplication très précoce BZLF1 et BMLF1 et la protéine de réplication latente EBNA3 (Hislop et al. 2007). D'autres protéines telles que EBNA1 sont plutôt immunodominants dans la réponse lymphocytaire de type CD4 (Heller et al. 2007).

L'EBV en transplantation rénale : gestion du risque de lymphoprolifération post-greffe

Une réplication active de l'EBV est responsable d'un risque élevé de lymphomes non hodgkiniens en post-transplantation (LNHPT) (Dharnidharka et al. 2016). En France, l'incidence des LNHPT après transplantation rénale a été récemment évaluée à 0.4% à 1 an et 2.1% à 10 ans (Caillard et al. 2012, 2006). Le risque relatif de LNHPT après transplantation rénale était retrouvé 11.8 fois supérieur à celui d'une population non transplanté, avec une mortalité de près de 50% (Opelz et Döhler 2004). L'incidence des LNHPT varie selon l'organe transplanté, avec une incidence plus élevée en transplantation cardiaque et/ou pulmonaire. Elle est également plus élevée en population pédiatrique (taux d'incidence de 16% à 5 ans) (Green et Michaels 2013).

Les LNHPT se distinguent des lymphomes des sujets immunocompétents par leur caractère viro-induit démontré, leur localisation extra-ganglionnaire fréquente avec possibilité d'une atteinte cérébrale et/ou de l'organe transplanté et leur réponse potentielle à la baisse de l'immunosuppression (Dharnidharka et al. 2016).

Les facteurs de risque identifiés sont l'âge, la transplantation d'un greffon EBV-séropositif à un receveur séronégatif et une immunosuppression intense (Caillard et al. 2012). Les facteurs de risque diffèrent selon le délai de survenue des LNHPT. Le pic de survenue est classiquement entre la 1^{ère} et la 2^{ème} année puis entre la 5^{ème} et la 10^{ème} année post-greffe, définissant des LNHPT de survenue précoce et de survenue tardive. Les LNHPT de survenue précoce sont significativement associés à une primo-infection EBV et un âge de moins de 20 ans tandis que ceux de survenue tardive sont associés à un âge plus tardif (Quinlan et al. 2011).

Ainsi, du fait de son rôle dans l'oncogénicité, l'évaluation de la charge virale plasmatique EBV est recommandée chez tous les receveurs d'allogreffe, à visée diagnostic et/ou de suivi (Ohga et al. 2001). Le traitement des LNHPT inclut un allègement de l'immunosuppression et une chimiothérapie à base d'anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement le lymphocyte B (anticorps antiCD20, Rituximab). Cette chimiothérapie peut être plus ou moins associée à un protocole de chimiothérapie plus intensive dans les formes les plus sévères

4.2.2 Les polyomavirus humains

Classification, physiopathologie et structure virale

Les *polyomavirus* sont des virus ubiquitaires, infectants de nombreuses espèces animales avec une spécificité d'espèce. Chez l'homme, 13 espèces distinctes sont actuellement décrites. La caractéristique commune de ces virus est leur capacité de réactivation et de pathogénie en situation d'immunosuppression, et notamment de type cellulaire (Hirsch et al. 2014). Ainsi, le caractère pathogène des *polyomavirus* humains a été découvert dans les années 1970 avec la mise en évidence des virus BK (BK-v) et JC (JC-v) dans la survenue de pathologies infectieuses chez des patients immunodéprimés (Gardner et al. 1971; Padgett et al. 1971).

Les *polyomavirus* sont de petits virus non enveloppés à ADN bicaténaire. L'absence d'enveloppe confère à ces virus une relative résistance dans le milieu extérieur. La capsid virale mesure environ 45nm de diamètre et est formée de 3 protéines : VP1, VP2 et VP3. La protéine VP1 représente le constituant majoritaire de la capsid virale et assure un rôle majeur dans son assemblage. VP1 est également impliqué dans l'entrée du virus à l'intérieur de la cellule hôte. Contenu dans la capsid, le génome viral est constitué d'une molécule unique d'ADN double brin circulaire d'environ 5000 paires de base. Les ADN du BK-v, du JC-v mais également du SV40 (*polyomavirus* simien) présentent près de 80% d'homologie de séquence et ont une organisation génomique commune. Le génome viral est ainsi divisé en 3 régions hautement conservées au sein des différents *polyomavirus* :

- une région non-codante (ou région NCCR pour « non coding control region ») comprenant l'origine de répllication de l'ADN viral. Cette région semble d'une importance cruciale dans la capacité de répllication virale. Ainsi, les variants hautement pathogènes en situation d'immunosuppression présentent des réarrangements de la région NCCR, leurs conférant une plus grande capacité de répllication (Ajuh et al. 2018).

- deux régions codantes et fonctionnellement distinctes :

- une région précoce aboutissant à la formation de protéines non structurales : les protéines LT-Ag pour « large-tumor-antigen » et sT-Ag pour « small-tumor-antigen » sont impliquées dans la régulation du cycle de réplication virale et sont responsables des propriétés oncogènes des polyomavirus par la régulation de la protéine de mort cellulaire p53.
- une région tardive aboutissant à la formation des protéines de la capsid virale VP1, VP2 et VP3 (Ugo Moens et al. 2017; Bhattacharjee et Chattaraj 2017).

La Figure 21 ci-dessous illustre la structure génomique et la représentation schématique des *polyomavirus* humains.

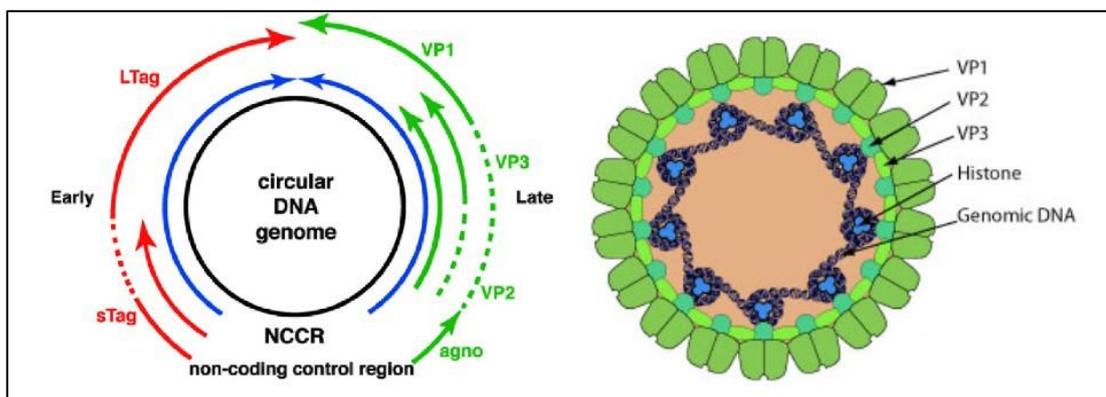


Figure 21 : Structure génomique et représentation schématique des polyomavirus humains (d'après (Dalianis et Hirsch 2013) et viralzone.expasy.org)

Épidémiologie et mode de transmission

La séroprévalence des *polyomavirus* humains est très élevée au niveau mondial (80 - 90% pour le BK-v et le JC-v à l'âge adulte), indiquant une exposition virale précoce et large (Gossai et al. 2016; Stolt et al. 2003).

Le Tableau 3 ci-dessous illustre la séroprévalence chez l'adulte des différents *polyomavirus* humains à travers le monde (Dalianis et Hirsch 2013).

Tableau 3 : Séroprévalence des polyomavirus humains à travers le monde dans la population adulte (d'après (Dalianis et Hirsch 2013))

HPyV	Seroprevalence in adults (%)	Country
BKV	82–99	USA, Australia, Italy
JCV	39–81	USA, Australia, Italy
KIPyV	55–90	USA
WUPyV	69–98	USA
MCPyV	60–81	Italy
HPyV6	69	USA
HPyV7	35	USA

La primo-infection a lieu habituellement dans l'enfance et est le plus souvent asymptomatique. L'infection à BK-v apparaît être la plus précoce, 98% des enfants âgés de 7 à 9 ans présentant des anticorps anti-BK-v, tandis que l'infection à JC-v semble plus tardive (anticorps anti-JC-v présents chez 72% de la population de plus de 25 ans) (Stolt et al. 2003).

Du fait de la difficulté d'identifier la primo-infection, la transmission interhumaine et les modes de transmission des *polyomavirus* sont toujours débattus. Trois modes de

transmission sont proposés et pourrait varier selon le virus impliqué (Gjoerup et Chang 2010). Le BK-v pourrait être transmis par voie salivaire. En effet, un portage salivaire du BK-v a été décrit ainsi que la capacité du virus a infecté *in vitro* les cellules épithéliales des glandes salivaires (Jeffers, Madden, et Webster-Cyriaque 2009). Un autre mode de transmission proposé pour l'infection à BK-v ou JC-v est une transmission oro-fécale, à travers l'ingestion d'eau ou de nourriture contaminées (McQuaig et al. 2006). Pour le JC-v, une transmission intrafamiliale semble fréquente, les mêmes souches de JC-v étant identifiées au niveau intrafamiliale (Kunitake et al. 1995). Enfin, une transmission par voie respiratoire semble probable dans les cas de transmissions de KIPyV et WUPyV (Ren et al. 2008).

Cycle de réplication virale

L'entrée du virus dans la cellule hôte est initiée par la fixation du virion à la membrane cellulaire par la protéine virale VP1. Les récepteurs cellulaires des *Polyomavirus* sont des protéines de surface de la membrane plasmique tels que les gangliosides et les glyco-protéines N-glycosylées. La fixation du virion à la membrane cellulaire entraîne alors son endocytose. Les virus BK-v, MPyV et SV40 semblent converger vers la même voie de transit intracellulaire en faisant intervenir les cavésomes. Seul le JC-v semble emprunter une voie dépendante de la clathrine (Bhattacharjee et Chattaraj 2017). Après endocytose, les virions gagnent le réticulum endoplasmique puis le noyau. L'ADN viral est alors libéré, permettant la réplication du génome viral. Une fois synthétisées, les protéines structurelles s'auto-assemblent. Les particules virales *de novo* sont alors libérées dans le milieu extérieur, le plus souvent par lyse cellulaire (Ambalathingal et al. 2017). Cependant, des mécanismes autophagiques ou de libération de virions sans lyse cellulaire ont également été décrits (Bhattacharjee et Chattaraj 2017).

Les *polyomavirus* ont un tropisme tissulaire spécifique, la réplication virale pouvant même être restreinte à un type cellulaire donné. Ainsi, le BK-v et le JC-v ont un tropisme tissulaire pour les cellules épithéliales du tractus urinaire. Une réplication

virale asymptomatique de BK-v et de JC-v au niveau urinaire était fréquente dans la population générale (respectivement, 7 et 19% chez les sujets sains, ce taux pouvant atteindre 13% chez la femme enceinte et 70% chez les sujets âgés (Egli, Infanti, et al. 2009; Csoma et al. 2012; Zhong et al. 2007)). L'excrétion urinaire de JC-v apparaît plus fréquente et plus soutenue que celle de BK-v (Polo et al. 2004). Ce portage urinaire n'était associé à aucune répllication virale sanguine chez les sujets sains (Egli, Infanti, et al. 2009). Le tube digestif a également été identifié comme un site d'excrétion du BK-v et du JC-v. En effet, l'ADN viral de ces virus a été détecté dans les selles dans 1 à 8% des cas, ce taux de détection étant plus élevé pour le JC-v (Bialasiewicz et al. 2009; Vanchiere et al. 2009). Après la primo-infection, le cycle naturel des *polyomavirus* oscille entre l'installation d'une latence virale et des épisodes de réactivations asymptomatiques.

Réponse immune cellulaire spécifique des polyomavirus chez le sujet immunocompétent

Les LT spécifiques du BK-v et du JC-v reconnaissent une large variété de peptides tels que les peptides dérivés des protéines VP1, VP2, VP3, LT-Ag et sT-Ag (K. Mueller et al. 2011; Binggeli et al. 2007; Randhawa et al. 2006). Néanmoins, les peptides antigéniques issus de la protéine virale VP1 ont été associés à une plus forte réponse immune spécifique du BK-v (Binggeli et al. 2007; Y. Chen et al. 2006) ou du JC-V (R. A. Du Pasquier et al. 2004).

La réponse immune spécifique du BK-v est majoritairement de type CD4 et dépendante de l'âge. L'intensité de cette réponse était d'autant plus élevée chez les sujets jeunes, avec un pic de prévalence entre 20 et 30 ans et un déclin plus prononcé à distance de la primo-infection. Cette réponse spécifique était de type polyfonctionnelle avec des capacités de sécrétions cytokiniques multiples, de prolifération, de cytotoxicité et de forte présentation antigénique avec expression soutenue de CD40L (Schmidt et al. 2014; Ramaswami et al. 2011).

L'étude de la réponse immune de type CD8 retrouvait des LT CD8 de type T_{EM} polyfonctionnelles mais dotés de faibles capacités de cytotoxicité directe (faible expression de Granzyme B). En comparaison aux LT spécifiques du CMV, les LT spécifiques du BK-v étaient beaucoup moins fréquents (0,004% pour les LT spécifiques du BK-v contre 1,63% pour les LT spécifiques du CMV) avec un état de différenciation plus avancé (van Aalderen et al. 2013).

Complications des polyomavirus en situation d'immunosuppression

Les *polyomavirus* sont pathogènes en situation d'immunodépression, la survenue de ces complications étant d'origine multifactorielle.

Les complications liées à la réactivation du BK-v sont essentiellement décrites en transplantation rénale, avec la survenue de néphropathie à BK-v et de sténose urétérale, ou en allo-greffe de cellules souches hématopoïétiques avec la survenue de cystite hémorragique (Dalianis et Hirsch 2013). La survenue de telles complications est cependant relativement rare dans les autres transplantations d'organes solides (Viswesh, Yost, et Kaplan 2015), sous-tendant des mécanismes physiopathologiques complexes (Hirsch et Steiger 2003).

La réactivation du JC-v est responsable de la leuco-encéphalopathie multifocale progressive. Cette complication neurologique est associée à un profond déficit de l'immunité cellulaire (C. Tan et Korálnik 2010). Historiquement décrite comme une complication du VIH au stade SIDA, sa fréquence et sa sévérité sont dépendantes du type d'immunosuppression induit (Calabrese, Molloy, et Berger 2015; Misbah 2017), que ce soit dans le cadre de l'infection chronique par le VIH (Garvey et al. 2011) ou dans les suites d'un traitement par biothérapies (Major 2010) ou après transplantation d'organe (Mateen et al. 2011).

Dotés de pouvoir oncogène, les *polyomavirus* MCPyV et TSPyV ont été associés à la survenue de deux rares maladies cutanées prolifératives, le carcinome de Merkel et la trichodysplasie spinulosique (Sastre-Garau et al. 2009; Feng et al. 2008; Kazem et al. 2012).

Le virus BK et risque de néphropathie à BK-v : gestion du risque infectieux

Les infections à BK-v correspondent le plus souvent à une réactivation virale à partir de l'épithélium urinaire. On distingue plusieurs stades de réactivations à BK-v (Hirsch et al. 2014).

Une virurie à BK-v représente une réplication virale exclusivement urinaire du BK-v. Observée chez près de 40% des patients transplantés rénaux (KTR), elle survient classiquement dans les 3 à 6 premiers mois de la transplantation (Hirsch et al. 2013). Lors d'une forte charge virale urinaire (classiquement $\geq 10^7$ copies/mL), l'atteinte massive de l'épithélium urinaire se manifeste par la présence de *decoy cells* (cellules à gros noyaux avec des inclusions basophiles).

Une virémie à BK-v isolée représente une réplication virale sanguine, sans atteinte tissulaire spécifique du greffon rénal. Observée chez près de 24% des KTR, elle survient classiquement dans les 12 premiers mois de la transplantation (Hirsch et al. 2013).

Une Nx BK-v est diagnostiquée chez près de 10% des KTR et survient classiquement dans les 24 premiers mois post-greffe (Hirsch et al. 2014, 2002). Néanmoins, une survenue tardive de la Nx BK-v était diagnostiquée dans près de 18% des cas, les facteurs de risques identifiés étant le sexe masculin et les greffes combinées rein-pancréas (Imlay et al. 2018).

Faisant suite à une réplication intra-parenchymateuse du BK-v, les Nx BK-v sont associées à des dysfonctions et des pertes de greffons dans plus de 50% des cas. Dans le contexte actuel de pénurie d'organes, la Nx BK-v représente la première cause infectieuse de perte des greffons rénaux (Hirsch et al. 2014).

La Figure 22 présente la fréquence de réactivation du BK-v après transplantation rénale en termes de virurie à BK-v, de virémie à BK-v, de Nx BK-v et de dysfonction chronique/perte de greffons rénaux.

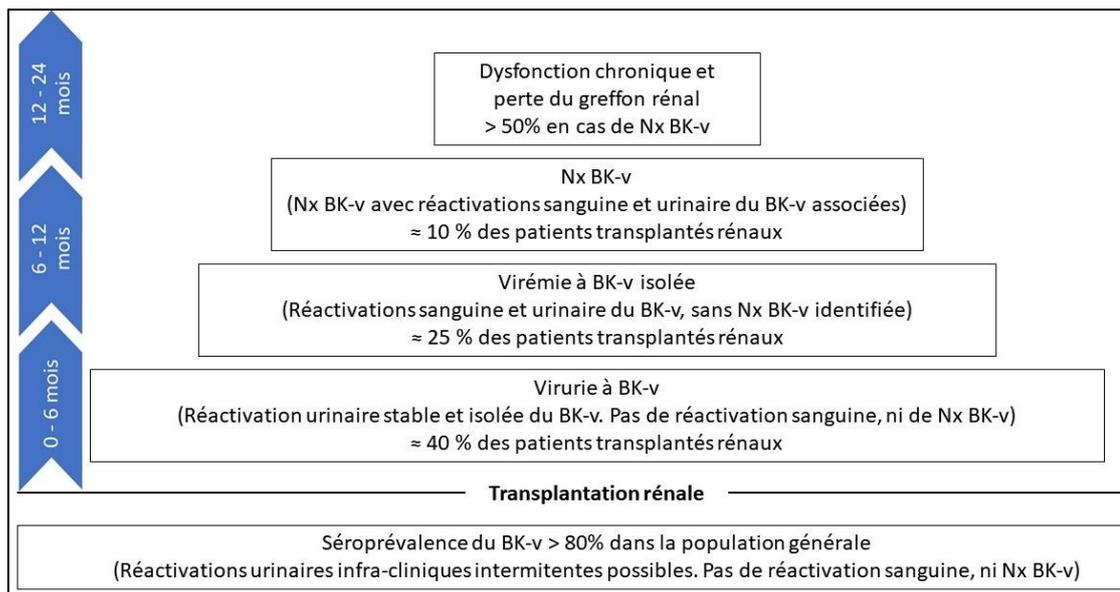


Figure 22 : Fréquence de réactivation du BK-v après transplantation rénale en termes de virurie, de virémie à BK-v isolée, de Nx BK-v et de dysfonction chronique/perte de greffons rénaux

Démarche diagnostique actuelle de la Nx BK-v

La démarche diagnostique de la Nx BK-v actuellement recommandée (Figure 23) repose sur le suivi longitudinal de la charge virale BK-v sanguine et la réalisation d'une biopsie du greffon rénal en cas de dégradation de la fonction du greffon et/ou d'une charge BK-v sanguine $\geq 10^4$ copies/mL pendant au moins 4 semaines (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group 2009; Hirsch et al. 2014).

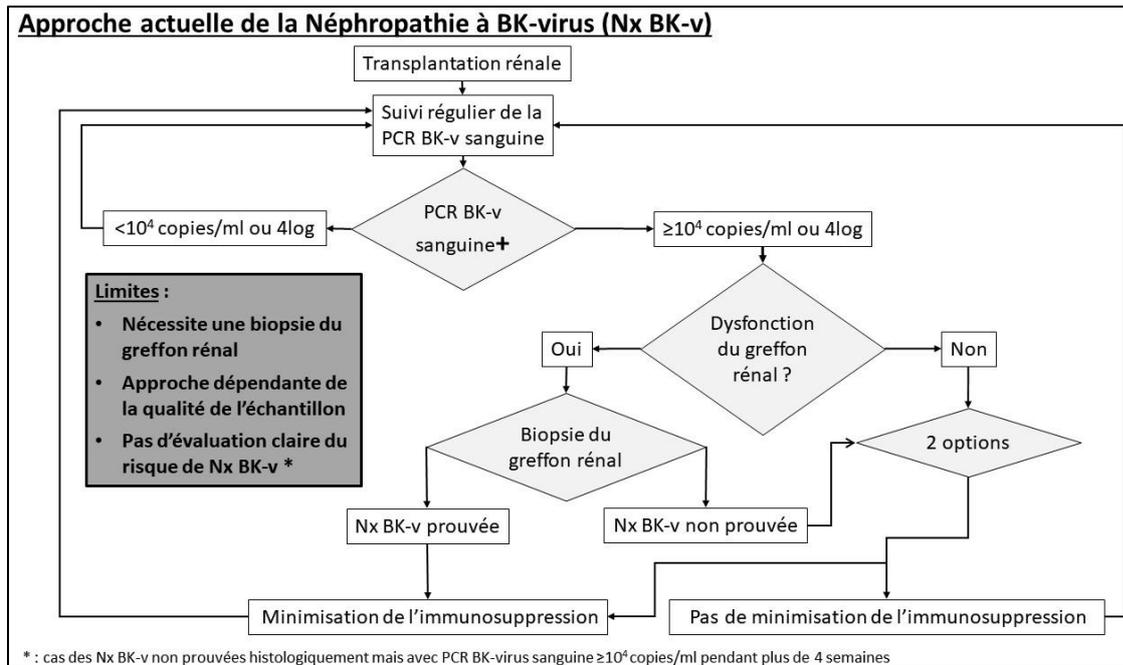


Figure 23 : Approche actuelle de la Nx BK-v, basée sur l'évaluation de la charge virale sanguine du BK-v et sur la biopsie du greffon rénal.

Le suivi longitudinal de la charge virale BK-v peut se faire tel que proposé par les recommandations internationales par la réalisation d'une PCR BK-v de façon mensuelle les 6 premiers mois, puis tous les 3 mois jusqu'au 12 ou 24^{ème} mois ou lors d'une altération inexplicée de la fonction du greffon ou après traitement d'un rejet de greffe (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group 2009; Hirsch et al. 2014). Il est néanmoins important de signaler qu'il existe actuellement une grande disparité de prise en charge diagnostique de la Nx BK-v du fait d'une absence de standardisation des recommandations internationales (Gabardi et al. 2018).

Le seuil limite de détection d'une charge virale BK-v considéré comme positive est au-delà de 200 copies/mL. Cependant, la détection du BK-v au niveau plasmatique n'est pas nécessairement associée à une Nx BK-v. Si une charge virale BK-v supérieure à 10^4 copies/mL de sang est associée à une sensibilité de plus de 90%, ce test n'est pas suffisamment performant pour le diagnostic de Nx BK-v, sa valeur prédictive positive

ne dépassant pas 55% (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group 2009; Chung et al. 2012; Godinho Pinto et al. 2016).

Le **Tableau 4** ci-dessous présente les performances de prédiction du risque de Nx BK-v en fonction de la PCR BK-v plasmatique quantitative.

Tableau 4 : Performances de prédiction du risque de Nx BK-v en fonction de la PCR BK-v sanguine quantitative

Etude	n	Technique	Seuil de positivité	Se (%)	VPP (%)	VPN (%)
Chung et al. 2012	376	PCR BK-v plasmatique	$> 10^4$ copies/mL	100	54.5	100
Godinho Pinto et al. 2016 (<i>méta-analyse</i>)	1694	PCR BK-v plasmatique	> 4.2 log	96	50	100
Godinho Pinto et al. 2016 (<i>méta-analyse</i>)	1694	PCR BK-v plasmatique	≥ 3.7 log	91	29	100

Se = sensibilité, VPP = valeur prédictive positive, VPN = valeur prédictive négative

Ainsi, l'analyse histologique du parenchyme rénal, obtenu par biopsie du greffon rénal, constitue aujourd'hui la seule approche diagnostique de certitude de la Nx BK-v (Nickleit et al. 2017). Cependant, il s'agit d'un acte invasif à risque de complications hémorragiques et pouvant être faussement négatif dans 10 à 30% des cas, en particulier durant les stades précoces de Nx BK-v (Hirsch et al. 2014). En outre, en l'absence de dégradation de la fonction rénale, la réalisation itérative de biopsies pour détecter ou confirmer la présence de lésions induites par le BK-v n'est pas recommandée de façon consensuelle (Hirsch et al. 2014).

La lésion la plus caractéristique est la mise en évidence d'inclusions virales intranucléaires dans les cellules tubulaires avec la présence de dystrophies cellulaires et d'un infiltrat inflammatoire polymorphe de cellules mononucléées. Cet infiltrat inflammatoire peut initialement être confondu avec un rejet d'allogreffe. En immunohistochimie, un marquage par un anticorps anti-SV40 permet d'aider au diagnostic.

La **Figure 24** ci-dessous représente les lésions spécifiques observées dans la Nx BK-v.

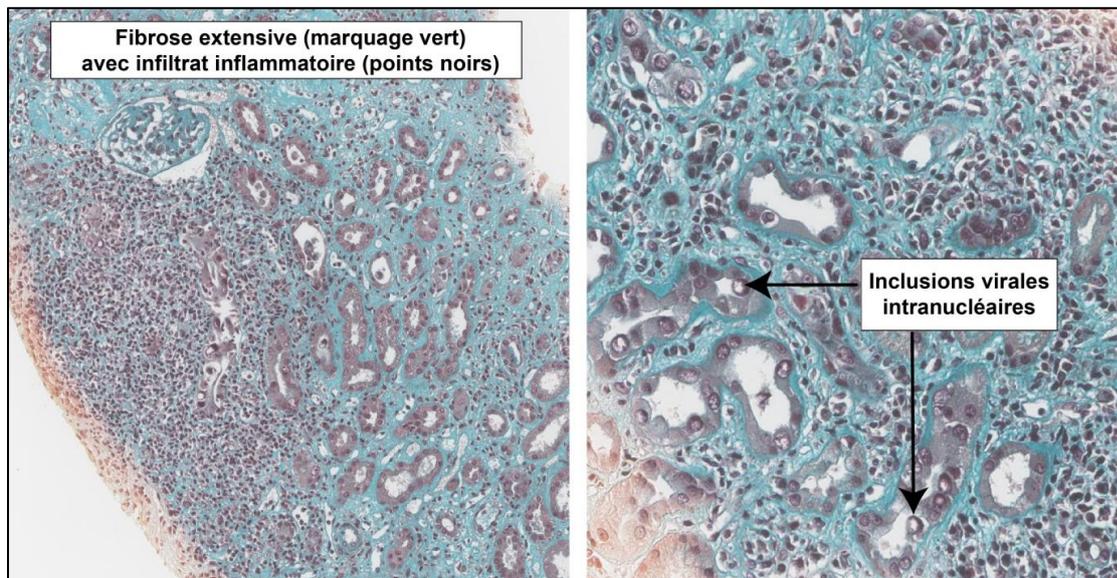


Figure 24 : Lésions histologiques spécifiques observées dans la Nx BK-v

L'évolution d'une Nx BK-v dépend de l'étendue des lésions du parenchyme rénal, elle-même liée à l'intensité de la charge virale. Trois stades de gravité croissants sont ainsi définis.

L'évolution est favorable chez les patients réussissant à contrôler la réplication intra-parenchymateuse du BK-v. En revanche, la persistance d'une réplication intra-parenchymateuse intense et prolongée du BK-v mène à des lésions irréversibles du parenchyme rénal, aboutissant à une dysfonction chronique, une insuffisance rénale et une perte de greffon dans plus de 50% des cas (Nickeleit et al. 2017).

Par ailleurs, l'altération de la fonction du greffon est actuellement évaluée par le débit de filtration glomérulaire. Ce dernier est un marqueur tardif dans le cadre du diagnostic de Nx BK-v, associé à une extension déjà importante des lésions fibrosantes et un risque important de perte de greffon (Hirsch et al. 2014).

Le **Tableau 5** montre les différents stades histologiques de la Nx BK-v, ainsi que le pronostic rénal associé à l'atteinte histologique.

Tableau 5 : Stades histologiques de la Nx BK-v et pronostic rénal associé à l'atteinte histologique (d'après (Hirsch et al. 2014))

Pattern	Description	Extent of biopsy core	Graft function	Risk of graft loss
PyVAN-A				
Viral cytopathic changes	Mild	Variable (typically <25%)	Mostly baseline	<10%
Interstitial inflammation	Minimal	≤10%		
Tubular atrophy	Minimal	≤10%		
Interstitial fibrosis	Minimal	≤10%		
PyVAN-B *				
Viral cytopathic changes	Variable	Variable (often 11 – >50%)	Mostly impaired	50%
Interstitial inflammation	Significant	11 – >50%		
Tubular atrophy	Mild/moderate	<50%		
Interstitial fibrosis	Mild/moderate	<50%		
PyVAN-B1				
Interstitial inflammation	Moderate	11–25%	Slightly above baseline	25%
PyVAN-B2				
Interstitial inflammation	Significant	26–50%	Significantly impaired	50%
PyVAN-B3				
Interstitial inflammation	Extensive	>50%	Significantly impaired	75%
PyVAN-C				
Viral cytopathic changes	Variable	Variable	Significantly impaired progressive failure	>80%
Interstitial inflammation	Variable	Variable		
Tubular atrophy	Extensive	>50%		
Interstitial fibrosis	Extensive	>50%		

*Subclassification of PyVAN-B into categories B1, B2 and B3 was initially proposed by Drachenberg et al [81]. Using both inflammation and tubular atrophy, biopsies with >50% involvement were designated B3. However, tubular atrophy >50% usually correlates with interstitial fibrosis >50%, which is used to define PyVAN-C. For simplicity, it is suggested that subclassification PyVAN-B be based entirely on inflammation, which is an important and independent predictor of outcome [106].

Ainsi, la démarche diagnostique actuelle de la Nx BK-v pose le souci d'être source de retards et de difficultés diagnostiques alors que la prise en charge thérapeutique de cette complication doit être la plus précoce possible afin d'éviter la survenue de lésions rénales irréversibles (Hirsch et al. 2014).

Démarche thérapeutique actuelle de la Nx BK-v

Il n'existe à ce jour aucune thérapie antivirale spécifique contre les *polyomavirus*.

Les traitements tels que le Cidofovir sont responsables d'une toxicité importante pour le rein transplanté et sont contre-indiqués en cas de dysfonction sévère du greffon rénal. Par ailleurs, le Léflunomide ou les Fluoroquinolones ont pu se révéler efficaces dans certains cas isolés. Cependant, l'efficacité très inconstante et les effectifs insuffisants de ces rares cas ne permettent pas de recommander actuellement l'utilisation en pratique courante de ces molécules (Hirsch et al. 2014; Johnston et al. 2010).

Une fois la survenue d'une Nx BK-v diagnostiquée et/ou fortement suspectée (cas des Nx BK-v non prouvées histologiquement mais avec charge virale BK-v sanguine $\geq 10^4$ copies/mL pendant plus de 4 semaines), la seule option thérapeutique actuellement recommandée est la baisse de l'immunosuppression thérapeutique (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group 2009; Hirsch et al. 2014; Johnston et al. 2010). Il est néanmoins important de signaler qu'il existe actuellement une grande disparité de prise en charge thérapeutique de la Nx BK-v du fait d'une absence de standardisation des recommandations internationales (Hirsch et al. 2014). En pratique, cela consiste généralement à diminuer ou arrêter les anti-calcineurines et/ou les anti-métabolites ou/et à remplacer ces agents immunosuppresseurs par des inhibiteurs de mTor. La minimisation du traitement immunosuppresseur est généralement efficace, d'autant plus qu'elle est réalisée précocement.

Le **Tableau 6** ci-dessous présente les protocoles de minimisation de l'immunosuppression couramment utilisés dans la littérature.

Tableau 6 : Protocoles de minimisation de l'immunosuppression couramment utilisés dans la littérature (d'après (Hirsch et al. 2014))

	Brennan et al. 2005[50]	Ginevri et al. 2007[98]	Schaub et al. 2010[99]	Sood et al. 2012[100]
Patients BKPyVviraemia n (%)	Adult (n = 200) 23 (12)	Paediatric (n = 52) 13 (21)	Adult (n = 203) 38 (19)	Adult (n = 240) 65 (27) 28 (12.5) with plasma BKPyV load >4log Geq/mL
Proven BK-PyVAN n (%)	None (no protocol allograft biopsy performed)	None (no protocol allograft biopsy performed)	13 (34%) of 38 viraemic patients with allograft biopsy (including protocol allograft biopsy)	5 (21%) of 23 viraemic patients with allograft biopsy (no protocol allograft biopsy)
Intervention	Step 1: discontinue azathioprine or MMF Step 2: reduce CNI	Step 1: reduce CNI Step 2: reduce or discontinue MMF	Step 1: reduce CNI Step 2: reduce or discontinue MMF	Step 1: reduce CNI and reduce MMF Step 2: repeat
Outcome at 1 year				
Clearance of viraemia, %	95	100	92	80
Time to clearance (range)	1.8 months (7-13)	2 months (1-8)	4.4 months (1-22)	6-12 months
Acute rejection, n (%)	1 (4.3)	0 (0)	3 (8.6)	4 (14.3)
Graft loss	None	None	None	1

Cette stratégie thérapeutique expose toutefois le patient à un risque secondaire de rejet de greffe, le dilemme étant donc de parvenir à un équilibre entre le risque de Nx BK-v et le risque secondaire de rejet de greffe (Hirsch et al. 2005; Brennan et al. 2005).

Facteurs de risques de la Nx BK-v et mécanismes physiopathologiques

La réplication du BK-v est favorisée par différents facteurs tels que la nature et l'intensité du traitement immunosuppresseur (Hirsch et al. 2014). Le risque de développer une Nx BK-v a été ainsi significativement associé à l'intensité du traitement immunosuppresseur, à l'utilisation d'anticorps polyclonaux anti-lymphocytaires, à l'association Tacrolimus-Mycophénolate Mofétile ainsi qu'à une exposition cumulée importante aux corticostéroïdes. D'autres facteurs de risques non liés aux traitements immunosuppresseurs ont également été identifiés tels que l'âge et le sexe du receveur, la survenue d'épisodes antérieurs de rejet d'allogreffe ou des caractéristiques propres au greffon telles que les lésions d'ischémie-reperfusion, des greffons provenant de donneurs cadavériques ou un retard de reprise de fonction (Demey et al. 2018; Hirsch et al. 2013; Dharnidharka, Cherikh, et Abbott 2009; Schold et al. 2009).

Le **Tableau 7** regroupe les facteurs de risques de Nx BK-v actuellement identifiés.

Tableau 7 : Facteurs de risques de Nx BK-v (d'après (Demey et al. 2018))

Category	Risk factor identified	BKPyVN cases / Total population	Relative effect (95%CI)	p value
Immunosuppressive regimens	Mofetil mycophenolate	39/880	HR 3.5 (1.6-7.5)	0.0013
	Tacrolimus (TAC)	39/880	HR 3.3 (1.5-7.6)	0.0038
		9/227	HR 1.64 (0.44-6.11)	NR
	TAC level one month before the biopsy	33/99	OR 1.28 (1.01-1.62)	0.04
	TAC level three months before the biopsy	33/99	OR 1.4 (1.1-1.8)	0.009
	Mean TAC level over the 3 months before biopsy	33/99	OR 1.3 (1.02-1.7)	0.03
	Prednisone dose three months before the biopsy	33/99	OR 1.2 (1.04-1.36)	0.009
	Mean prednisone dose over the 3 months before biopsy	33/99	OR 1.22 (1.04-1.4)	0.02
	Intravenous methylprednisolone 1000 mg once daily for 3 days	12/407	HR 23.52 (4.57-120.99)	< 0.001
	Polyclonal antibody induction	25/542	OR 11.04 (2.94-41.52)	0.0004
Donor/recipient characteristics	ABO incompatibility	39/880	HR 6.6 (2.3-18.9)	0.0005
		11/62	OR 2.32 (NR)	0.04
	African-American recipient	31/666	HR 2.89 (1.36-6.14)	0.006
	Recipient age	31/666	HR 1.04 (1-1.07)	0.048
Surgery	Cold ischemia time	12/407	HR 0.98 (0.92-1.03)	0.424
		9/227	HR 1.18 (1.04-1.35)	0.009
Viral serology	Donor BKPyV seroactivity	12/407	HR 2.89 (1.33-6.29)	0.007
Post-transplantation outcomes	Acute rejection (≥ 1 episode)	31/666	HR 3.18 (1.42-7.12)	0.005
		9/227	HR 4.05 (0.99-16.53)	0.051
	Acute rejection (rejection score)	39/880	HR 5.1 (1.8-14.6)	0.0021
	CMV infection	31/666	HR 2.72 (1.19-6.24)	0.018
Time course of BKPyV viremia	First positive BKPyV viremia > 185,000 copies/mL	8/163	OR 113.25 (17.22-744.6)	< 0.001
	BKPyV peak viral load of 223,000 copies/mL at any time	8/163	OR 70.5 (8.08-615)	0.0001

Les mécanismes physiopathologiques de survenue de Nx BK-v sont partiellement élucidés. L'altération de la réponse immune semble être un facteur crucial dans la pathogénie de ces infections, un défaut de l'immunité cellulaire spécifique des *polyomavirus* entraînant un défaut de contrôle de la réplication virale (R. Sharma et al. 2016; Babel, Volk, et Reinke 2011). Nous avons récemment publié une revue de la littérature étudiant la relation entre l'altération de la réponse lymphocytaire T spécifique du BK-v et le développement des Nx BK-v [Annexe 1 : Dekeyser M., François H., Beaudreuil S. and Durrbach A. (2015) Polyomavirus-specific cellular immunity: from BK-virus-specific cellular immunity to BK-virus-associated nephropathy? *Front. Immunol.* 6:307].

La fréquence des LT spécifiques du BK-v était positivement corrélée aux épisodes de virémie à BK-v en transplantation rénale (Schmidt et al. 2014). Les patients avec Nx BK-v étaient caractérisés par une nette diminution voir une absence en valeur absolue du nombre de LT spécifiques du BK-v (Mutlu et al. 2015; Binggeli et al. 2007). L'évaluation des capacités de sécrétion d'Interféron- γ par des tests de type ELISA ou ELISPOT a permis de mettre en évidence une altération de la réponse cellulaire spécifique du BK-v chez les patients avec virémie BK-v (Comoli et al. 2013; Comoli, Hirsch, et Ginevri 2008). La perte après transplantation rénale des LT spécifiques du BK-v dirigés contre le LT-Ag était significativement associée à un risque plus élevé de réplication BK-v. A l'inverse, la stabilité, voire l'augmentation, d'une réponse cellulaire spécifique du BK-v était associée à une diminution du risque de virémie BK-v (Schachtner et al. 2015). Par ailleurs, la présence de LT dotés de polyfonctionnalité étaient associées à une clairance plus rapide du BK-v, suggérant un rôle protecteur de la polyfonctionnalité lymphocytaire (Schaenman et al. 2016; Trydzenskaya et al. 2011; K. Mueller et al. 2011).

Le virus JC et risque de leuco-encéphalopathie multifocale progressive

La leuco-encéphalopathie multifocale progressive (LEMP) est une pathologie démyélinisante du système nerveux central, consécutive à l'infection des oligodendrocytes par le JC-v. Il s'agit d'une infection opportuniste d'évolution souvent fatale, survenant dans le cadre d'un déficit profond de l'immunité cellulaire spécifique du JC-v (C. Tan et Korálnik 2010).

Historiquement décrite comme une complication du VIH au stade SIDA, sa fréquence de survenue et sa sévérité sont dépendantes du type d'immunosuppression induit (Calabrese, Molloy, et Berger 2015; Misbah 2017), que ce soit dans le cadre d'une infection chronique par le VIH (Garvey et al. 2011) ou dans les suites d'un traitement par biothérapies (Major 2010) ou après transplantation d'organe (Mateen et al. 2011). Cette pathologie rare a connu une expansion dans les années 1980 dans les suites de l'épidémie du VIH. Depuis l'avènement des trithérapies anti-VIH, cette complication est devenue moins fréquente. Les études récentes retrouvent un taux d'incidence actuel entre 0,2 et 0,6 pour 1000 personnes-année avec une réduction de la mortalité à 37,6% la 1^{ère} année (Garvey et al. 2011; Khanna et al. 2009). Parallèlement à cette diminution du risque de LEMP dans la population infectée par le VIH, de nombreux cas de LEMP ont été décrits chez des patients non infectés par le VIH et traités par des thérapies immunomodulatrices (Misbah 2017; Maas et al. 2016). Ainsi, le risque de LEMP chez les patients traités par Natalizumab pour des scléroses en plaques réfractaires a été évalué entre 2,1 et 10 cas pour 1000 patients traités (Bloomgren et al. 2012). Une récente évaluation du risque de LEMP a mis en évidence la présence de facteurs de risque. Ainsi, les patients présentant une sérologie JC-v positive, ayant déjà reçu un traitement immunosuppresseur au préalable et traité par Natalizumab pendant plus de 24 mois présentait un risque de développer une LEMP dans 1 cas pour 44 patients traités (Berger et Fox 2016). En transplantation d'organes solides, la survenue de la LEMP semble plus rare (taux d'incidence évalué à 1,24 pour 1000 personnes-année) mais est associée à une plus grande mortalité, entre 70 et 84% des cas avec une médiane de survie de 3 à 6 mois (Maas et al. 2016; Mateen et al. 2011).

Les manifestations cliniques de LEMP sont très polymorphes, étroitement liées aux sièges de démyélinisation cérébrale. L'installation des déficits neurologiques focaux se fait souvent de façon subaiguë, les symptômes les plus fréquents étant des déficits moteurs ou cognitifs, des troubles du langage, de l'équilibre ou de la marche. Le diagnostic de référence nécessite historiquement une biopsie cérébrale et met en évidence de multiples foyers de démyélinisation entourés d'oligodendrocytes comportant des inclusions basophiles et d'astrocytes de grande taille au noyau hyperchromatique. Devant le caractère invasif de cette procédure, le diagnostic histologique est le plus souvent évité. Dans un contexte clinique évocateur, le diagnostic de LEMP est actuellement retenu sur la mise en évidence de lésions cérébrales à l'IRM associée à la confirmation d'une répllication intra-cérébrale du JC-v par la détection de l'ADN viral dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (C. Tan et Koralnik 2010).

L'identification de facteurs de risques est rendue difficile du fait de la relative rareté des cas de LEMP en transplantation. Le caractère pathogène du JC-v semble limité à une localisation intra-cérébrale et rend difficile le développement de biomarqueurs de surveillance de répllication du JC-v (Hirsch et al. 2014). Néanmoins, un diagnostic précoce et une reconstitution rapide de l'immunité cellulaire spécifique du JC-V sont des facteurs pronostics de contrôle de la LEMP (Brew et al. 2010).

Les mécanismes physiopathologiques de survenue de cette complication sont partiellement élucidés. L'altération fonctionnelle de la réponse cellulaire spécifique du JC-v joue un rôle crucial dans l'initiation d'une répllication intracérébrale du JC-v chez les sujets immunodéprimés (Taoufik et de Goër de Herve 2017; Gasnault et Taoufik 2006). Les LT CD4 et CD8 étaient indétectables dans les cas de LEMP évolutives (Gasnault et al. 2003; Koralnik, Du Pasquier, et Letvin 2001). Un épuisement des LT spécifiques du JC-v a également été mis en évidence par la surexpression de récepteurs inhibiteurs tels que PD-1 (C. S. Tan et al. 2012). La reconstitution d'une réponse immune spécifique du JC-v était associée à la clairance du virus dans le LCR et un meilleur contrôle clinique de la LEMP (Renaud A. Du Pasquier et al. 2004; Gasnault et al. 2003). Par ailleurs, la région NCCR de l'ADN viral du JC-v semble impliquée

dans le tropisme cellulaire du virus. Des mutations de cette région ont été associées au tropisme cérébral du JC-v (L'Honneur et al. 2018; Nakamichi et al. 2014). Ces mutations étaient spécifiques à chaque cas de LEMP et corrélées à la gravité de l'atteinte cérébrale, suggérant l'acquisition du caractère pathogène par sélection de variants produits *de novo* et non par transmission (Nakamichi et al. 2013; Agostini et al. 1997). Les mutations de la région NCCR étaient associées à une diminution de l'expression de l'antigène LT-Ag et à une augmentation de l'expression du génome viral entraînant une augmentation de la réplication virale, faisant suspecter un mécanisme d'évasion virale (Gosert et al. 2010). Ainsi, un défaut de contrôle par les LT antiviraux de la réplication urinaire du JC-v pourrait entraîner une réplication chronique et importante du JC-v. Cette réplication chronique incontrôlée permettrait au JC-v d'évoluer et d'acquérir des mutations de la région NCCR lui conférant alors un caractère de virulence et un tropisme intracérébral (Johnson et al. 2013).

A ce jour, aucun traitement curatif ciblant le JC-v n'a démontré son efficacité. La reconstitution rapide de l'immunité cellulaire spécifique du JC-v est la seule stratégie thérapeutique actuellement recommandée (Pavlovic et al. 2015). La stratégie utilisée pour assurer cette reconstitution lymphocytaire est variable selon la nature du déficit immunitaire sous-jacent. Dans le contexte de l'infection à VIH, l'attitude actuelle est d'optimiser le traitement antirétroviral (Gasnault et al. 2011). En cas de déficit immunitaire induit par un traitement immunosuppresseur, l'arrêt ou la minimisation de ce traitement sont recommandés. Dans l'utilisation d'anticorps monoclonaux, des échanges plasmatiques sont préconisés pour favoriser la clairance de ces molécules de longue durée de vie (Pavlovic et al. 2015).

5 Surveillance immuno-virologique du patient transplanté rénal

Actuellement, le dépistage des infections virales en transplantation rénale par l'évaluation seule de la charge virale n'est pas satisfaisant car il ne permet pas d'identifier les patients à risque de développer ces complications infectieuses de ceux aptes à contrôler spontanément ces infections virales opportunistes.

Le degré individuel d'immunosuppression d'un patient est difficile à appréhender et nous ne disposons pas d'indicateur objectif permettant d'évaluer individuellement, en termes de risque infectieux, le niveau d'immunosuppression induit. L'étude du microbiote viral chez des patients transplantés retrouvait un impact important des traitements immunosuppresseurs sur la charge virale totale exprimée au niveau plasmatique. Cette charge virale était positivement corrélée au niveau d'immunosuppression, tandis que la composante bactérienne du microbiote en était faiblement impactée. Une forte relation était mise en évidence entre le niveau d'expression de la charge virale totale, l'intensité du traitement immunosuppresseur et le recours ou non à des prophylaxies antivirales (De Vlaminck et al. 2013).

Par ailleurs, à dose égale, l'effet immunosuppresseur d'un même traitement sera différent d'un patient à l'autre et l'exposera différemment à un risque de complications infectieuses en fonction de son terrain immunitaire sous-jacent. En effet, l'état immunitaire est extrêmement variable d'un individu à l'autre et dépend de plusieurs facteurs, tels que l'exposition à des traitements immunosuppresseurs antérieurs ou une immunosénescence précoce conséquence de la maladie rénale chronique initiale du patient. Il a été démontré que l'insuffisance rénale chronique est responsable d'une altération complexe du système immunitaire, associant un état pro-inflammatoire et l'établissement d'un déficit immunitaire acquis (Chiu et al. 2018; Betjes 2013). Les patients atteints d'insuffisance rénale chronique présentaient une lymphopénie sélective portant sur les lymphocytes B, les LT naïfs et les LT_{CM} (Betjes et al. 2011, 2008). Des patients âgés de 25 à 45 ans atteints d'insuffisance rénale chronique avaient une distribution relative de LT naïfs et mémoires similaires à celle d'un groupe de sujets

sains de 60 à 80 ans, évoquant une différenciation terminale plus avancée que dans la population du même âge. Il s’y associait également une accumulation de LT CD8 de type T_{EM} avec une polarisation lymphocytaire majoritairement de type T_h1 et un déficit en sécrétion d’IL-7 (Litjens, van Druningen, et Betjes 2006).

La surveillance immuno-virologique pourrait être utilisée afin de personnaliser la prise en charge des patients par une évaluation individuelle du risque infectieux. Celle-ci est basée sur l’étude des capacités fonctionnelles des LT antiviraux et pourrait permettre d’identifier les patients les plus à risque de complications infectieuses en situation d’immunosuppression (Sester et al. 2016). L’identification d’une faible réponse antivirale pourrait être utilisée comme marqueur prédictif du risque de Nx BK-v. A l’inverse, la reconstitution d’une réponse antivirale spécifique du BK-v pourrait être un marqueur prédictif précoce du contrôle d’une réactivation du BK-v.

La Figure 25 illustre le principe de surveillance immuno-virologique.

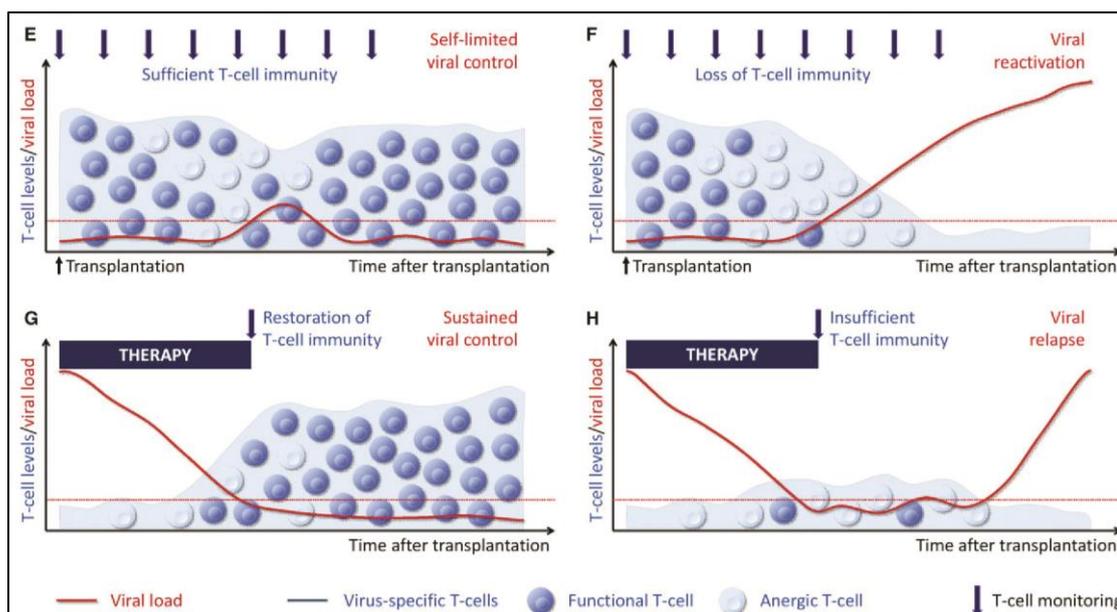


Figure 25 : Surveillance immuno-virologique comme outil permettant d’évaluer individuellement le risque de réactivations virales (d’après (Sester et al. 2016))

Dans un travail précédemment mené étudiant la fonctionnalité des LT spécifiques du CMV dans les 6 premiers mois en post-transplantation rénale, des capacités de sécrétions cytokiniques multiples étaient associées à un meilleur contrôle du CMV. Les patients ne faisant pas d'infections à CMV avaient des capacités de sécrétions cytokiniques multiples supérieures aux patients avec infections à CMV. Cette plus grande polyfonctionnalité lymphocytaire était observée dès la 6^{ème} semaine de suivi [Annexe 2 : Dekeyser M., Ladrière M., Audonnet S., Frimat L. and De Carvalho Bittencourt M. (2017) An Early Immediate Early Protein IE-1-Specific T-Cell Polyfunctionality Is Associated With a Better Control of Cytomegalovirus Reactivation in Kidney Transplantation. *Kidney International Reports*. 2, 486–492].

Il apparaît donc important de développer de nouveaux moyens de surveillance immuno-virologique en transplantation rénale. L'évaluation précise des LT spécifiques du BK-v pourrait permettre d'évaluer individuellement le risque de Nx BK-v chez les patients transplantés rénaux. Elle pourrait permettre de mieux évaluer la réponse à la prise en charge thérapeutique et *in fine* aider à moduler l'immunosuppression thérapeutique.

HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Chacun vaut ce que valent les objectifs de son effort.

De M. Aurèle

Notre hypothèse de travail est que la réplication des *Polyomavirus* (BK-v et JC-v) en post-transplantation rénale est favorisée par une fonctionnalité altérée des LT mémoires spécifiques des *Polyomavirus*. Les LT mémoires spécifiques du BK-v et du JC-v présenteraient un état d'épuisement lymphocytaire, possiblement responsable de l'absence de contrôle de ces virus et de la survenue de Nx BK-v et de LEMP après transplantation rénale.

Ainsi, les objectifs de ce travail de thèse ont été :

- de mieux cerner la problématique posée par la réactivation du BK-v et du JC-v en transplantation rénale,
- d'identifier des facteurs de risque de réactivation du BK-v et du JC-v,
- de caractériser la réponse lymphocytaire T mémoire spécifique du BK-v et du JC-v en situation de réactivation après transplantation rénale.

La caractérisation précise de la fonctionnalité de ces LT mémoires spécifiques pourrait permettre de développer de nouveaux biomarqueurs immunovirologiques. Ces nouveaux biomarqueurs pourraient permettre d'identifier les patients à risque de réactivation et pourrait également permettre de restaurer in vitro la réponse lymphocytaire T anti-BK-v et/ou JC-v. Les résultats pourront servir de base à de futures stratégies d'immunothérapies spécifiques des *Polyomavirus*.

RESULTATS

C'est qu'il faut organiser un chaos pour qui veut faire un monde.

Adapté de V. Hugo

Article 1 - Development of BKv nephropathy in renal transplant patients: implication of specific immune response and HLA matching

Brevet - Méthode NEPHROVIR d'évaluation du risque de néphropathie à BK-virus en transplantation rénale

Article 2 - Refractory T-Cell Anergy and Rapidly Fatal Progressive Multifocal Leukoencephalopathy following Prolonged CTLA4 Therapy. OFID, 2017

Partie 1 - Evaluation du BK-v et des LT spécifiques du BK-v en transplantation rénale : résultats de l'étude MelTyK

Article 1 – Development of BKv nephropathy in renal transplant patients: implication of specific immune response and HLA matching
(article en préparation)

Notre groupe a conduit une étude observationnelle incluant 100 patients transplantés rénaux avec différents niveaux de réactivation BK-v. Il s'agit de l'étude MelTyK (patients issus du service de Néphrologie de l'hôpital Bicêtre - Hôpital Universitaire Paris Sud).

L'étude MelTyk a ainsi permis de mettre en évidence une altération progressive de la fonctionnalité des LT mémoires spécifiques du BK-v. Nos données suggèrent un état d'épuisement des LT spécifiques du BK-v en fonction du niveau de réactivation BK-v. Cette altération de la fonctionnalité lymphocytaire était associée à un nombre plus faible d'incompatibilité HLA chez les patients avec Nx BK-v, le nombre d'incompatibilité HLA étant négativement corrélé à la charge virale BK-v. Ces données nous ont conduit à élaborer et proposer une méthode biologique non-invasive d'évaluation du risque individuel de Nx BK-v.

Development of BKv nephropathy in renal transplant patients: role of the specific immune response and the HLA matching

Manon Dekeyser^{1,2,5}, Marie-Ghislaine de Goër de Herve¹, Houria Hendel-Chavez¹, Cyrielle Bouteloup¹, Michelle Elias², Yassine Taoufik^{1*}, Antoine Durrbach^{2,3*}

¹INSERM 1184, IMVA, Normal and Pathological T Memory, Faculté de Médecine Paris-Sud, 94276 le Kremlin-Bicêtre

²ARINET, Department of Nephrology and Transplantation, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud

³INSERM UMR-S1197, Interactions between stem cells and their niches in physiopathology, cancer and tissue repair.

* Co senior authors

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Pr Antoine Durrbach, Department of Nephrology and Transplantation, INSERM UMR-S1197 - Hôpitaux Universitaires Paris-Sud

63, Rue Gabriel Péri, 94276 le Kremlin-Bicêtre. Email: antoine.durrbach@aphp.fr

Word Count (summary): 225

Word Count (main text): 3693

SUMMARY

In the recent years, BK-virus (BKv) associated nephropathy (BKvAN) emerged as a major complication in renal transplantation, affecting 10% of kidney transplant recipients and leading to graft loss in more than 50% of cases. BKv reactivation is favored by therapeutic immunosuppression. We prospectively characterized the BKv-specific T cell functionality in kidney transplant recipients under distinct BKv reactivation levels (without reactivation, viremia, viremia and BKvAN). KTR with BKvAN had a severe impairment of BKv-specific T cell functionality [BKv-specific CD8 T cell proliferation ($p < 0.05$), BKv-specific TNF α and/or IFN- γ production ($p < 0.05$), BKv-specific cytotoxicity ($p < 0.05$)] as compared to patients with BKv replication without BKvAN. In contrast, patients with BKvAN had a similar response to other viral antigen. In addition, the occurrence of BKvAN was associated with lower number of HLA mismatches. We observed a gradual loss of functional BKv-specific T cells according to BKv reactivation levels, associated with an inverse correlation between BKv-specific lymphocyte functionality or HLA mismatches and plasmatic BKv viral load. This functional impairment suggested an exhaustion of BKv-specific T cells according to BKv reactivation levels. In conclusion, we observed a reduction of the specific anti BKv response in patients with BKvAN. It negatively correlates with the number of HLA mismatches, suggesting that a hetero-specific CD4 help could lead to a better host's ability to maintain an effective BKv-specific memory CD8 T cell response, protective against BKvAN.

KEY WORDS: BK virus - associated nephropathy, kidney transplantation, BK virus - specific T-cells

INTRODUCTION

Kidney transplantation is the standard of care for patients with end-stage renal disease, improving patients' survival and their quality of life¹.

With the development of potent immunosuppressive protocols, BK polyomavirus (BKv) infection has emerged as a major opportunistic infection, which may lead to BKv-associated nephropathy (BKvAN)^{2,3}. Affecting almost 10% of kidney transplant recipients (KTR), BKvAN may lead to premature kidney allograft failure and irreversible graft loss⁴. While there is no specific antiviral treatment, adaptation of therapeutic immunosuppression represents the only therapeutic option, which may be associated with kidney rejection^{3,5}.

BKv is a double-stranded DNA virus, with a widespread dissemination as indicated by seroprevalence rates of up to 80 percent worldwide in adults^{6,7}. After primary infection occurring during childhood, BKv establishes latency in the reno-urinary tract and is controlled by BKv-specific T cell response⁶. While BKv-reactivation in healthy individuals generally remains asymptomatic throughout life, this reactivation has been associated with BKvAN and ureteral stenosis in renal transplant, and hemorrhagic cystitis in bone-marrow transplant recipients, but is rare in other solid-organ transplant suggesting complex physiopathological mechanisms⁶. The viral genome is divided into three regions. At the origin of viral replication, the non-coding control region regulates expression of the early and late viral genes. The early gene region encodes for regulatory proteins as "Large Tumor-Antigen" (LT-Ag) and "small Tumor-Antigen" (sT-Ag). These regulatory proteins facilitate viral-genome replication. The late gene region encodes for capsid proteins as VP1⁸. LT-Ag and VP1 are two immunodominant proteins widely recognized by BKv-specific T cell immunity⁹.

The mechanisms of BKv reactivation and BKvAN are poorly understood. However, one major point is that immunosuppressive therapy impairs anti-BKv T cell memory responses which may become no longer able to control BKv replication. Allogenic kidney transplantation represents a complex immunologic situation where the donor cells express different class I and II of their Human Leucocyte Antigen (HLA) molecules than those of the recipient¹⁰. Viral peptides can be presented through donor (kidney) or recipient HLA which can lead to different response depending on the matching of HLA-viral peptide with T-Cell Receptor harbored by BKv-specific memory T cells. Therefore, recipient memory T cells of BKv specificity may no longer recognize BKv peptides harbored by donor MHC molecules on kidney epithelial cells.

Monitoring of specific T cell response combined as well as BKv viral load could be useful to assess the risk of BKv reactivation and BKvAN occurrence¹¹. Here, we examined in a prospective study the impact of BKv-specific T cell response and HLA mismatches on BKv reactivation and BKvAN occurrence.

PATIENTS AND METHODS

Patients

In order to compare BKv-specific T cell response and to identify BKvAN-risk factors, we performed a longitudinal observational study in our center. KTR, older than 18 years old, with various levels of BKv reactivation were included. Patients bearing combined multiple organ transplantation were excluded, as well as KTR with previous resolutive BKv reactivation or KTR with chronic viral infections such as viral hepatitis or human immunodeficiency virus infection. Written informed consent was obtained from all included patients. The study was performed in accordance with the local French Ethic Committee.

One hundred KTR have been included and split into 4 groups according to BKv reactivation level. They were followed between April 2014 and April 2018. The sample size was calculated with the required number of patients to identify a difference in BKv-specific T cell functionality. Based on a previous BKv-specific T cell assessment, required number was calculated to identify a difference of more than 10 BKv-specific T cells in responding population compared to 0.5 BKv-specific T cells in no-responding population, with a statistical power of more than 80%. We evaluated clinical characteristics before kidney transplantation, kidney graft outcome, immunosuppressive regimen, plasma and urine BKv viral load, HLA mismatches and BKv-specific T cell functionality.

Group classification

The groups classification has been based on the BKv reactivation levels as defined:

- Patients without BKv reactivation
 - plasma and urine BKv viral loads < 200 copies/ml in the last 12 months
- Patients with BKv-viruria
 - urine BKv viral load > 200 copies/ml
 - and plasma BKv viral load < 200 copies/ml
 - during at least 12 months
- Patients with BKv-viremia
 - stable or increased plasma BKv viral load > 200 copies/ml
 - without diagnosis of BKvAN on kidney biopsy
- Patients with BKvAN
 - histological evidence of BKvAN with plasma BKv viral load > 200 copies/ml.

Collection of clinical and biological data

Demographic characteristics including age, gender, cause of end-stage renal diseases, dialysis and transplantation characteristics were collected for all patients.

For each patient, we collected the median value of plasma and urine BKv viral loads, the duration of BKv reactivation and the delay since kidney transplantation. Plasma and urine samples were obtained during routine visits in our transplant center, as well as during allograft acute failure. BKv DNA quantification was performed using a BKv-specific real-time PCR method (BKV R-GENE, BioMerieux®).

For each patient, the Glomerular Filtration Rate estimated by MDRD-formula (eGFR) values at the first month, 12th post-transplant month or at BKvAN diagnosis, and at the end of follow-up were collected. The end of follow-up was defined as the occurrence of graft loss or the time of the last follow-up. Levels of tacrolimus, everolimus and Mycophenolate mofetil exposure (area under the curve - AUC in h.mg/l) were collected before and after BKvAN diagnosis or at 12th post-transplant month.

Histological assessment

Protocol kidney biopsies were performed at 3 and 12 months after transplantation or in case of acute kidney injury (increase of the basal serum creatinine more than 25%). BKvAN was diagnosed on histological feature at the department of histopathology of Bicêtre hospital. Lesions include enlarged nuclei with smudgy chromatin changes, intranuclear viral inclusions, which are associated with a mononuclear inflammatory infiltrate and/or fibrosis^{12,13}. In some case, the virus was confirmed by immuno-histochemistry by using an antibody against Large-SV40 tumor-antigen^{12,13}.

Assessment of HLA mismatching

Recipient and donor HLA types were collected from the French organ allocation organization (Agence de la Biomédecine). For each donor–recipient combination, the degree of HLA mismatching was determined by counting the number of HLA-A, HLA-B, HLA-DR and HLA-DQ mismatches between donor and recipient.

Assessment of BKv specific T cell functionality

BKv specific T-cell functionality was evaluated on blood sample at the time of inclusion. Lymphocytes, isolated by Ficoll gradient, were incubated with two distinct BKv specific peptides pools or with a global antiviral stimulation using peptides pool of Cytomegalovirus, Epstein-Barr and Influenzae virus. These overlapping BKv specific peptide pools cover the LT-Ag or VP1 regions and activate both CD4 and CD8 T-cells (PepTivator BKV LT-Ag or VP1 used at the final concentration of 1µg/ml/peptide, Miltenyi®). To assess the polyfunctionality of cellular immune response, we measured the cytokine secretions, proliferative and cytotoxic capacities on multicolor flow cytometry analysis using BD LSRFortessa™ (Figure S1)¹⁴. As controls, we tested healthy donors.

BKv-specific T cell cytokine secretion in response to BKv antigens (Figure S1A)

We tested cytokine secretion in response to BKv peptides. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were incubated overnight, in presence of Brefeldin A (at final concentration of 0.65µl/mL, BD®), with BKv specific peptide pool. After overnight stimulation, cells were fixed and permeabilized before incubation with anti-interferon gamma-γ (IFN-γ) and anti-tumor necrosis factor-α (TNF-α) antibodies (BD Bioscience®). Lymphocyte polyfunctionality was evaluated by the capacity of BKv-specific T cells to perform single (IFN-γ⁺ or TNF-α⁺) or double (IFN-γ⁺ and TNF-α⁺) cytokine secretions.

BKv-specific T cell proliferation in response to BKv antigens (Figure S1B)

We also tested the ability of CD4 and CD8 T cells to proliferate in response to BKv peptides. PBMC were stained with 0.5 µM CFSE and then incubated for 5 days with BKv peptides. After stimulation, cells were stained with surface marker antibodies (CD3, CD4 and CD8 antibodies, BD Bioscience®) and proliferative capacity was evaluated by CFSE dilution.

BKv-specific T cell cytotoxicity in response to BKv antigens (Figure S1C)

To measure BKv-specific CD8 T cell cytotoxicity, PBMCs were co incubated overnight with BKv peptide-coated autologous target cells (ratio 3/1). Target cells were distinguished from BKv-specific CD8 T cells by CFSE staining. After stimulation, the mortality rate of target cells was evaluated by 7-amino-actinomycin D staining.

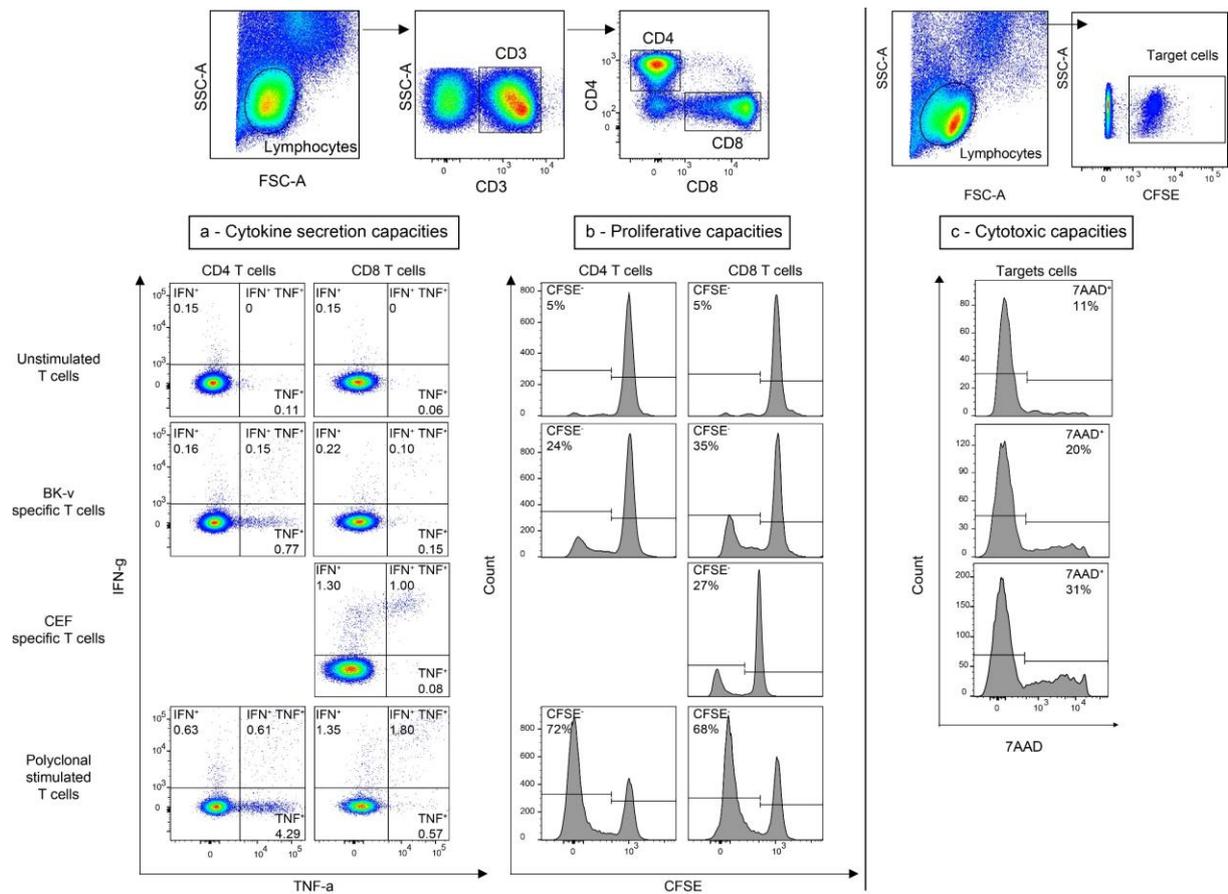


Figure S1: Assessment of cellular immune response polyfunctionality by cytokine secretions, proliferative and cytotoxic capacities

Peripheral blood mononuclear cells were incubated in Roswell Park Memorial Institute medium alone (unstimulated cells) or with overlapping BK-v (VP1 or LT-Ag) or CEF peptide pools or Staphylococcal enterotoxin B (SEB). T-cell functionality was evaluated in healthy donors and in BKv reactivation KTR groups. (A) Interferon- γ (IFN- γ) and Tumor Necrosis Factor (TNF)- α production in response to various stimulation were evaluated by intracellular staining. Numbers indicate the percentages of CD4 or CD8 T cells expressing IFN- γ , TNF- α and IFN- γ /TNF- α . (B) Proliferation in response to various stimulation was measured by carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) dilution. Numbers indicate the percentage of CFSE^{low} cells among CD4 and CD8 T cells. (C) CD8 cytotoxicity in response to various stimulation were measured in terms of 7-amino-actinomycin D (AAD) uptake in target cells coated with various anti-viral stimulation. Results are expressed as the percentage of 7-AAD⁺ target cells. The frequencies of responsive T cells were calculated by subtracting the frequency of cells detected in the absence of stimulation, to correct for background staining.

Statistical Analysis

Medians and inter-quartile range were used to analyze continuous data and percentages for categorical data. For continuous data, 2 groups were compared using the non-parametric Mann-Whitney test, while more than 2 groups were compared using the non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by a Dunn's multiple comparisons test to perform multiple comparisons (BKvAN group as reference group). For categorical clinical data, groups were compared using the global chi-squared test or the chi-squared test for trend. Kaplan-Meier survival curves were used and compared with logrank test. The non-parametric Spearman test was used for correlations

Statistical analyses were performed by using GraphPad Prism V.7 software, with significant differences at p values ≤ 0.05 . Results are shown as medians \pm 25th-75th percentiles or in percentages and bar-charts.

RESULTS

In order to compare BKv-specific T cell response and to identify BKvAN-risk factors, we included one hundred patients split into 4 BKv reactivation groups and prospectively followed for a median time of 36 [26-38] months.

Clinical characteristics of KTR according to the BKv reactivation level

The median time from kidney transplantation to the end of the follow-up was 40 [26-56.8] months. No significant differences for demographic characteristics before or at the time of transplantation were found between the different KTR groups (age, gender, dialysis, cause of end-stage renal diseases and transplantation characteristics – table 1). There is no significant difference on the 1st post-transplant month in graft function (evaluated by median eGFR), in the occurrence of graft rejection or in patient death after transplantation (table 1).

Table 1: Demographic comparison between BKv reactivation KTR groups

Demographic comparison	Without BKv reactivation	BKv-viruria	BKv-viremia	BKv-associated nephropathy	<i>p</i>
n	25	25	25	25	
AGE (years)	51 [45-65]	62 [50.5-70.5]	62 [50-71.5]	62 [55-65.5]	0.169
GENDER					
Male (n, %)	16 (64)	18 (72)	18 (72)	17 (68)	0.916
DIALYSIS (n, %)					
Time of dialysis (months)	32 [16.8-46]	28 [11-43]	40 [20.8-61.8]	47 [28-74]	0.137
Hemodialysis (n, %)	18 (90)	19 (82.6)	21 (91.3)	22 (95.7)	0.526
Peritoneal dialysis (n, %)	2 (10)	4 (17.4)	2 (8.7)	1 (4.3)	
CAUSE OF END-STAGE RENAL DISEASES					
Glomerulonephritis with/without systemic disease (n, %)	6 (24)	10 (40)	8 (32)	6 (24)	0.611
Hypertensive or diabetic nephrosclerosis (n, %)	5 (20)	7 (28)	10 (40)	9 (36)	
Polycystic kidneys (n, %)	6 (24)	3 (12)	3 (12)	2 (8)	
Tubular or interstitial diseases (n, %)	2 (8)	1 (4)	1 (4)	4 (16)	
Unknown and Other reasons (n, %)	6 (24)	4 (16)	3 (12)	4 (16)	
TRANSPLANTATION CHARACTERISTICS (n, %)					
Donation after brain death (n, %)	16 (64)	21 (84)	17 (68)	20 (80)	0.319
Donation after cardiac death (n, %)	4 (16)	0 (0)	5 (20)	2 (8)	
Living donation (n, %)	5 (20)	4 (16)	3 (12)	3 (12)	
Highly sensitized patients ^a (n, %)	7 (28)	6 (24)	6 (24)	5 (20)	0.932
First transplant (n, %)	19 (76)	22 (88)	24 (96)	19 (76)	0.147
OUTCOME AFTER TRANSPLANTATION (n, %)					
eGFR at month 1 after transplantation (ml/min/1,73m ²)	40 [32.3-68.8]	51 [31-81]	45.5 [31.3-63.5]	41 [26.8-56.8]	0.740
Graft rejection (n, %)	6 (24)	5 (20)	9 (36)	4 (16)	0.381
Patient death after transplantation (n, %)	1 (11.1)	3 (33.3)	2 (22.2)	3 (33.3)	0.720
BKvAN diagnosis (months)	-	-	-	11 [5-24]	
eGFR at the BKvAN diagnosis or at month 12 after transplantation (ml/min/1,73m ²)	51 [42.5-69.5]	43 [35-69.5]	48 [38-56]	29 [21-42.5] ****	<0,0001
eGFR at the end of the follow-up (ml/min/1,73m ²)	49 [37-67.5]	47 [31.5-58.5]	45 [28.5-60]	13 [9.5-29] ****	<0,0001
Graft loss (n, %)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	9 (36) ****	<0,0001

^a defined as >85% panel-reactive antibodies

BKv reactivation in KTR

According to the required number of patients, one hundred KTR were selected and included into 4 equal groups according to the BKv reactivation level: 25 patients without evidence of urine or plasma BKv replication, 25 patients with BKv-viruria, 25 patients with BKv-viremia without BKvAN and 25 patients with BKvAN (Figures 1a and 1b).

Impact of BKv reactivation on allograft outcome and graft survival

The median time from kidney transplantation to BKvAN diagnosis was 11 [5-24] months.

When BKvAN was diagnosed, patients had a lower renal function (median eGFR of 29 [21-42.5] ml/min/1.73m² – table 1) compared to patients from the other groups (p<0.0001 – figure 1c and table 1).

Our immunosuppressive therapeutic management (table 3) consisted in the reduction of tacrolimus and reduction or withdrawal of antimetabolite exposure. Adjunction of mTOR inhibitor was almost initiated during plasmatic BKv reactivation, before BKvAN diagnosis. Intravenous immunoglobulin perfusions and adjunction of leflunomide are not systematic but in presence of hypogammaglobulinemia or according to the physician practice. In some case, when BKvAN-associated inflammatory component was highly predominant, intravenous steroid bolus was given.

Despite the minimization of immunosuppressive regimen (table 3), graft function was significantly altered in BKvAN group at the end of the follow-up compared to others groups without BKvAN (p<0.0001 – figure 1c and table 1). Patients with BKvAN had worse graft survival (36% of graft loss in BKvAN group vs 0 or 4% in patients without BKvAN, p<0.0001 – Figure 1d and table 1). In contrast, allograft outcome was similar in case of BKv-viruria or BKv-viremia or without BKv reactivation (Figure 1d and table 1).

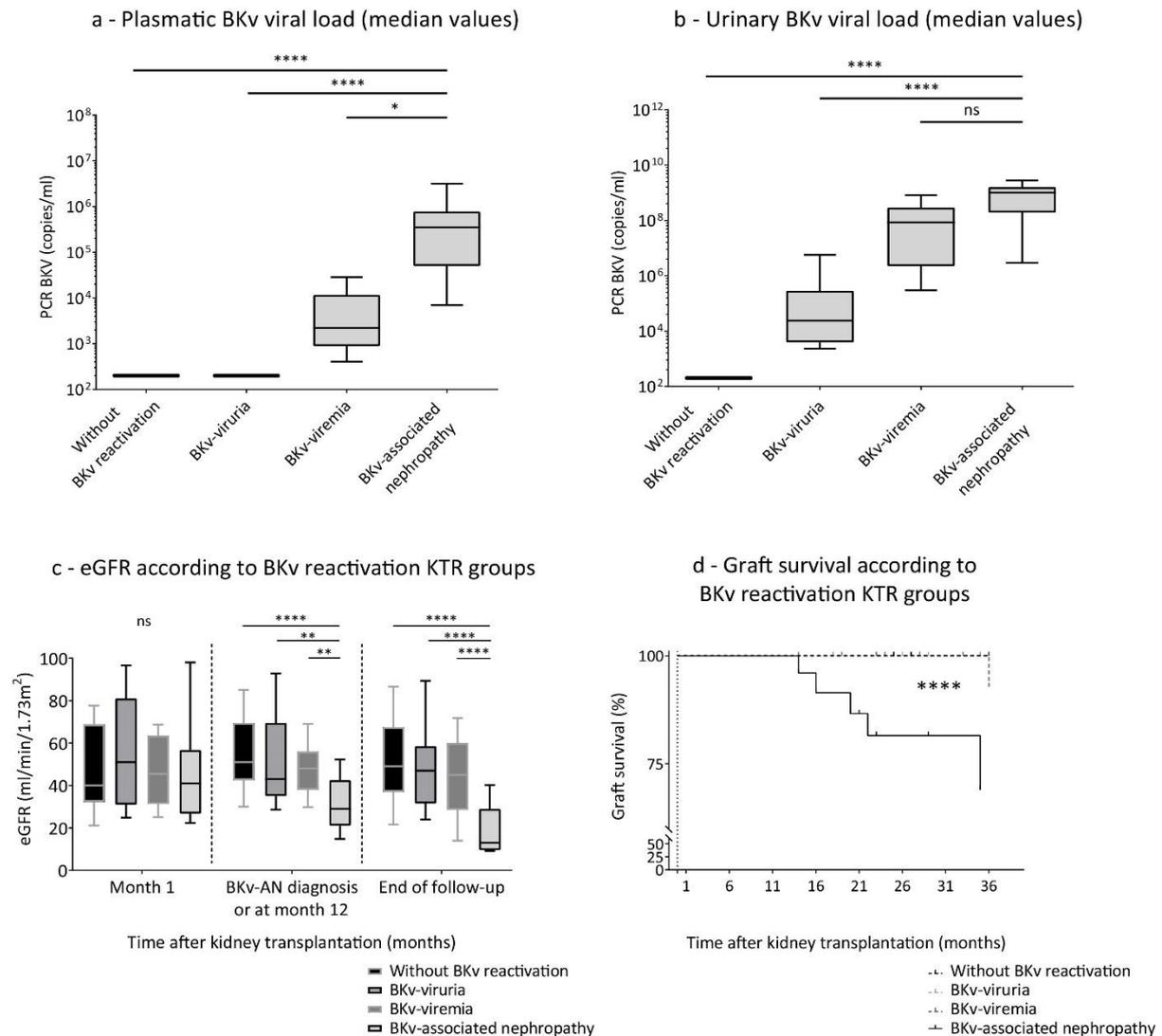


Figure 1 : BKv viral load and allograft outcome in BKv reactivation KTR groups

(a) plasma and (b) urine BKv viral loads ; (c) eGFR for the KTR groups at 1-month post-transplantation, at 12 months post transplantation or at the time of BKv-AN diagnosis and at the end of the follow-up ; (d) Graft survival rate.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$, ns = non significant

Table 2: Comparison of BKv viral load between BKv reactivation KTR groups

BKv viral load	Without BKv reactivation	BKv-viruria	BKv-viremia	BKv-associated nephropathy	<i>p</i>
n	25	25	25	25	
Plasmatic BKv viral load					
Median (copies/ml)	<200	<200	2.2 10 ³ [8.9 10 ² - 1.2 10 ⁴]	3.5 10 ⁵ [5.0 10 ⁴ - 7.8 10 ⁵]	<0.0001
Delay from kidney transplantation to BKv reactivation (months)	-	-	5.6 [3.2 - 9.1]	3.4 [2.9 - 13.4]	0.859
BKv reactivation duration (months)	-	-	9.8 [6.2 - 28.4]	13.4 [7.2 - 25.2]	0.828
Urinary BKv viral load					
Median (copies/ml)	<200	2.4 10 ⁴ [3.9 10 ³ - 2.9 10 ⁵]	8.5 10 ⁷ [2.2 10 ⁶ - 2.9 10 ⁸]	1.0 10 ⁹ [1.9 10 ⁸ - 1.6 10 ⁹]	<0.0001
Delay from kidney transplantation to BKv reactivation (months)	-	14.8 [2.6 - 51]	3.9 [1.7 - 11]	3.6 [1.7 - 13.4]	0.047
BKv reactivation duration (months)	-	37.1 [22.2 - 46.7]	23.5 [9.4 - 37.9]	15.5 [7.6 - 25.8]	0.0005

Table 3: Therapeutic management before and after BKvAN diagnosis

Therapeutic management in BKv-associated nephropathy group (n=25)	Before BKvAN diagnosis	After BKvAN diagnosis	<i>p</i>
TACROLIMUS (n, %)	21 (84)	18 (72)	0.496
Levels of TACROLIMUS (ng/ml)	8.7 [6.8-10.4]	5.6 [4.7-6.5] ****	<0,0001
Antimetabolites (n, %)	10 (40)	6 (24)	0.364
Antimetabolites exposure (AUC h.mg/l)	58 [51-74.5]	46 [30.8-75.8]	0.3656
EVEROLIMUS (n, %)	7 (28)	7 (28)	> 0.999
Levels of EVEROLIMUS (ng/ml)	5.9 [3.9-7.5]	4.6 [3.9-5.5]	0.50
Polyclonal Immunoglobulins (n, %)		22 (88)	-
Leflunomide (n, %)	5 (20)	10 (40)	0.217

Risk factors for BKvAN

We analyzed factors that could be associated with the BKvAN occurrence.

Immunosuppressive treatment

Before BKvAN diagnosis, patients in BKvAN group had significantly higher exposure to mycophenolate acid (MPA) compared to the BKv-viremia and BKv-viruria groups (respectively 58 [51-74.5] *versus* 44 [41-53] and 31.5 [24.4-44.6] - $p=0.037$ and 0.0003 ; table 4). There were no significant differences regarding the induction or curative treatments for rejection before BKvAN diagnosis (table 4).

Table 4: Comparison of immunosuppressive treatment between BKv reactivation KTR groups

Immunosuppressive treatment	Without BKv reactivation	BKv-viruria	BKv-viremia	BKv-associated nephropathy	p
n	25	25	25	25	
INDUCTION TREATMENT (n, %)	23 (92)	22 (88)	25 (100)	25 (100)	0.128
THYMOGLOBULINES (n, %)	11 (44)	6 (24)	13 (52)	15 (60)	0.065
ANTI-IL2 RECEPTOR (n, %)	14 (56)	19 (76)	12 (48)	10 (40)	
MAINTENANCE TREATMENT					
TACROLIMUS (n, %)	18 (72)	19 (76)	16 (64)	21 (84)	0.541
Levels of TACROLIMUS (ng/ml)	9.4 [8.2-11.7]	9.1 [8.7-9.7]	9.1 [7.7-11.1]	8.6 [6.7-10.2]	0.755
Antimetabolites exposure (AUC h.mg/l)	55 [47-63.5]	31.5 [24.4-44.6]	44 [41-53]	58 [51-74.5] ***	0.0007
CURATIVE REJECTION TREATMENTS					
Intravenous Steroid boluses (n, %)	5 (20)	5 (20)	9 (36)	10 (40)	0.061
THYMOGLOBULINES (n, %)	1 (4)	1 (4)	4 (16)	1 (4)	0.599
Plasma Exchanges (n, %)	2 (8)	4 (16)	8 (32)	6 (24)	0.074
RITUXIMAB (n, %)	2 (8)	4 (16)	8 (32)	4 (16)	0.244
BORTEZOMIB (n, %)	2 (8)	5 (20)	3 (12)	4 (16)	0.646
ECULIZUMAB (n, %)	0 (0)	2 (8)	2 (8)	0 (0)	>0.9999
CYCLOPHOSPHAMIDE (n, %)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0.653

HLA mismatches

We analyzed the sub group of plasmatic BKv reactivation with or without BKvAN (BKvAN and BKv-viremia groups). We observed that KTR with BKv-viremia had significantly higher number of total [HLA-A,-B,-DR,-DQ] and class II [HLA-DR,-DQ] mismatches in comparison to patients with BKvAN (respectively, $p=0.0053$ and $p=0.0180$ – Figures 2a and 2b). There is no significant difference in class I [HLA-A,-B] mismatches number ($p=0.061$ – Figure 2c).

We found a significant inverse correlation between the number of HLA mismatches and plasma BKv viral load. BKv-viremia KTR had significantly more HLA mismatches with lower BKv viral load compared with BKvAN group (total [HLA-A,-B,-DR,-DQ] mismatches: $rs = -0.2815$ [-0.5254;0.0050], $p=0.0476$ – Figure 2d).

To identify HLA-matching degree as a BKvAN risk factor, we stratified HLA-matching degree in sub-groups. We found a cutoff of less than 5 total-HLA mismatches and less than 3 class II-HLA mismatches which were associated with BKvAN occurrence ($p=0.007$, figures 2e and $p=0.021$, figure 2f respectively). In presence of less than 5 [HLA-A,-B,-DR,-DQ] mismatches, 16% of KTR developed a BKv-viremia whereas 56% of KTR developed a BKvAN ($p=0.007$ - figure 2e). For class II, in presence of less than 3 [HLA-DR,-DQ] mismatches, 40% of KTR developed a BKv-viremia whereas 76% of KTR developed a BKvAN ($p=0.021$ – figure 2f).

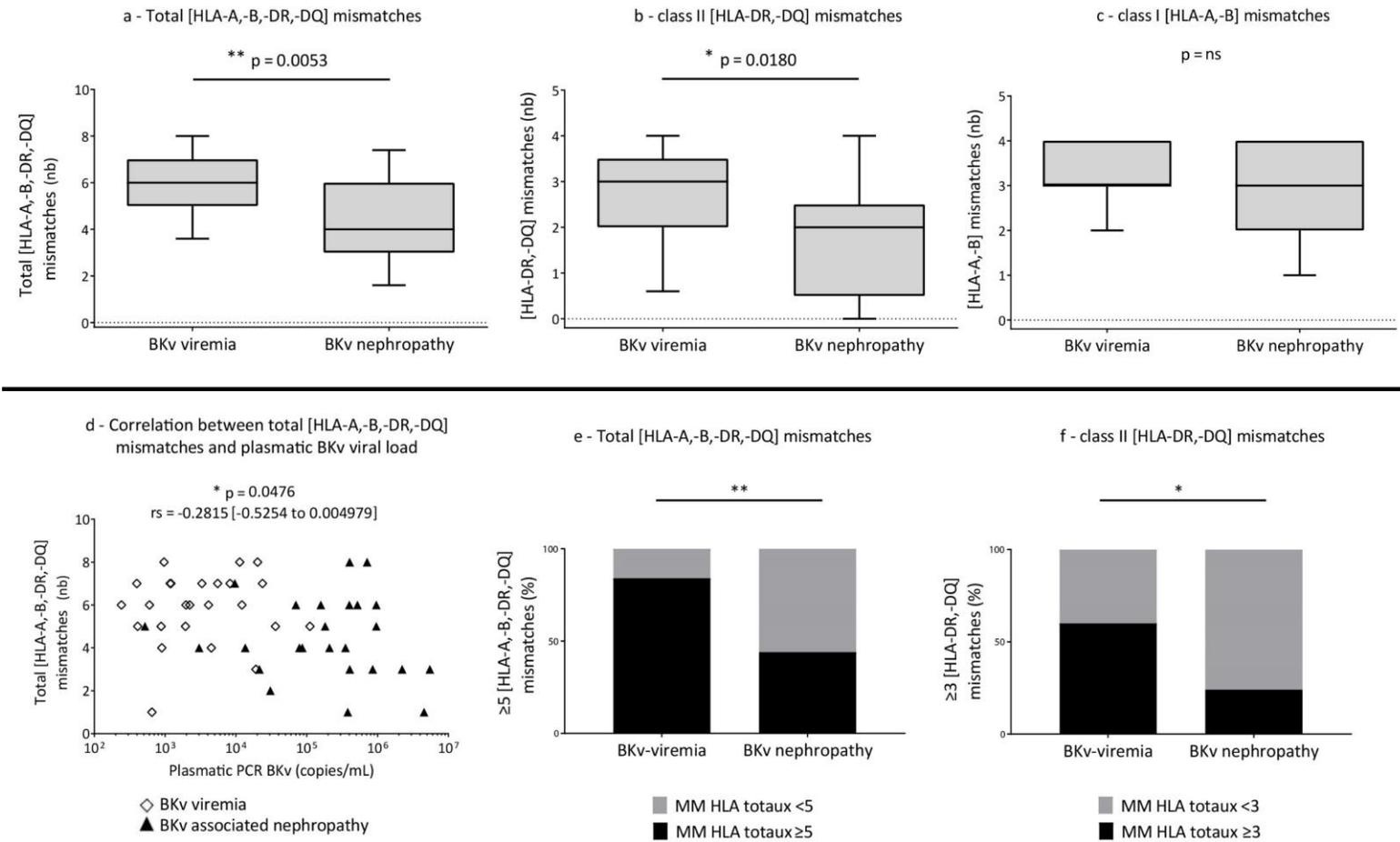


Figure 2 : HLA mismatches as risk factor for BKv-AN in case of BKv viremia

Comparisons of HLA mismatches between BKv viremia and BKv-AN: (a) total [HLA-A,-B,-DR,-DQ], (b) class II [HLA-DR,-DQ], (c) class I [HLA-DR,-DQ] - (d) Correlation between total [HLA-A,-B,-DR,-DQ] mismatches and plasmatic BKv viral load, (e) Proportion of total [HLA-A,-B,-DR,-DQ] ≥ 5 and (f) class II [HLA-DR,-DQ] ≥ 3 . *p<0.05, **p<0,005, ns = non significant

BKv specific T cell functionality

First, we tested the ability of BKv specific T cells to respond to a BKv-specific stimulation in healthy donors. We found a polyfunctional CD8 T cell response, with abilities to proliferate (Figure 3 – Part I), to secrete unique and multiple cytokines (Figure 4 – Part I), and to develop CD8 cytotoxicity (Figure 5 – Part I).

Then, we tested the ability of BKv specific T cells to respond to a BKv-specific stimulation in KTR groups.

Proliferative capacities :

The proliferative capacities of BKv-specific CD8 T cells were significantly lower in BKvAN group compared to KTR without BKv reactivation, BKv-viruria and BKv-viremia groups (respectively $p=0.0005$, $p<0.0001$ and $p=0.032$ - Figure 3a, Part II). Based on a cut-off of 10 proliferative cells to define responder and no-responder individuals (Figure 3, Part I), we highlighted a gradual loss of responder patients according to the level of BKv reactivation ($p<0.0001$ and Figure 3b, Part II). We also found a significant inverse correlation between proliferative capacities of BKv-specific CD8 T cells and plasmatic BKv viral load ($p<0.0001$ - Figure 3c, Part II). The results were similar for proliferative capacities of BKv-specific CD4 T cells (Figure S2).

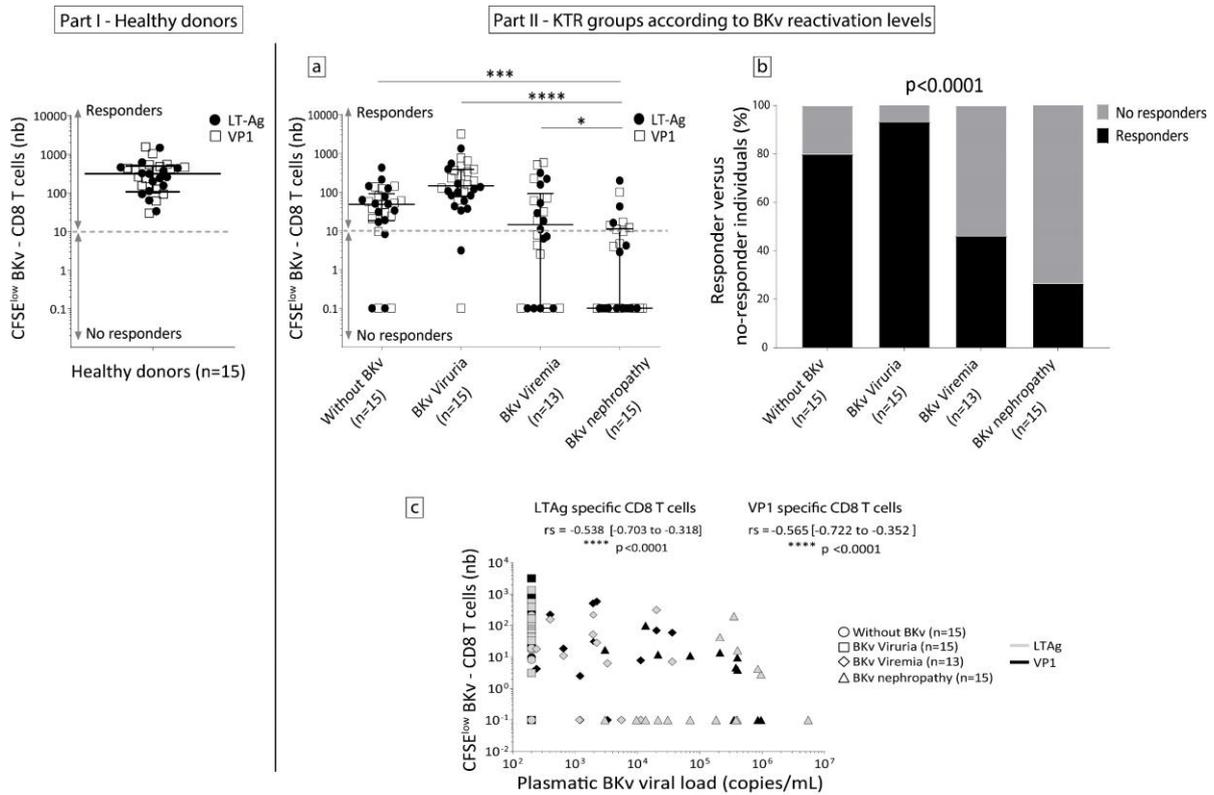


Figure 3 : Proliferative capacity impairment of BKv - CD8 T cells as risk factor for BKvAN

Part I – Healthy donors: Proliferative capacities of BK-v specific CD8 T cells.

Part II - BKv reactivation KTR groups: Proliferative capacities of BK-v specific CD8 T cells were expressed in (a) absolute number and (b) responder/no-responder patients. CFSE^{low} T cells represent the number of proliferative T cells among 10.000 CD8 T cells. A cut-off of 10 CFSE^{low} T cells was used to determine responders and no-responders individuals. (c) Correlation between proliferative capacities of BK-v specific CD8 T cells and plasmatic BKv viral load. * $p < 0.05$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$, ns = non significant

Cytokine secretion capacities :

Regarding cytokine secretion of BKv-specific CD8 T cells in KTR groups (figure 4, part II), multiple cytokine secretion capacities were significantly lower in BKvAN group compared to BKv-viremia (secretion of TNF⁺: p=0.012, figure 4a and secretion of IFN⁺TNF⁺: p=0.049, figure 4b) and BKv-viruria (secretion of IFN⁺TNF⁺: p=0.0009, figure 4b) groups. Based on a cut-off of 0.1 cytokine-secreting CD8 T cells to define responder and no-responder individuals (Figure 4, Part I), we highlighted a gradual loss of responder patients according to the level of BKv reactivation in IFN⁺TNF⁺ secretion capacities (p=0.0461 and figure 4d). We also found a significant inverse correlation between IFN⁺TNF⁺ secretion capacities of BKv-specific CD8 T cells and plasmatic BKv viral load (p<0.05 - Figure 4e, Part II). There are no significant differences in IFN secretion or in cytokine secreting-CD4 T cells after BKv specific stimulation (data not show).

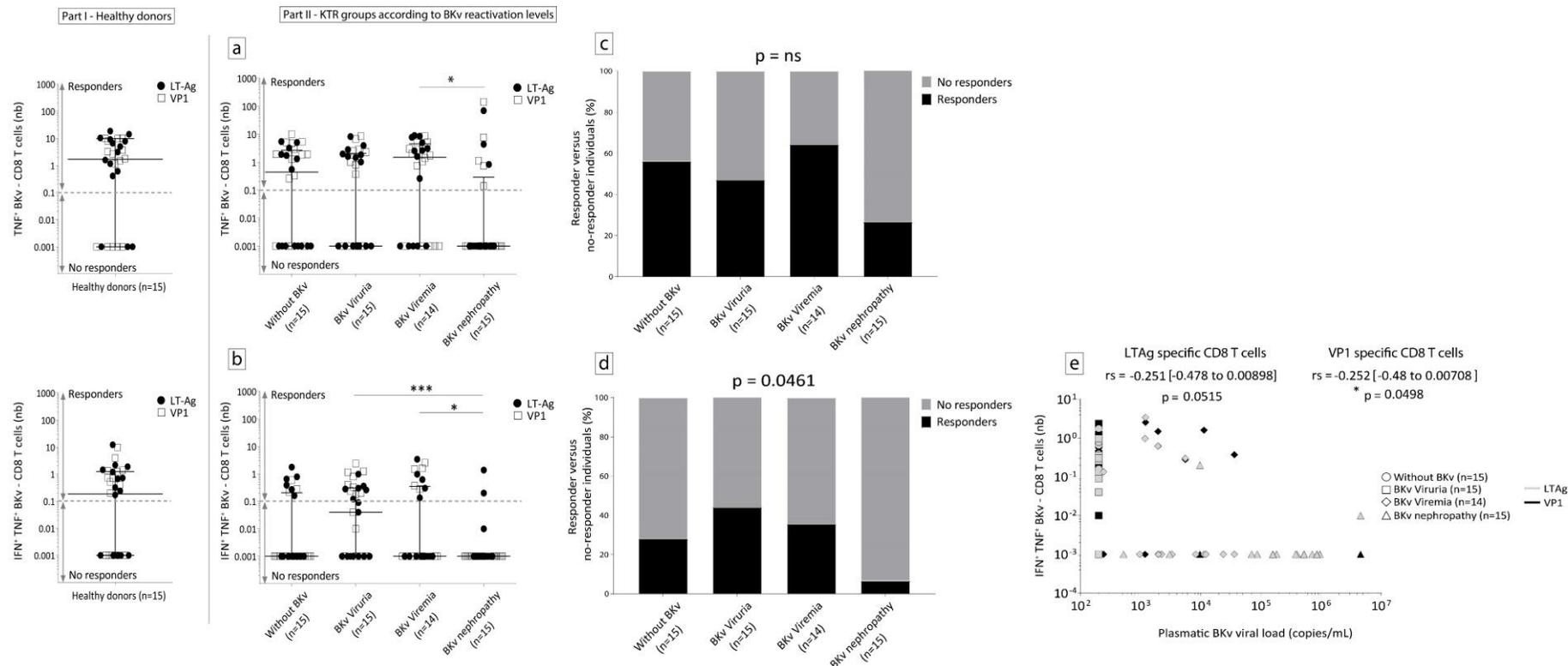


Figure 4 : Cytokine secretion capacity impairment of BKv - CD8 T cells as risk factor for BKvAN

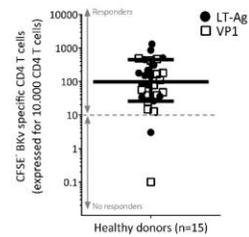
Part I – Healthy donors: TNF secretion and IFN & TNF secretion

Part II - BKv reactivation KTR groups: TNF and IFN&TNF cytokine secretion capacities expressed in (a and b) absolute number and (c and d) responder and no-responder patients. (e) Correlation between IFN&TNF secretion capacities and plasmatic BKv viral load.

TNF+- and IFN+/TNF+- T cells represent the number of TNF and IFN&TNF-secreting CD8 T cells among 10.000 CD8 T cells. A cut-off of 0.1 cytokine-secreting T cells was used to determine responders and no-responders individuals.

*p<0.05, ***p<0,0005, ns = non significant

Part I - Healthy donors



Part II - KTR groups according to BKv reactivation levels

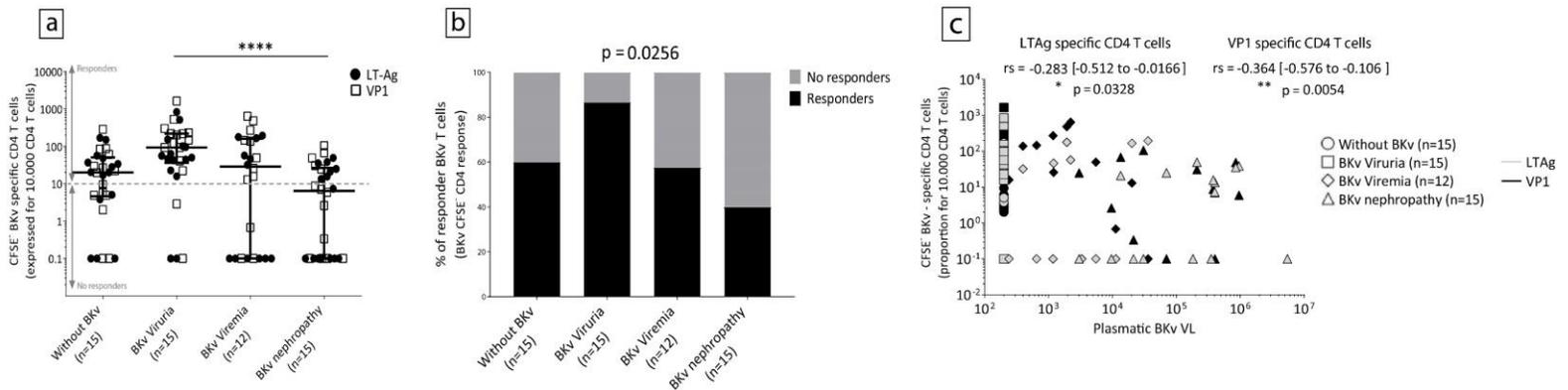


Figure S2 : Alteration of BK-v specific CD4 T cell proliferative capacities as risk factor for BKv-AN

Part I - Healthy donors: proliferative capacities of BK-v specific CD4 T cells

Part II - BKv reactivation KTR groups: proliferative capacities of BK-v specific CD4 T cells were expressed (a) in absolute number and (b) responder/no-responder patients. (c) Correlation between proliferative capacities of BK-v specific CD4 T cells and plasmatic BKv viral load. CFSE^{low} T cells represent the number of proliferative T cells expressed for 10.000 CD4 T cells. Cut-off of 10 CFSE^{low} T cells is used to determine responders and no-responders individuals.

CD8-cytotoxicity capacities :

Regarding CD8-cytotoxicity of BKv-specific CD8 T cells, there is no significant difference in BKvAN group compared to others groups (figure 5a, part II). However, based on a cut-off of ten 7AAD⁺ target cells to define responder and no-responder individuals (Figure 5, Part I), we highlighted a gradual loss of responder patients according to the level of BKv reactivation ($p=0.0414$ and figure 5b).

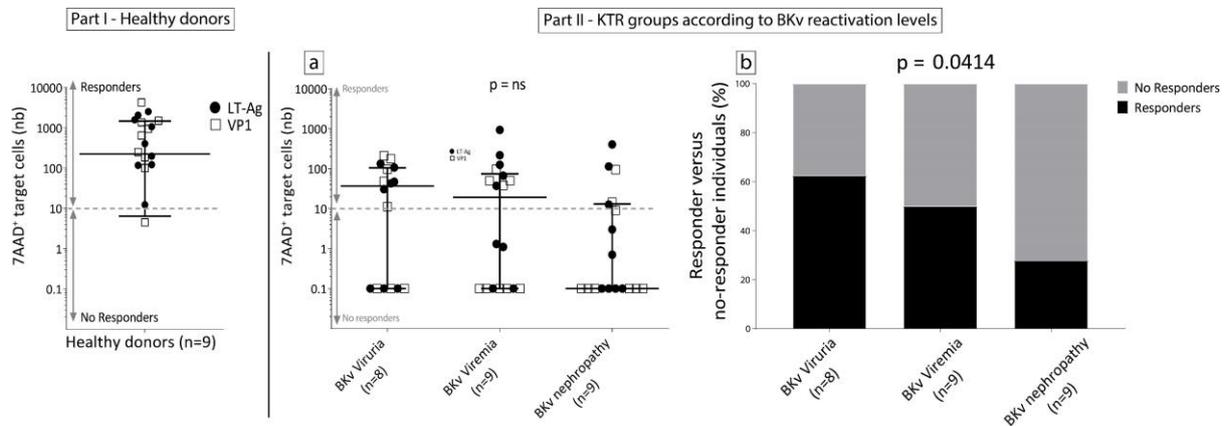


Figure 5 : Cytotoxic capacity impairment of BKv - CD8 T cells as risk factor for BKvAN

Part I - Healthy donors: Mortality rate of BKv-target cells

Part II - BKv reactivation KTR groups: Mortality rate of BKv-target cells expressed (a) in absolute number and (b) responder and no-responders patients.

7AAD⁺ target cells represent the number of dead target cells expressed for 10.000 target cells. A cut-off of 10 7AAD⁺ target cells was used to determine responders and no-responders individuals. ns = non significant

Finally, we tested the ability of CD8 T cells to respond to viral peptides distinct from BKv peptides in healthy donors and KTR groups. After stimulation by CEF peptides, we found a polyfunctional CD8 T cell response, with abilities to proliferate (Figure 6 – Part I), to secrete unique and multiple cytokines (Figure 6 – Part II), and to develop CD8 cytotoxicity (Figure 6 – Part III). There is no significant difference between healthy donors and KTR groups, showing a specific impairment of BKv-specific T cell response.

Taking together, our data found a gradual or total loss of BK-v specific T cell polyfunctionality according to the level of BKv reactivation (Figures 3-5 and S2 – Part II).

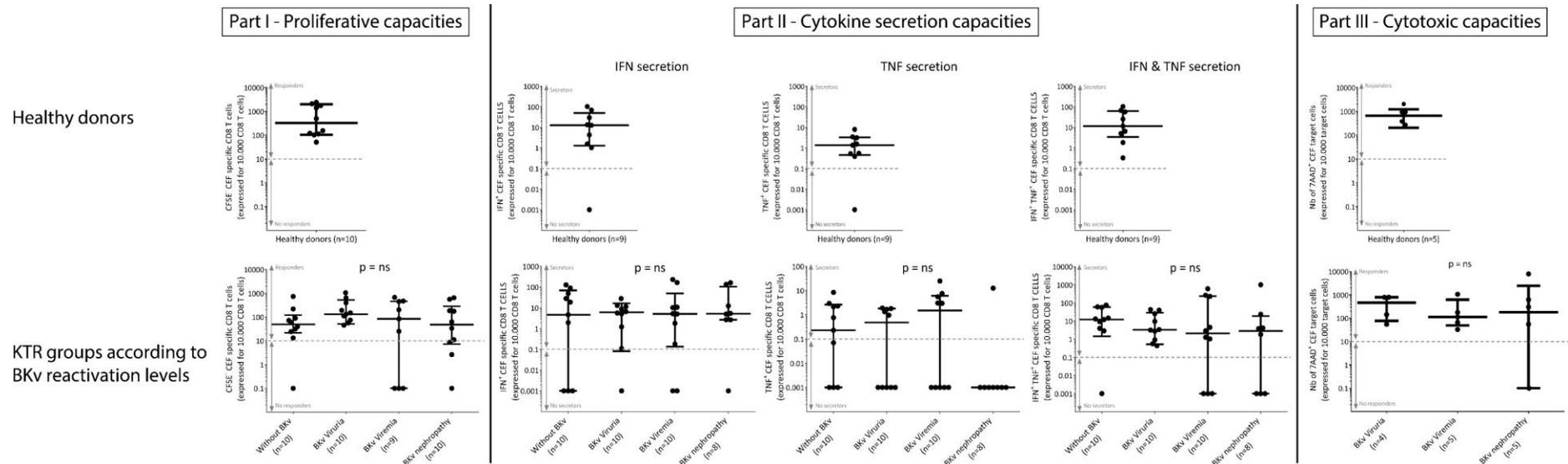


Figure 6 : Polyfunctionality of antiviral – CD8 T cells (after CEF stimulation) in healthy donors and BKv reactivation KTR groups

(Part I) Proliferative, (Part II) Cytokine secretion and (Part III) Cytotoxic capacities after CEF stimulation between healthy donors and BKv reactivation KTR groups. ns = non significant

DISCUSSION

We showed that patients with BKvAN had a severe impairment of BKv-specific T cell functionality, which may participate to the progression of BKvAN. Our results highlighted the deleterious impact of BKv replication within renal parenchyma, with a graft loss rate of 36%. Responsible of premature allograft functional decline, BKvAN remains a serious threat on allograft outcome, leading to return in dialysis in at least 50% of cases¹⁵⁻¹⁷.

There is currently no specific treatment for BKvAN. The reduction of immunosuppressive treatment currently represents the primary mode of intervention and appears to be the more effective treatment^{2,5,18}. However, as show in our study, in case of proven BKvAN, the immunosuppressive regimen minimization doesn't allow to solve the situation and we have still to deal with a high rate of graft lost. The efficacy of nonspecific antiviral agents (cidofovir, immunoglobulin or immunosuppressive treatment with antiviral activity such as mTor inhibitor or Leflunomide) was evaluated in small studies¹⁹⁻²³. However, due to the lack of large prospective randomized trials, there are no definitive data confirming their effectiveness and no consensual approach to use them^{2,5}. The best approach remains probably to reduce the global immunosuppression early during the occurrence of plasmatic BKv replication, in order to favor the development of a specific anti BKv response. This hypothesis is based on our results and previous results showing a profound alteration of the cellular response against BKv in case of BKvAN. However, the decrease of the antirejection treatment could expose the patient to the risk of developing an acute rejection.

The use of intensive immuno-suppressive strategies have been described as a key factor for the emergence of BKvAN^{2,5}. The risk for BKvAN was higher with certain immunosuppressive regimens including antithymocyte globulin or tacrolimus/mycophenolate combinations^{24,25}. Tacrolimus and acute rejection episodes were also associated with a higher incidence of BKvAN²⁶. Here, we reported that only an antimetabolite higher-exposure was a risk factor for BKvAN. However, the fact that the general antiviral response was not affected in our patients having a BKvAN and that specifically the anti BKv-specific response was strongly impaired suggests that other mechanisms and not only the weight of the immunosuppressive treatment are involved in the physiopathology of BKvAN.

To control the development of BKvAN, BKv-specific T-cell response plays a crucial role, although the pathophysiological mechanisms are unclear¹¹. Virus-specific T cell monitoring has been explored to optimize management of virus control in transplant patients²⁷. Here, we

highlighted a gradual loss of BKv-specific T cell functionality, suggesting an exhaustion of BKv-specific T cells according to BKv reactivation levels. We also found an inverse correlation between BKv viral load and BKv-specific T-cell functionality and between BKv viral load and donor/recipient HLA matching degree. To our knowledge, it is the first study to show an association between BKv-specific T-cell polyfunctionality and HLA mismatches. Our data could suggest an impairment of BKv-immune surveillance in highly matched patients.

We also found that a higher number of class II [HLA-DR,-DQ] and total [HLA-A,-B,-DR,-DQ] HLA mismatches seems to be associated with a better control of BKv replication and a lower risk of BKvAN.^{28,29} Human leukocyte antigen (HLA) matching is an important challenge for a successful transplantation and allogeneic kidney transplantation represents a complex immunologic situation. The number of HLA mismatches between recipient and donor is associated with a higher risk of acute rejection and the use of a stronger immunosuppressive regimen which might favor infectious diseases including viral replication. A significant negative impact on allograft survival with HLA mismatch has been observed in context of kidney transplantation from deceased or living donors³⁰⁻³². In renal transplantation, the transplant organ which represent a reservoir for BKv, will allow the replication of the virus that has to be controlled by the immune system. However, despite to the link between HLA-restricted viral recognition by cellular immune response, some organ determinants of tissue inflammation or injury⁶ will create BKv-replication permissiveness. Therefore, the impact of HLA mismatches on the physiopathology of BKvAN has to be determined. Some HLA loci are associated with the BKv reactivation and could modulate the BKv-cellular immune response and so the course of the infection. In a retrospective cohort, low risk of BKv-viremia was associated with matching of HLA-A2, B44 and DR15³³. Interestingly, the lack of HLA-C7 allele in both donor and recipient was associated with sustained BKv-viremia, suggesting a likely role of this allele in the control of BKv infection²⁹. Unfortunately, donor/recipient HLA-C typages were not available in our cohort and the number of included patients wasn't sufficient to identify a link between specific HLA allele and BKvAN.

Despite HLA mismatches are associated with BKv-viremia^{28,34}, the impact of HLA matching on the development and the progression of BKvAN remains controversial³⁵. On one hand, HLA mismatching can promote the development of BKvAN through inflammatory processes or because an heavy immuno-suppression requirement³⁶. On the other hand, more recent studies found that BKvAN occurred even in context of good HLA matching^{37,16} and, more importantly, an inverse correlation between HLA matching degree and graft loss prevalence was observed

in context of BKvAN³⁸. Interestingly, in a model of immuno-suppression-free transplanted mice with the murine polyomavirus-associated nephropathy (mPvAN), major histocompatibility complex (MHC) matching didn't protect recipients from the development of mPvAN, whereas the lack of MHC class I molecules did not impact the development of mPvAN³⁹. These data suggest an interplay between viral infection and allogenic immune response in the pathogenesis of mPvAN³⁹. The negative impact of HLA matching in class II, but not in class I alone, suggests a pivotal role of CD4 help. CD4 T cells coordinate the establishment of CD8 T cell response, especially in memory CD8 T cells maintenance during recall antigen expansion⁴⁰. We have previously described that functional memory CD4 T cells generated from a distinct antigenic source (hetero-specific helpers) could provide direct and effective help to memory CD8 T cells in mouse model⁴¹. A higher HLA degree mismatching could induce alloreactivity and provide hetero-specific CD4 help to BKv-specific memory CD8 T cells. This hetero-specific help could lead to a better host's ability to maintain an effective BKv-specific memory CD8 T cell response, protective against BKvAN. Heterologous immunity has previously described in kidney allograft biopsies. Biopsies from patients with BKv-viremia or BKvAN contained more abundant alloreactive T cell clones than virus-reactive clones, with an alloreactive/BKv-reactive cell ratio to 7.7⁴².

In summary, our study showed the deleterious impact of the BKv replication within the renal parenchyma, without impact of systemic BKv reactivation alone on allograft outcome. We are able to bring out a higher number of HLA mismatches in KTR with BKv-viremia and a gradual or total loss of BKv-specific T cell polyfunctionality in KTR with BKvAN. We also observed an inverse correlation between number of HLA mismatches or BKv-specific T cell functionality and BKv viral load. These data suggest an interplay between BKv-infection control and the allogenic immune response, leading to an impairment of BKv-immune surveillance within the renal parenchyma in highly matched patients. In context of higher HLA mismatches, a hetero-specific CD4 help could lead to a better host's ability to maintain an effective BKv-specific memory CD8 T cell response, protective against BKvAN.

REFERENCES

1. Tonelli, M. *et al.* Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am. J. Transplant.* **11**, 2093–2109 (2011).
2. Hirsch, H. *et al.* Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* **79**, 1277–1286 (2005).
3. Hirsch, H. *et al.* European perspective on human polyomavirus infection, replication and disease in solid organ transplantation. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 74–88 (2014).
4. Hirsch, H. *et al.* Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **347**, 488–496 (2002).
5. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **9**, S1-155 (2009).
6. Hirsch, H. & Steiger, J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect. Dis.* **3**, 611–623 (2003).
7. Egli, A. *et al.* Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J. Infect. Dis.* **199**, 837–846 (2009).
8. Seemayer, C. A. *et al.* BK virus large T and VP-1 expression in infected human renal allografts. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **23**, 3752–3761 (2008).
9. Binggeli, S. *et al.* Polyomavirus BK-specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **7**, 1131–1139 (2007).
10. Jiang, S., Herrera, O. & Lechler, R. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 550–557 (2004).
11. Dekeyser, M., François, H., Beaudreuil, S. & Durrbach, A. Polyomavirus-Specific Cellular Immunity: From BK-Virus-Specific Cellular Immunity to BK-Virus-Associated Nephropathy? *Front. Immunol.* **6**, 307 (2015).
12. Drachenberg, C. B., Hirsch, H. H., Ramos, E. & Papadimitriou, J. C. Polyomavirus disease in renal transplantation: review of pathological findings and diagnostic methods. *Hum. Pathol.* **36**, 1245–1255 (2005).
13. Nickleit, V. *et al.* The Banff Working Group Classification of Definitive Polyomavirus Nephropathy: Morphologic Definitions and Clinical Correlations. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **29**, 680–693 (2018).
14. Dekeyser, M. *et al.* Refractory T-Cell Anergy and Rapidly Fatal Progressive Multifocal Leukoencephalopathy After Prolonged CTLA4 Therapy. *Open Forum Infect. Dis.* **4**, ofx100 (2017).
15. Ramos, E. *et al.* BK virus nephropathy diagnosis and treatment: experience at the University of Maryland Renal Transplant Program. *Clin. Transpl.* 143–153 (2002).
16. Ramos, E. *et al.* Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 2145–2151 (2002).
17. Vasudev, B. *et al.* BK virus nephritis: risk factors, timing, and outcome in renal transplant recipients. *Kidney Int.* **68**, 1834–1839 (2005).
18. Halim, M. A. *et al.* Long-Term Follow-Up of Active Treatment Versus Minimization of Immunosuppressive Agents in Patients With BK Virus-Associated Nephropathy After Kidney Transplant. *Exp. Clin. Transplant.* **14**, 58–65 (2016).
19. Kable, K., Davies, C. D., O'connell, P. J., Chapman, J. R. & Nankivell, B. J. Clearance of BK Virus Nephropathy by Combination Antiviral Therapy With Intravenous Immunoglobulin. *Transplant. Direct* **3**, e142 (2017).
20. Josephson, M. A. *et al.* Treatment of renal allograft polyoma BK virus infection with leflunomide. *Transplantation* **81**, 704–710 (2006).
21. Williams, J. W. *et al.* Leflunomide for polyomavirus type BK nephropathy. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1157–1158 (2005).
22. Kuten, S. A. *et al.* Observations on the use of cidofovir for BK virus infection in renal transplantation. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* **16**, 975–983 (2014).
23. Jacobi, J. *et al.* BK viremia and polyomavirus nephropathy in 352 kidney transplants; risk factors and potential role of mTOR inhibition. *BMC Nephrol.* **14**, 207 (2013).

24. Hirsch, H. *et al.* Polyomavirus BK replication in de novo kidney transplant patients receiving tacrolimus or cyclosporine: a prospective, randomized, multicenter study. *Am. J. Transplant.* **13**, 136–145 (2013).
25. Dharnidharka, V. R., Cherikh, W. S. & Abbott, K. C. An OPTN analysis of national registry data on treatment of BK virus allograft nephropathy in the United States. *Transplantation* **87**, 1019–1026 (2009).
26. Demey, B. *et al.* Risk factors for BK virus viremia and nephropathy after kidney transplantation: A systematic review. *J. Clin. Virol.* **109**, 6–12 (2018).
27. Sester, M., Leboeuf, C., Schmidt, T. & Hirsch, H. H. The ‘ABC’ of Virus-Specific T Cell Immunity in Solid Organ Transplantation. *Am. J. Transplant.* **16**, 1697–1706 (2016).
28. Thangaraju, S. *et al.* Risk Factors for BK Polyoma Virus Treatment and Association of Treatment With Kidney Transplant Failure: Insights From a Paired Kidney Analysis. *Transplantation* **100**, 854–861 (2016).
29. Bohl, D. L. *et al.* Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. *Am. J. Transplant.* **5**, 2213–2221 (2005).
30. Williams, R. C., Opelz, G., McGarvey, C. J., Weil, E. J. & Chakker, H. A. The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts From Deceased Donors. *Transplantation* **100**, 1094–1102 (2016).
31. Williams, R. C., Opelz, G., Weil, E. J., McGarvey, C. J. & Chakker, H. A. The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts 2: Living Donors, Summary, Guide. *Transplant. Direct* **3**, e152 (2017).
32. Shi, X. *et al.* What is the impact of human leukocyte antigen mismatching on graft survival and mortality in renal transplantation? A meta-analysis of 23 cohort studies involving 486,608 recipients. *BMC Nephrol.* **19**, 116 (2018).
33. Masutani, K., Ninomiya, T. & Randhawa, P. HLA-A2, HLA-B44 and HLA-DR15 are associated with lower risk of BK viremia. *Nephrol. Dial. Transplant.* **28**, 3119–3126 (2013).
34. Hässig, A. *et al.* Association of BK viremia with human leukocyte antigen mismatches and acute rejection, but not with type of calcineurin inhibitor. *Transpl. Infect. Dis.* **16**, 44–54 (2014).
35. Scadden, J. R., Sharif, A., Skordilis, K. & Borrows, R. Polyoma virus nephropathy in kidney transplantation. *World J. Transplant.* **7**, 329–338 (2017).
36. Awadalla, Y., Randhawa, P., Ruppert, K., Zeevi, A. & Duquesnoy, R. J. HLA mismatching increases the risk of BK virus nephropathy in renal transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **4**, 1691–1696 (2004).
37. Helanterä, I. *et al.* BK virus viremia in a well-HLA-matched kidney transplant population mainly on low-dose cyclosporine-based immunosuppression. *Clin. Transplant.* **26**, E596-601 (2012).
38. Drachenberg, C. B. *et al.* Negative impact of human leukocyte antigen matching in the outcome of polyomavirus nephropathy. *Transplantation* **80**, 276–278 (2005).
39. Albrecht, J. A. *et al.* Adaptive immunity rather than viral cytopathology mediates polyomavirus-associated nephropathy in mice. *Am. J. Transplant.* **12**, 1419–1428 (2012).
40. Novy, P., Quigley, M., Huang, X. & Yang, Y. CD4 T cells are required for CD8 T cell survival during both primary and memory recall responses. *J. Immunol.* **179**, 8243–8251 (2007).
41. de Goër de Herve, M. G., Cariou, A., Simonetta, F. & Taoufik, Y. Heterospecific CD4 help to rescue CD8 T cell killers. *J. Immunol.* **181**, 5974–5980 (2008).
42. Zeng, G. *et al.* Antigen-specificity of T-cell Infiltrates in Biopsies with T-cell Mediated Rejection and BK Polyomavirus Viremia: Analysis by Next Generation Sequencing. *Am. J. Transplant.* (2016). doi:10.1111/ajt.13911

Partie 2 - Méthode d'évaluation du risque individuel de Nx BK-v : brevet FR1855342

A partir des données décrites plus haut, notre groupe a développé la méthode NEPHROVIR. Il s'agit d'une méthode biologique non-invasive d'évaluation du risque individuel de Nx BK-v.

Cette méthode a fait l'objet d'un dépôt de brevet FR1855342 en date du 18/06/2018. Elle a pour objectif d'aider au diagnostic de Nx BK-v sans avoir recours à la biopsie du greffon rénal et de stratifier le risque de développer cette complication en cas de virémie BK-v.

Notre méthode est basée sur la combinaison innovante de différents biomarqueurs (Figure 26).

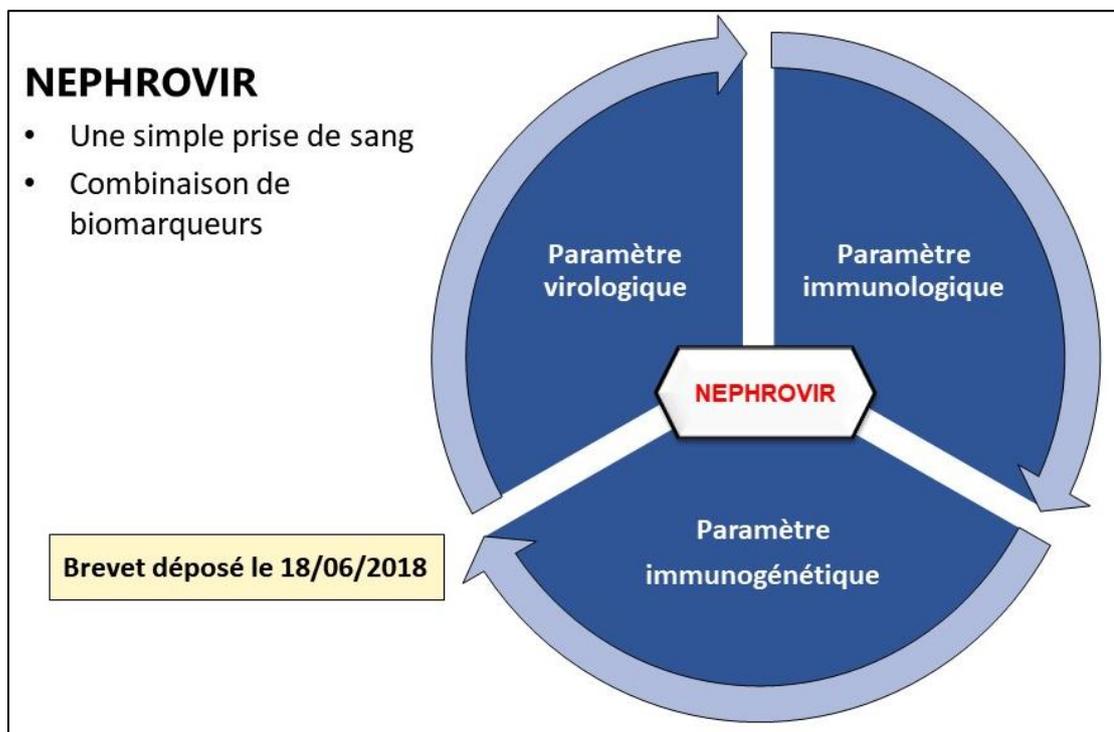


Figure 26 : Méthode biologique non-invasive d'évaluation du risque individuel de Nx BK-v basée sur la combinaison de biomarqueurs indépendants

Par la combinaison innovante de différents biomarqueurs, notre méthode permet l'identification de 3 niveaux de risque de Nx BK-v : risque faible, intermédiaire et élevé. Cette méthode permet d'aider au suivi individualisé et à la gestion de l'immunosuppression des patients transplantés rénaux.

La Figure 27 ci-dessous montre l'index de stratification de risque de Nx BK-v obtenu à partir de la méthode NEPHROVIR, avec les performances de test associées.

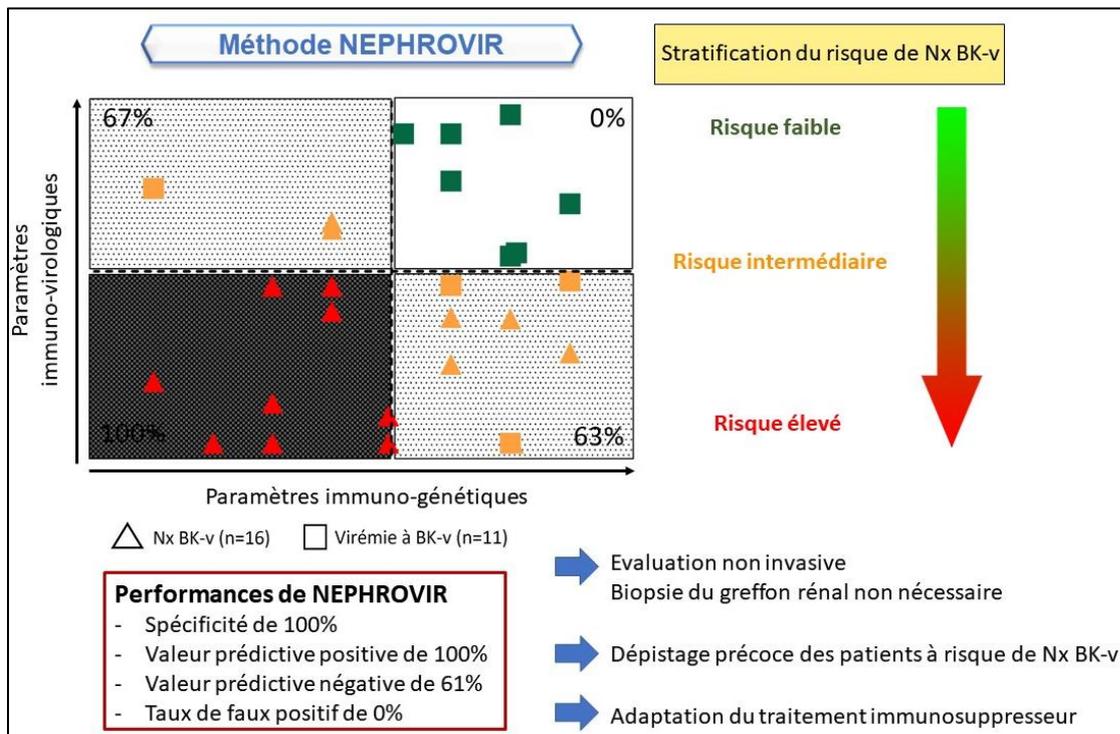


Figure 27 : Index de stratification de risque de Nx BK-v obtenu à partir de la méthode NEPHROVIR

Partie 3 - Evaluation du JC-v et des LT spécifiques du JC-v en transplantation rénale

Notre groupe s'est également intéressé au JC-virus (JC-v), autre membre de la famille des *Polyomavirus*. La réactivation du JC-v est responsable de la leuco-encéphalopathie multifocale progressive en situation d'immunosuppression profonde induite par le VIH ou les traitement immunosuppresseurs.

Article 2 - Dekeyser M., de Goër de Herve MG., Hendel-Chavez H., Labeyrie C., Adams D., Adebs Nasser G., Gasnault J., Durrbach A. and Taoufik Y. (2017) Refractory T-Cell Anergy and Rapidly Fatal Progressive Multifocal Leukoencephalopathy following Prolonged CTLA4 Therapy. *OFID*, ofx100

Afin de caractériser les LT spécifiques du JC-v en contexte de leuco-encéphalopathie multifocale progressive (LEMP), notre groupe a étudié la fonctionnalité des LT spécifiques du JC-v en situation de réactivation JC-v.

Nous avons décrit un cas de LEMP d'évolution mortelle en moins de 3 mois associé à un état d'anergie des lymphocytes T spécifiques du JC-v chez un patient transplanté rénal sous CTLA4-Ig (Belatacept, inhibiteur sélectif du 2^{ème} signal d'activation lymphocytaire et inducteur d'anergie lymphocytaire). La restauration de l'immunité cellulaire spécifique du JC-v était impossible malgré l'ajout *in vitro* de molécule visant à lever l'inhibition lymphocytaire.

Ainsi, les LEMP survenant dans un contexte de biothérapie inductrice d'anergie lymphocytaire pourrait représenter un sous-groupe émergent de LEMP doté d'une résistance majeure à la reconstitution de l'immunité cellulaire spécifique du JC-v, seule option thérapeutique actuellement disponible.

Refractory T-Cell Anergy and Rapidly Fatal Progressive Multifocal Leukoencephalopathy After Prolonged CTLA4 Therapy

Manon Dekeyser,^{1,5} Marie-Ghislaine de Goër de Herve,¹ Houria Hendel-Chavez,¹ Céline Labeyrie,² David Adams,² Ghaidaa Adebbs Nasser,⁴ Jacques Gasnault,^{1,3} Antoine Durrbach,^{5,6,a} and Yassine Taoufik^{1,a}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1184, Immunology of Viral Infection and Auto-immune Diseases, Normal and Pathological T Memory, Faculté de Médecine Paris-Sud, le Kremlin-Bicêtre; ²Department of Neurology, ³Department of Internal Medicine, Unit of Neuro-Virological Diseases, ⁴Department of Radiology, and ⁵Institut Francilien de Recherche en Néphrologie et Transplantation, Department of Nephrology and Transplantation, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, France; and ⁶INSERM UMR 1197, Interactions between stem cells and their niches in physiology, tumors and tissue repair - Stem cells, Transplantation, Immunoregulation, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Villejuif, France

Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) is a deadly demyelinating disease due to central nervous system replication of the human polyomavirus JC virus (JCV) in immunosuppressed patients. The only effective therapeutic approach is to restore anti-JCV T-cell responses. In this study, we describe a case of rapidly fatal PML with JCV T-cell anergy in a renal transplant patient treated with CTLA4-Ig (belatacept, a CD28-B7 costimulation blocker and T-cell anergy inducer). T-cell anergy could not be reversed despite several therapeutic approaches. Progressive multifocal leukoencephalopathy secondary to biotherapy-induced T-cell anergy may thus represent a subset of PML with major resistance to anti-JCV immune recovery.

Keywords. JCV-specific T cells; progressive multifocal leukoencephalopathy; transplantation.

Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) is a rare but deadly demyelinating disease of the central nervous system. The causative agent is the human polyomavirus JC virus (JCV), which infects oligodendrocytes and astrocytes [1]. Progressive multifocal leukoencephalopathy usually occurs in patients with profound cellular immunodeficiencies, due to

human immunodeficiency virus (HIV) infection or to immunosuppressive biotherapies such as natalizumab or rituximab for autoimmune diseases [1, 2]. Progressive multifocal leukoencephalopathy is also a rare complication of solid organ transplantation. After renal transplantation, the estimated incidence of PML is 0.027%, the mortality rate is approximately 80%, and the median survival time is 6 months [3]. The only therapeutic approach with proven clinical efficacy is the restoration of JCV T-cell responses [1] through early withdrawal of immunosuppressive drugs. In this study, we describe a case of anti-JCV T-cell anergy that could not be reversed despite several therapeutic approaches and was associated with rapidly fatal PML in a renal transplant recipient on belatacept (a CD28-B7 costimulation blocker and T-cell anergy inducer).

CASE REPORT

Preprogressive Multifocal Leukoencephalopathy History

A 67-year-old white man who had been on hemodialysis since July 2012 for immunoglobulin (Ig)A nephropathy received a deceased-donor kidney transplant in October 2013. The immunosuppressive regimen included basiliximab induction and belatacept/mycophenolate mofetil (MMF)/corticosteroid maintenance. Belatacept was used because the kidney came from an extended-criteria donor [4]. Belatacept was administered intravenously, as recommended for the less intensive regimen (10 mg/kg on day 1 (D1), D5, week 2 (W2), W4, W8, W12; then beyond the third month, 5 mg/kg per month) [4]. During the posttransplantation period, the patient experienced multiple complications of viral reactivation, including cytomegalovirus disease at 7 months treated with valganciclovir; BK virus (BKV) reactivation at month 9 without polyomavirus-associated nephropathy on biopsy leading to a reduction in the MMF dosage (500 mg twice a day); and Epstein-Barr virus viremia at month 16 with no signs of a posttransplant lymphoproliferative disorder. Fourteen months after transplantation, he received pulsed intravenous corticosteroids for cellular rejection (grade Ib). The estimated glomerular filtration rate stabilized at 53 mL/min per 1.73 m² (Modification of Diet in Renal Disease formula). He had persistent lymphopenia, with median CD4 and CD8 T-cell counts of 183/μL and 115/μL, respectively.

Progressive Multifocal Leukoencephalopathy

In June 2015, 20 months after renal transplantation, he was admitted to Bicêtre hospital for left upper-limb weakness and visual disturbances. His family described mood disorders and confusion, which had started the month before. He developed progressive right-sided hemiparesis with temporospatial disorientation. Magnetic resonance imaging (MRI) revealed left

Received 20 February 2017; editorial decision 3 May 2017; accepted 10 May 2017.

^aA. D. and Y. T. contributed equally to this work.

Correspondence: Y. Taoufik, MD, PhD, INSERM U1184, IMVA, Faculté de Médecine Paris-Sud, 63 Rue Gabriel Péri, 94276 le Kremlin-Bicêtre (yassine.taoufik@aphp.fr).

Open Forum Infectious Diseases®

© The Author 2017. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/ofid/ofx100

frontoparietal subcortical white-matter lesions, without gadolinium enhancement, suggesting no vascular disease occurrence. These lesions were consistent with demyelination and suggested PML (Figure 1A). Progressive multifocal leukoencephalopathy was confirmed by the presence of JCV deoxyribonucleic acid in cerebrospinal fluid ([CSF] 7.15×10^3 copies/mL) (Figure 1A). At PML diagnosis, he had lymphopenia (421 CD3 cells/ μ L), with 276 CD4 cells/ μ L and 145 CD8 cells/ μ L (Figure 1A).

He was HIV seronegative. Mycophenolate mofetil was stopped when PML was confirmed. The last injection of belatacept was given 2 days before his admission. Because of the 2-week half-life of belatacept, we performed 2 plasma exchanges to hasten belatacept elimination, on D6 and D11 after PML diagnosis (Figure 1A). An intravenous perfusion of polyclonal Igs (0.5 g/kg per day for 2 days) was given for mild hypogammaglobulinemia (IgG level: 6 g/L). He rapidly developed complete right

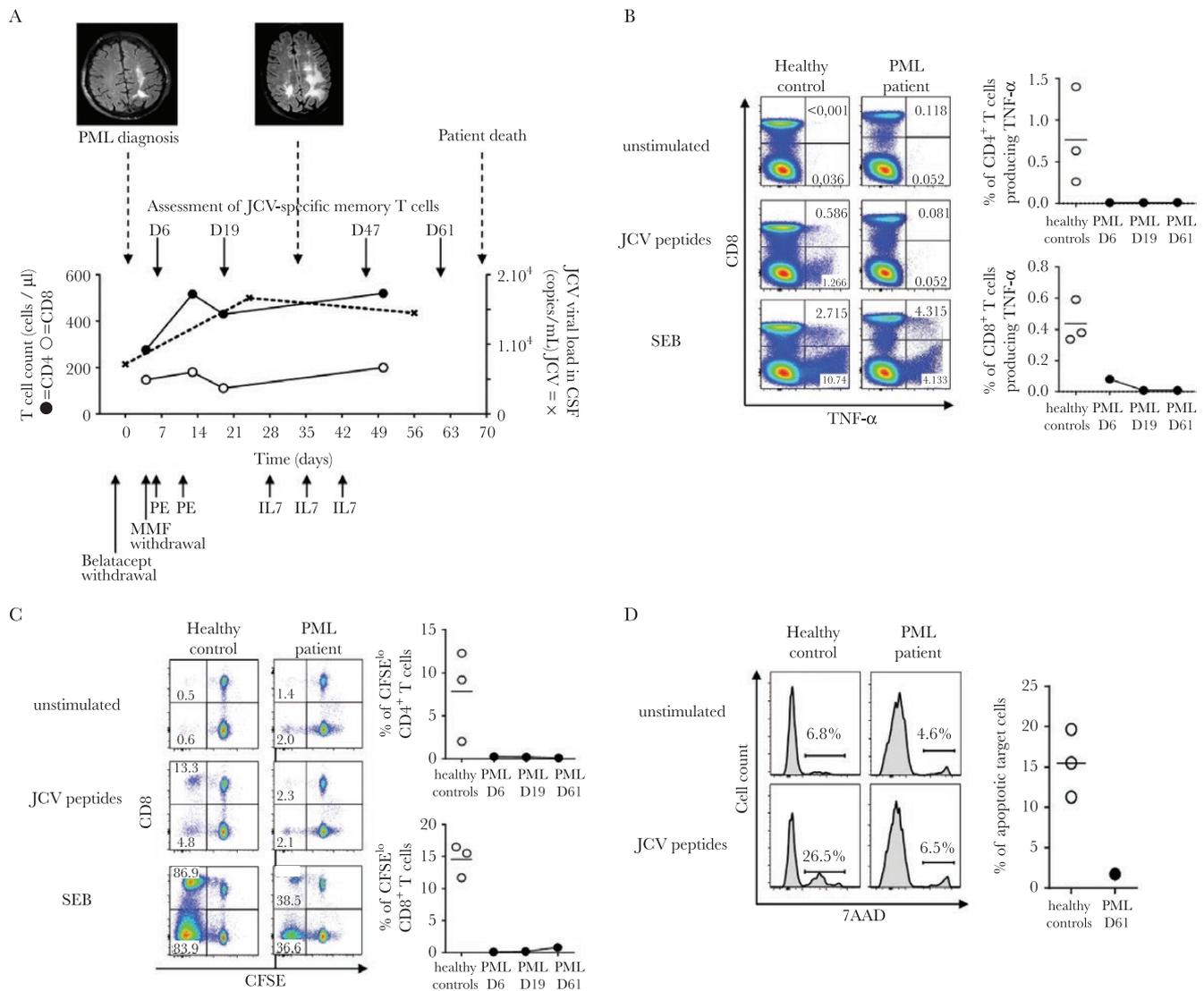


Figure 1. Clinical, neuroradiological, and immunobiological monitoring of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). (A) shows the time course of PML, with fluid attenuation inversion recovery-sequence magnetic resonance imaging aspect at PML onset and 33 days later, the different therapeutic approaches, as well as changes in the CD4 T-cell count (closed circles), the CD8 T-cell count (open circles), and JC virus (JCV) viral load in cerebrospinal fluid (dashed line). (B–D) illustrate anergy of anti-JCV T-cell responses. Peripheral blood mononuclear cells were incubated in Roswell Park Memorial Institute medium alone (unstimulated cells) or with overlapping JCV peptides or *Staphylococcal* enterotoxin B (SEB). T-cell functionality was evaluated in the PML patient and in representative healthy donors responsive to JCV. (B) Tumor necrosis factor (TNF)- α production in response to JCV peptides was evaluated by intracellular staining. Numbers indicate the percentages of CD8⁺ or CD8⁻ (CD4⁺) T cells expressing TNF- α . Similar results were found for interferon- γ (data not shown). (C) Proliferation in response to JCV peptides was measured by carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) dilution. Numbers indicate the percentage of CFSE^{low} cells among CD8⁺ or CD8⁻ (CD4⁺) T cells. (D) Cytotoxicity for JCV-coated target cells was measured in terms of 7-amino-actinomycin D (AAD) uptake. Results are expressed as the percentage of 7-AAD-positive target cells. (B–D) show the lack of improvement in JCV-specific T-cell functions during the course of PML (from D6 to D61). The frequencies of responsive JCV-specific T cells were calculated by subtracting the frequency of cells detected in the absence of stimulation, to correct for background staining. The horizontal bar indicates the median value obtained with cells from 3 healthy donors responsive to JCV. Abbreviations: CSF, cerebrospinal fluid; IL, interleukin; PE, plasma exchanges.

hemiplegia with aphasia, cortical blindness, and no understanding of simple orders. The PML worsened and the patient became bedridden. JCV viral load in CSF increased (1.67×10^4 copies/mL on D23), whereas on D33, his brain lesions deteriorated on MRI (Figure 1A). The CD4 T-cell count increased 12 days after PML diagnosis, but CD8 lymphopenia (180 CD8 cells/ μ L) persisted (Figure 1A). Interleukin (IL)-7 treatment was then started, with approval from the French National Agency of Medicine and Health Products Safety (ANSM). A single cycle of recombinant human IL-7 (r-hIL-7) was administered, comprising 3 subcutaneous injections on D28, D35, and D42 after PML diagnosis (Figure 1A). Each injection delivered 20 μ g/kg, for a total dose of 1200 μ g per injection. His clinical neurological status worsened, with onset of coma on D41. JC virus viral load in CSF remained stable (1.45×10^4 copies/mL on D56) (Figure 1A). He died of respiratory failure 69 days after PML diagnosis.

Immunovirological Monitoring

On D6, D19, D47, and D61 after PML diagnosis, we analyzed the phenotype of lymphocytes and their ability to functionally respond to JCV antigens. As controls, we used 3 healthy donors who were responsive to JCV. Peripheral blood mononuclear

cells (PBMCs) were incubated overnight with a pool of JCV peptides spanning the entire VP1 and VP2 regions that activate both CD4 and CD8 T-cells [5]. Cells were stained for surface markers and then fixed and permeabilized before being incubated with anti-tumor necrosis factor (TNF)- α . As shown in Figure 1B, TNF- α secretion was severely impaired at PML onset.

We tested the ability of CD4 and CD8 T cells to proliferate in response to JCV peptides. Peripheral blood mononuclear cells were stained with 0.5 μ M carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester and then incubated for 5 days with JCV peptides. Specific T-cell proliferation was very weak (Figure 1C). To measure JCV-specific cytotoxicity, PBMCs were cocultured overnight with JCV peptide-coated autologous target cells. As control, cells were cocultured with uncoated autologous target cells. The mortality rate of target cells was evaluated by 7-amino-actinomycin D staining. No specific cytotoxicity was observed in the presence of JCV-specific peptides (Figure 1D). Despite the patient's treatment, his T-cell responses to JCV remained weak throughout follow-up with no significant change (Figure 1B–D). We also assessed the expression of the inhibitory receptor programmed death-1 (PD-1). We found

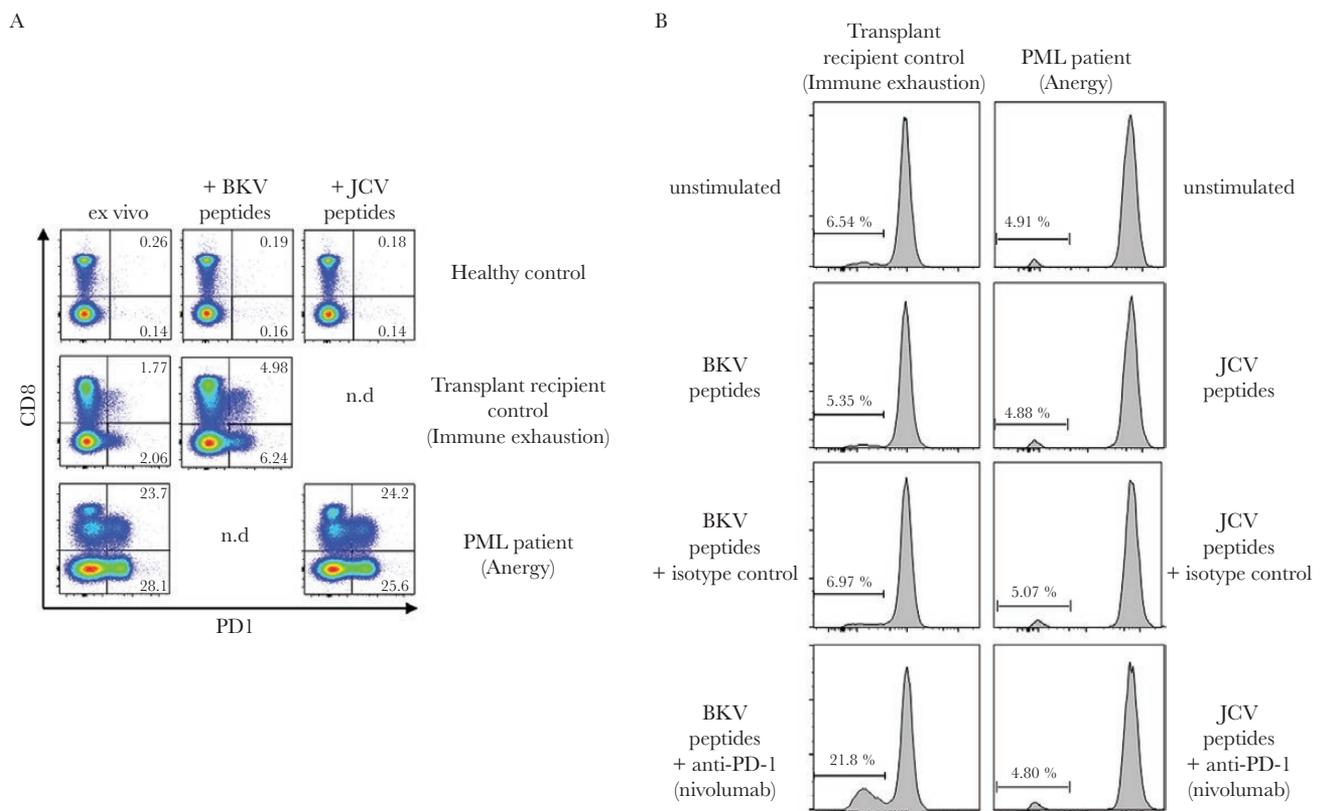


Figure 2. Inhibitory receptor programmed death-1 (PD1) expression in the progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) patient. (A) shows ex vivo PD-1 expression on T cells from the PML patient, compared with a healthy donor responsive to JC virus (JCV) and a kidney transplant recipient with BK virus (BKV) reactivation and possible immune exhaustion (control transplant recipient). Numbers indicate the percentages of CD8⁺ or CD8⁻ (CD4⁺) T cells expressing PD-1. (B) shows the lack of improvement in T-cell functionality after PD-1 blockade with nivolumab in the anergic PML patient compared with the control transplant recipient.

that the patient's T cells expressed high levels of PD-1 up to day 61 (1 week before death) both ex vivo and after in vitro activation (Figure 2A). We then examined the effects of a neutralizing anti-PD-1 antibody (nivolumab) on T-cell proliferation in vitro. Programmed death-1 blockade failed to reverse this T-cell anergy (Figure 2B). Of interest, we tested in parallel a transplant recipient patient who had been receiving tacrolimus, MMF, and corticoids since November 2014. This patient developed BKV nephropathy along with BKV viremia (8.4×10^6 copies/mL) and was treated by replacing tacrolimus with everolimus (an inhibitor of mammalian target of rapamycin) in April 2015. T lymphocytes from this patient were nonresponsive to BKV in vitro (Figure 2B) and expressed significant levels of PD-1 after BKV peptide activation (Figure 2A). In contrast to the PML patient on belatacept, who was refractory to PD-1 blockade, nivolumab significantly restored anti-BKV T-cell responsiveness in this second patient (Figure 2B).

Expression of PD-1 and restoration of functionality after PD-1 neutralization is compatible with immune exhaustion [6]. Together, our findings suggested that chronic blockade of the CD28-B7 costimulatory pathway led to refractory anti-JCV T-cell anergy that persisted until the patient's death, 2 months after belatacept withdrawal.

DISCUSSION

The first treatment aim in this patient was to reverse lymphopenia by withdrawing MMF (an inhibitor of T-cell proliferation) and by adding r-hIL-7. Interleukin-7 induces widespread T-cell proliferation, increased T-cell numbers, and a more diverse T-cell receptor repertoire. We recently reported the case of a PML patient with profound lymphopenia after allogeneic bone marrow transplantation, in whom r-hIL-7 led to the recovery of effective polyfunctional JCV-specific T-cell responses, virus clearance from CSF, and a favorable clinical outcome [7]. In this study, r-hIL-7 had no significant effect on the CD4 and CD8 T-cell counts. The subsequent CD4 cell recovery would be due more to MMF withdrawal. However, the CD8 T-cell count remained low. The patient had been on belatacept for 20 months, resulting in a long-term lack of CD28-mediated costimulation. Belatacept, which can provide significantly better renal function and both patient and renal graft survival than calcineurin inhibitor-based immunosuppression [8], provokes T-cell anergy in vivo [9]. The CD4 T-cell count recovery observed in our patient was not associated with improved functionality in terms of cytokine secretion, proliferation, or cytotoxicity. These functional abnormalities persisted for 60 days after PML diagnosis (the patient died 69 days after PML diagnosis) and were associated with strong expression of the inhibitory receptor PD-1. However, treatment with a therapeutic anti-PD1 receptor antibody (nivolumab) ex vivo failed to improve T-cell function.

Anergy is defined as a long-term state of hyporesponsiveness that occurs in T cells in response to suboptimal activation, including a lack of costimulation through CD28-B7 blockade [10, 11]. T-cell anergy is distinct from T-cell exhaustion, although both states may be associated with expression of inhibitory receptors, including PD-1. T-cell exhaustion can be reversed through PD-1 blockade [12], contrary to T-cell anergy [11]. The PML case on belatacept described here is the first for which analysis of JCV T-cell response was performed, although 2 other rapidly fatal cases of PML (death within 1 month) occurred during the phase II and III of a belatacept trial in kidney [4] and liver transplant patients [13]. In 2011, the US Food and Drug Administration along with the manufacturer BMS instituted a Risk Evaluation and Mitigation Strategy program [14]. Treatment of PML, based mainly on immune restoration, should start as rapidly as possible to limit the extension of brain lesions and thereby to improve survival and functional outcome [15].

CONCLUSIONS

Several mechanisms of immunosuppression may lead to JCV replication in the brain (and consequently to PML), including HIV infection, hematological malignancies, and treatment with natalizumab or rituximab [1, 2]. Each cause of immunosuppression may require a specific therapeutic approach to achieve anti-JCV immune recovery. Treatment of PML related to immunological mechanisms of T-cell anergy could be very challenging, because there is currently no way of reversing T-cell anergy [11]. Thus, the use of belatacept and future biotherapies that induce T-cell anergy may lead to the emergence of a subset of PML that is extremely difficult to manage.

Acknowledgments

We thank Anne Marie Roque and the Department of Virology, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud.

Financial support. This work was funded by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. Brew BJ, Davies NW, Cinque P, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other forms of JC virus disease. *Nat Rev Neurol* **2010**; 6:667–79.
2. Tan CS, Koranik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *Lancet Neurol* **2010**; 9:425–37.
3. Mateen FJ, Muralidharan R, Carone M, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in transplant recipients. *Ann Neurol* **2011**; 70:305–22.
4. Durrbach A, Pestana JM, Pearson T, et al. A phase III study of belatacept versus cyclosporine in kidney transplants from extended criteria donors (BENEFIT-EXT study). *Am J Transplant* **2010**; 10:547–57.
5. Hendel-Chavez H, de Goër de Herve MG, Giannesini C, et al. Immunological hallmarks of JC virus replication in multiple sclerosis patients on long-term natalizumab therapy. *J Virol* **2013**; 87:6055–9.
6. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* **2015**; 15:486–99.

7. Gasnault J, de Goër de Herve MG, Michot JM, et al. Efficacy of recombinant human interleukin 7 in a patient with severe lymphopenia-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *Open Forum Infect Dis* **2014**; 1:ofu074.
8. Vincenti F, Rostaing L, Grinyo J, et al. Belatacept and long-term outcomes in kidney transplantation. *N Engl J Med* **2016**; 374:333–43.
9. Rochman Y, Yukawa M, Kartashov AV, Barski A. Functional characterization of human T cell hyporesponsiveness induced by CTLA4-Ig. *PLoS One* **2015**; 10:e0122198.
10. Fathman CG, Lineberry NB. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat Rev Immunol* **2007**; 7:599–609.
11. Valdor R, Macian F. Induction and stability of the anergic phenotype in T cells. *Semin Immunol* **2013**; 25:313–20.
12. Wang C, Thudium KB, Han M, et al. In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer Immunol Res* **2014**; 2:846–56.
13. Klintmalm GB, Feng S, Lake JR, et al. Belatacept-based immunosuppression in de novo liver transplant recipients: 1-year experience from a phase II randomized study. *Am J Transplant* **2014**; 14:1817–27.
14. Bristol-Myers Squibb Company. Risk Evaluation and Mitigation Strategy (REMS). NULOJIX™ (belatacept). Available at: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/125288Orig1s000remsNulojix.pdf. Accessed 8 August 2011.
15. Gasnault J, Costagliola D, Hendel-Chavez H, et al. Improved survival of HIV-1-infected patients with progressive multifocal leukoencephalopathy receiving early 5-drug combination antiretroviral therapy. *PLoS One* **2011**; 6:e20967.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Qui n'a jamais demandé à la thèse et à l'antithèse

Si elles étaient d'accord pour devenir synthèse ?

De Stanislaw Jerzy Lec

Partie 1 - Quelle est l'implication des lymphocytes T mémoires spécifiques du BK-v et les mécanismes physiopathologiques suspectés sur le risque de Nx BK-v ?

Nos résultats ont permis de mettre en évidence une altération progressive de la fonctionnalité des LT mémoires spécifiques du BK-v en fonction du niveau de réactivation BK-v, suggérant un état d'épuisement des LT mémoires anti-BK-v. L'altération de la fonctionnalité lymphocytaire affectait notamment la capacité à proliférer et à sécréter plusieurs cytokines, faisant suspecter un défaut des populations lymphocytaires les plus indifférenciées telles que les T_{SCM} et les T_{CM}.

L'altération de la réponse immune est un facteur crucial dans la pathogénèse des infections à *Polyomavirus*, un défaut de l'immunité cellulaire entraînant un défaut de contrôle de la réplication virale [Annexe 1 : Dekeyser M., François H., Beaudreuil S. and Durrbach A. (2015) Polyomavirus-specific cellular immunity: from BK-virus-specific cellular immunity to BK-virus-associated nephropathy? *Front. Immunol.* 6:307].

La différenciation lymphocytaire des LT mémoires joue un rôle primordial dans les capacités de contrôle des virus par le système immunitaire. Du fait d'un meilleur potentiel de prolifération, les T_{CM} sont dotés d'une plus grande capacité de persistance et sont plus efficaces en terme de protection anti-virale que les T_{EM} (Wherry, Teichgräber, et al. 2003). La caractérisation récente des T_{RM} pose la question de leur implication dans le contrôle des infections virales chroniques (Beura, Rosato, et Masopust 2017). Dans un contexte de transplantation d'organe allogénique, les T_{RM} du donneur pourraient ne pas être en mesure de survivre ou d'avoir une fonctionnalité lymphocytaire optimale, empêchant de ce fait leur fonction de contrôle de la réplication du BK-v (Turner, Gordon, et Farber 2014). Une autre hypothèse est que les T_{RM} du receveur pourraient ne pas être capables de se différencier *in situ* et/ou de coloniser *de novo* le greffon rénal.

Les mécanismes physiopathologiques de cette altération fonctionnelle de la réponse immune ne sont pas connus.

Un des premiers mécanismes suspectés est lié à l'impact du traitement immunosuppresseur sur les LT mémoires spécifiques du BK-v, l'atteinte rénale survenant majoritairement dans le cadre d'une immunosuppression intense.

Nos résultats ont ainsi mis en évidence une exposition plus importante aux anti-métabolites (Mycophénolate mofétil) chez les patients avec Nx BK-v.

L'intensité du traitement immunosuppresseur est classiquement décrite comme un facteur de risque de Nx BK-v (Demey et al. 2018; Barraclough et al. 2011). La concentration sanguine de molécules immunosuppressives a été décrite comme capable d'inhiber la production d'IFN γ par les LT spécifiques du BK-v. Des tests *in-vitro* chez des donneurs sains ont montré qu'une concentration supérieure à 6 ng/mL de tacrolimus (ou 200 ng/ml de ciclosporine) inhibait de plus de 50% la production d'IFN γ par les LT spécifiques du BK-v tandis que celle-ci était inhibée de 30% en présence d'une concentration inférieure à 3 ng/mL de tacrolimus (ou 100 ng/ml de ciclosporine). De même, une concentration supérieure à 8 μ g/mL de Mycophénolate mofétil inhibait l'expansion des LT spécifiques du BK-v (Egli, Köhli, et al. 2009).

Une implication de la voie mTor dans les étapes précoces de la réplication virale a été évoquée (Hirsch et al. 2016). L'infection des cellules épithéliales tubulaires rénales par le BK-v était associée à une activation prononcée de deux acteurs majeurs de la voie mTor : p70 - S6kinase et la serine - thréonine kinase Akt. L'administration d'un inhibiteur de la voie mTor entraînait sa liaison à la protéine FK binding protein 12kda (FKBP-12) et l'inhibition de la voie mTor par un défaut d'activation de p70 - S6kinase et d'Akt. Cette inhibition de la voie mTor aboutissait à une inhibition très précoce de la réplication du BK-v (Hirsch et al. 2016).

De façon intéressante, le tacrolimus se lie également à FKBP-12 mais, à l'inverse des inhibiteurs de la voie mTor, cette liaison induit la réplication virale du BK-v sans que l'on en connaisse précisément les mécanismes sous-jacents (Hirsch et al. 2016). La

ciclosporine a été associée à un moindre risque de survenue de virémie à BK-v par rapport au risque sous tacrolimus (Hirsch et al. 2013). Cet effet pourrait s'expliquer par l'absence de liaison de la ciclosporine à FKBP-12. Par ailleurs, l'administration de corticostéroïdes *in-vitro* augmente de 11 fois la permissivité de la cellule hôte à l'infection à BK-v (U. Moens et al. 1994).

Les inhibiteurs de la voie mTor ont été décrits comme étant dotés de capacités anti-virales. Ces molécules pourraient représenter une option thérapeutique de choix pour conserver une immunosuppression efficace pour la prévention du risque de rejet de greffe, tout en contrôlant le risque de réactivation virale (Pascual et al. 2016; Jouve, Rostaing, et Malvezzi 2016). L'utilisation des inhibiteurs de la voie mTor a été associée à une plus faible incidence cumulative des réactivations à BK-v (1.74% vs. 3.67%; $p < 0.001$), avec un hazard ratio en analyse multivariée de 0.69 [0.59–0.89] (Dharnidharka, Cherikh, et Abbott 2009). L'effet antiviral de ces molécules pourrait s'expliquer par l'implication de la voie mTor dans les étapes précoces de la réplication virale (Hirsch et al. 2016). Par ailleurs, une diminution de l'expression génique de la région NCCR du BK-v a été démontré sous l'influence des inhibiteurs de la voie mTor. Cette région comprenant l'origine de la réplication de l'ADN viral, cette diminution d'expression pourrait ainsi diminuer les capacités de réplication du BK-v (Korth et al. 2018).

La survenue quasi-exclusive des Nx BK-v en transplantation rénale, par rapport aux autres transplantations d'organes solides, est intrigante et suggère un rôle spécifique du greffon rénal dans la pathogénèse de la Nx BK-v. Il est en effet possible que d'autres mécanismes survenant dans le cadre des lésions d'ischémie-reperfusion ou dans le cadre de la présentation antigénique du BK-v soient impliqués dans la réplication virale. Dans un modèle de souris transplantées rénales avec néphropathie associée au *Polyomavirus murin*, la réplication virale était effective quasi-exclusivement dans les reins transplantés, sans réplication dans les reins natifs, et associée à la perte du greffon rénal (Han Lee et al. 2006; Atencio et al. 1993).

La transplantation rénale est potentiellement responsable d'une présentation antigénique du BK-v particulière. Dans le cadre de la transplantation rénale, les patients réalisent potentiellement une présentation antigénique du BK-v via le complexe [CMH du donneur – peptide BK-v], cette présentation antigénique étant assurée par les cellules épithéliales tubulaires rénales du donneur. Ainsi, cette particularité de la présentation antigénique pourrait altérer la reconnaissance lymphocytaire des cellules infectées par le BK-v. Il est en effet possible que les LT mémoires spécifiques du BK-v ne soient pas en mesure de survivre ou d'avoir une fonctionnalité lymphocytaire optimale leurs permettant de contrôler la réplication du BK-v.

Un autre mécanisme suspecté est lié à la transmission par le donneur d'un génotype de BK-v différent de celui du receveur. Six génotypes de BK-v (génotype I à VI, le génotype I étant le plus fréquemment rencontré) ont été décrits selon la présence de différents polymorphismes de VP1 (P. M. Sharma et al. 2006). La transmission d'un autre génotype de BK-v que celui pour lequel le receveur possédait des anticorps neutralisants était significativement associée à un risque plus élevé de développer une virémie à BK-v (Solis et al. 2018). Par ailleurs, une réplication active du BK-v est associée à l'acquisition de réarrangements de la région NCCR, conférant au BK-v une plus grande capacité de réplication (Olsen, Hirsch, et Rinaldo 2009; Gosert et al. 2008). De façon intéressante, les réarrangements de la région NCCR étaient moins fréquemment associés au génotype de type 1 qu'aux autres génotypes de BK-v (P. M. Sharma et al. 2007). Ainsi, dans un contexte de transplantation rénale allogénique, les LT mémoires spécifiques du BK-v pourraient être incapables de reconnaître une souche virale différente et/ou mutée de BK-v.

Partie 2 - Quel est l'impact des incompatibilités HLA sur le risque de Nx BK-v ?

Nos résultats avancent l'hypothèse qu'un nombre plus faible d'incompatibilités HLA en situation de réactivation BK-v sanguine pourrait être un facteur de risque de Nx BK-v.

Si les incompatibilités HLA sont associées à une virémie BK-v (Thangaraju et al. 2016; Hässig et al. 2014), leur impact sur le développement des Nx BK-v reste controversé (Scadden et al. 2017). Un taux d'incompatibilité HLA plus élevé a pu être associé aux Nx BK-v. Néanmoins, cette association a été mise en évidence en comparant des patients avec ou sans Nx BK-v, sans comparaison par rapport à un groupe de patients avec virémie BK-v isolée (Awadalla et al. 2004). A l'inverse, des études plus récentes retrouvent la survenue de Nx BK-v dans un contexte de bonne compatibilité HLA (Ilkka Helanterä et al. 2012; Ramos et al. 2002). Par ailleurs, un degré moindre de compatibilité HLA a été associé à une meilleure préservation de la fonction du greffon en cas de Nx BK-v avérée (Drachenberg et al. 2005). Certaines spécificités antigéniques des molécules HLA ont également été associées à la sévérité des réactivations à BK-v. Ainsi, l'absence d'un locus spécifique en HLA-C7 pourrait être associé à un défaut de contrôle des réactivations à BK-v, suggérant un rôle du HLA-C dans l'immunité anti-virale et dans les mécanismes évolutifs d'échappement virale à la surveillance immune (Domingo-Calap et al. 2018; Bohl et al. 2005).

De façon intéressante, notre groupe retrouve un rôle prépondérant du nombre d'incompatibilités HLA en classe II [HLA-DR, -DQ] et non en classe I [HLA-A, -B]. Dans un modèle murin, une charge virale BK-v élevée en l'absence d'immunité cellulaire n'était pas suffisante pour induire une Nx BK-v. Néanmoins, l'absence de molécules HLA de classe I n'impactait pas le développement de ces néphropathies, suggérant un rôle de la réponse cellulaire indépendant de la présentation antigénique de

classe I (Albrecht et al. 2012). Cette observation soulève ainsi la question du rôle prépondérant des LT de type CD4 dans le maintien d'une réponse efficace anti-BK-v et dans les mécanismes de clairance virale.

Il a été démontré que les LT CD4 régulent le développement et la fonctionnalité des LT CD8 T_{RM} de type cérébraux dans le contexte de LEMP (Mockus et al. 2018). En utilisant un modèle d'encéphalite causée par le *Polyomavirus murin* chez la souris, un lien étroit de dépendance a été mis en évidence entre la présence de LT CD4 et l'homéostasie fonctionnelle des LT CD8 de type T_{RM} de localisation cérébrale. Un déficit en LT CD4 impactait la survie des LT CD8 T_{RM} cérébraux, altérait leur réponse effectrice contre le *Polyomavirus murin* et était associé à une extension des lésions d'encéphalite virale (Mockus et al. 2018).

Basée sur nos travaux précédents, le rôle prépondérant des incompatibilités HLA en classe II [HLA-DR, -DQ], et de ce fait celui des LT CD4 pourrait être expliqué par une stimulation hétérospécifique des LT CD8 spécifiques du BK-v en présence d'une plus forte stimulation de la réponse allogénique CD4. En effet, notre groupe a précédemment démontré que des LT CD4 hétérospécifiques étaient capables de fournir une aide effective à des LT CD8 mémoires de spécificité antigénique différente, et notamment en situation de défaut de la mémoire lymphocytaire T CD4 homospécifique. Les LT CD8 mémoires ainsi activés avaient des fonctions effectrices plus efficaces lors d'une restimulation antigénique, avec augmentation des capacités de prolifération, de dégranulation et de sécrétion de granzyme B (de Goër de Herve et al. 2008).

Partie 3 - Y a-t-il des biomarqueurs individuels d'évaluation du risque de Nx BK-v chez un patient transplanté rénal ?

Le diagnostic de Nx BK-v repose actuellement sur la réalisation d'une biopsie du greffon rénal, qui met en évidence des inclusions virales intranucléaires avec un marquage anti-SV40 positif, associée à un infiltrat inflammatoire polymorphe de cellules mononuclées (Nickeleit et al. 2017; Hirsch et al. 2014). Ces lésions sont précédées d'une répllication du BK-v détectée par PCR au niveau sanguin. Cependant, parmi les patients présentant une répllication sanguine du BK-v, tous ne vont pas développer de Nx BK-v, la valeur prédictive positive d'une PCR BK-v sanguine $\geq 10^4$ copies/mL de sang étant de 55% (Chung et al. 2012). Il est probable que cette faible valeur prédictive positive s'explique par la capacité de certains individus à réactiver leur réponse T mémoire anti-BK-v, permettant ainsi un contrôle de la répllication virale.

Actuellement, il n'existe pas d'outils permettant d'évaluer le degré d'immunosuppression, ni la qualité de la réponse T mémoire spécifique du BK-v d'un patient. De ce fait, la difficulté clinique actuelle est de trouver le bon équilibre entre risque infectieux et risque de rejet de greffe.

Notre groupe a développé la méthode NEPHROVIR, méthode biologique non-invasive d'évaluation du risque de Nx BK-v. Celle-ci a pour objectif d'aider au diagnostic de Nx BK-v sans avoir recours à la biopsie du greffon rénal et de stratifier le risque de développer cette complication en cas de virémie BK-v.

D'autres tests diagnostiques basés sur l'évaluation de la réponse immune dans le cadre de virémie BK-v ont été proposés par le passé. Ainsi, une faible réponse immune anti BK-v a été retrouvée chez les patients avec virémie BK-v (Comoli et al. 2013; Schachtner et al. 2015). D'autres ont utilisé des tests d'évaluation globale de la réponse lymphocytaire tel que le « Cylex ImmuKnow test » (Batal et al. 2008). Cependant, ces

méthodes n'ont jamais permis ni de diagnostiquer la survenue d'une Nx BK-v ni d'identifier de manière fiable les patients à risque de développer une Nx BK-v.

Aucun test d'immuno-monitoring antiviral n'est actuellement recommandé en pratique clinique. Un tel test prédictif permettrait d'être plus efficace dans la gestion des patients avec virémie BK-v. Un test retrouvant un fort risque de Nx BK-v inciterait à réduire drastiquement le traitement immunosuppresseur pour prévenir la survenue d'une Nx BK-v. A l'inverse, un test retrouvant un faible risque de Nx BK-v inciterait à ne pas modifier le traitement immunosuppresseur afin de ne pas majorer à tort le risque de rejet d'allogreffe. Enfin, la répétition dans le temps d'un tel test pourrait permettre de moduler l'immunosuppression, à la hausse ou à la baisse, en fonction de la balance entre le risque de Nx BK-v et le risque de rejet d'allogreffe.

Perspectives : Programme de Maturation SATT – Projet NEPHROVIR

Pour évaluer une nouvelle stratégie permettant de définir le niveau de risque de Nx BK-v, nous avons développé un projet d'étude complémentaire en collaboration avec la SATT (Sociétés d'Accélération du Transfert de Technologies) Paris-Saclay.

Ce Programme de Maturation SATT – Projet NEPHROVIR est un projet visant à valider en population cible la méthode NEPHROVIR décrite plus haut.

Le programme de maturation actuel s'intègre dans la poursuite de l'étude MeITyk, avec pour objectif la validation de la méthode NEPHROVIR sous sa forme finale et dans les conditions d'emploi prévues. La population cible concerne les patients transplantés rénaux avec virémie BK-v et/ou à risque de réactivation BK-v.

Il s'agit d'une étude prospective multicentrique de 24 mois réalisée sur une large cohorte de patients transplantés rénaux avec virémie BK-v. La méthode sera appliquée sur des patients transplantés rénaux avec une charge virale BK-v supérieure à 200 copies/ml de sang, à J0 puis à 3 et 9 mois de l'inclusion. Nous corrèlerons les résultats obtenus par notre méthode biologique à la survenue ou non d'une Nx BK-v. L'objectif

est l'identification précoce des patients à risque de développer cette complication en post-transplantation rénale.

Ce projet a reçu un avis favorable du comité d'investissement de la SATT Paris Saclay avec l'obtention d'un financement permettant la réalisation de l'étude sur 24 mois. Ce financement permettra le recrutement de 2 ingénieurs à temps plein et le développement d'une « trousse diagnostique NEPHROVIR BKV ». A la fin du programme de maturation, le mode de valorisation discuté sera possiblement le transfert de la méthode à un industriel spécialisé dans le diagnostic médical *in vitro*.

Partie 4 - Est-il possible de restaurer les capacités fonctionnelles des LT spécifiques du BK-v et de contrôler le risque de Nx BK-v ?

Nos résultats ont permis de mettre en évidence une altération progressive de la fonctionnalité lymphocytaire évoquant un état d'épuisement de la réponse lymphocytaire T spécifique du BK-v. Nous avons par ailleurs montré un état d'anergie de la réponse lymphocytaire T spécifique du JC-v chez un patient transplanté rénal sous CTLA4-Ig. La restauration d'une immunité cellulaire fonctionnelle spécifique du JC-v était impossible malgré l'ajout *in vitro* de molécule visant à lever l'inhibition lymphocytaire.

La restauration fonctionnelle d'une immunité cellulaire spécifique des *polyomavirus* humains pourrait être utilisée comme une future piste thérapeutique pour le traitement de ces complications virales, actuellement sans thérapeutique spécifique.

L'état d'épuisement lymphocytaire, associé à un contrôle inefficace des infections virales chroniques, est réversible sous certaines conditions. Ainsi, la réduction précoce de la charge virale ou la restauration d'une immunité lymphocytaire T CD4 efficace permettraient de restaurer les fonctions effectrices de LT mémoires antiviraux fonctionnellement épuisés (Brooks, McGavern, et Oldstone 2006).

Plusieurs voies thérapeutiques sont à l'étude pour restaurer ces capacités fonctionnelles.

Elles pourraient impliquer par exemple l'expansion *ex-vivo* suivie du transfert adoptif de LT antiviraux efficaces (Roddie et Peggs 2017). L'efficacité de ces transferts adoptifs a été initialement démontrée chez des patients allogreffés de moelle osseuse présentant des infections sévères à *Herpesvirus*. Ainsi, l'expansion *ex-vivo* et le transfert adoptif de LT cytotoxiques provenant de donneurs sains et reconnaissant plusieurs

souches virales (Adenovirus, CMV et EBV) a permis le contrôle d'infections sévères à *Herpesvirus* parfois combinées chez des allogreffés de moelle osseuse. Le transfert adoptif de LT antiviraux n'était pas associé à une stimulation de la réponse immune allogénique (Gerdemann et al. 2013).

D'autres auteurs ont montré la possibilité de générer *ex-vivo* des LT cytotoxiques spécifiques du BK-v d'origine allogénique (LT expansus à partir de donneurs sains) ou d'origine autologue. Ces lymphocytes possédaient un profil *ex-vivo* de fonctionnalité lymphocytaire efficace contre le BK-v (Blyth et al. 2011; Comoli et al. 2003).

Plus récemment, l'expansion *ex-vivo* et le transfert adoptif de LT allogéniques spécifiques du BK-v a permis le contrôle total ou partiel de réactivation à JC-v dans 3 cas de LEMP chez des patients immunodéprimés (contexte hors-transplantation d'organe solide). Ainsi, le contrôle d'une infection à JC-v par des LT allogéniques spécifiques du BK-v est une preuve thérapeutique de concept basée sur la grande homologie de séquence entre le BK-v et le JC-v (Muftuoglu et al. 2018).

Néanmoins, il est important de signaler que l'utilisation de LT d'origine allogéniques dans le cadre de la transplantation d'organe pose le souci d'un risque de stimulation allogénique non contrôlable et donc de rejet de greffe sévère. Ainsi, l'utilisation de LT autologues expansus *ex-vivo* est probablement une piste à privilégier pour limiter le risque de stimulation allogénique dirigée contre le greffon.

D'autres pistes thérapeutiques prometteuses sont liées à la caractérisation des mécanismes impliqués dans la régulation lymphocytaire. Nous avons mis en évidence l'expression de molécules inhibitrices telles que PD1 au cours de l'infection par le JC-v dans le cadre de LEMP. Dans le domaine oncologique, le blocage pharmacologique des récepteurs inhibiteurs tels que PD1, TIM-3, CTLA-4, ... représente actuellement une attitude thérapeutique de premier choix (Blake et al. 2016; Nguyen et Ohashi 2015; Pardoll 2012). Le blocage pharmacologique des récepteurs inhibiteurs a également été considéré dans le contexte des infections virales chroniques (Barber et al. 2006). Ces

agents thérapeutiques pourraient permettre un meilleur contrôle de la charge virale en permettant la restauration de la fonctionnalité des LT antiviraux (Markwick et al. 2015; Wang et al. 2014). Cette amélioration de la fonctionnalité lymphocytaire était d'autant plus importante que le blocage pharmacologique des récepteurs inhibiteurs était réalisé de façon combinée (Blackburn et al. 2009; Chew et al. 2016). De même, le blocage pharmacologique du récepteur à l'IL-10 aboutissait à l'émergence d'une réponse immune fonctionnelle et un contrôle efficace des infections virales chroniques (Ejrnaes et al. 2006). Néanmoins, dans le contexte de la transplantation d'organe, une levée globale de l'inhibition lymphocytaire est peu envisageable du fait d'un risque important de stimulation de la réponse lymphocytaire allogénique. Une levée *ex-vivo* de l'inhibition des LT spécifiques des *polyomavirus* pourrait fournir une piste thérapeutique plus intéressante, sans majoration du risque allogénique.

Par ailleurs, si l'état d'épuisement lymphocytaire est potentiellement réversible, un état d'anergie lymphocytaire est quant à lui difficilement réversible (Valdor et Macian 2013). L'apport exogène d'IL-2 ou l'induction d'une prolifération homéostatique permettait de rompre un tel état (Mirshahidi, Huang, et Sadegh-Nasseri 2001; Brown et al. 2006). Néanmoins, la restauration des fonctions effectrices des LT anergiques est transitoire, suggérant un profil de modifications épigénétiques fixés (Schietinger et al. 2012).

CONCLUSION

La médecine est une science des pannes, celles de l'organisme humain.

Mais si le médecin est un dépanneur – rien de plus, rien de moins –

Il est le dépanneur d'une machine dont il ne possède pas les plans.

De Lucien Israël

Nos résultats ont mis en évidence une altération progressive de la fonctionnalité des lymphocytes T spécifiques du BK-v associée à un nombre plus faible d'incompatibilités HLA chez les patients avec Nx BK-v. Cette altération de la fonctionnalité des lymphocytes T spécifiques du BK-v suggérait un état d'épuisement lymphocytaire en fonction du niveau de réactivation BK-v. Ces données nous ont conduit à élaborer une méthode biologique non-invasive d'évaluation du risque individuel de Nx BK-v (brevet FR1855342). Cette méthode a pour objectif d'aider au diagnostic de Nx BK-v sans avoir recours à la biopsie du greffon rénal et de stratifier le risque de développer cette complication. Par ailleurs, nous avons décrit un cas fatal de LEMP associé à un état d'anergie des lymphocytes T spécifiques du JC-v.

L'altération fonctionnelle des lymphocytes T spécifiques des *Polyomavirus humains* pourraient impliquer un défaut de présentation antigénique, rendant alors impossible la reconnaissance du virus par les lymphocytes T spécifiques. L'étude de la fonctionnalité et de l'épuisement des lymphocytes T spécifiques des *Polyomavirus humains* pourrait ouvrir de futures pistes diagnostiques et/ou thérapeutiques. Elle pourrait permettre de dépister les patients à risques de Nx BK-v et pourrait contribuer au développement d'immunothérapies innovantes.

La restauration de la fonctionnalité des lymphocytes T spécifiques des *Polyomavirus humains* pourrait ainsi fournir une piste thérapeutique prometteuse afin de contrôler ces réactivations virales sans majorer le risque de rejet allogénique.

ANNEXES

**Annexe 1 : Dekeyser M., François H., Beaudreuil S. and Durrbach A. (2015)
Polyomavirus-specific cellular immunity: from BK-virus-specific cellular
immunity to BK-virus-associated nephropathy? Front. Immunol. 6:307**

Abstract

In renal transplantation, BK-virus (BK-V)-associated nephropathy has emerged as a major complication, with a prevalence of 1–10% and graft loss in >50% of cases. BK-V is a member of the polyomavirus family and rarely induces apparent clinical disease in the general population. However, replication of polyomaviruses, associated with significant organ disease, is observed in patients with acquired immunosuppression. Monitoring of specific immunity combined with viral load could be used to individually assess the risk of viral reactivation and virus control. We review the current knowledge on BK-V-specific cellular immunity and, more specifically, in immunocompromised patients. In the future, immune-based therapies could allow us to treat and prevent BK-V-associated nephropathy.

Polyomavirus-specific cellular immunity: from BK-virus-specific cellular immunity to BK-virus-associated nephropathy?

Manon Dekeyser^{1,2,3}, Hélène François^{1,2,3}, Séverine Beaudreuil^{1,2,3} and Antoine Durrbach^{1,2,3*}

¹ Nephrology Department, IFRNT, Bicêtre Hospital, Le Kremlin Bicêtre, France, ² UMRS1197, INSERM, Villejuif, France, ³ University Paris South, Orsay, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Yassine Taoufik,
Université Paris-Sud, France

Reviewed by:

Nicolas Pallet,
Université Paris Descartes, France
Reinhard Reuss,
Bezirkskrankenhaus Bayreuth,
Germany

*Correspondence:

Antoine Durrbach,
Nephrology Department, IFRNT,
Bicêtre Hospital, 78 rue du General
Leclerc, 94270 Le Kremlin Bicêtre,
France
a.durrbach@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to Multiple
Sclerosis and Neuroimmunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 04 November 2014

Accepted: 29 May 2015

Published: 16 June 2015

Citation:

Dekeyser M, François H, Beaudreuil S
and Durrbach A (2015)
Polyomavirus-specific cellular
immunity: from BK-virus-specific
cellular immunity to
BK-virus-associated nephropathy?
Front. Immunol. 6:307.
doi: 10.3389/fimmu.2015.00307

In renal transplantation, BK-virus (BKV)-associated nephropathy has emerged as a major complication, with a prevalence of 1–10% and graft loss in >50% of cases. BKV is a member of the polyomavirus family and rarely induces apparent clinical disease in the general population. However, replication of polyomaviruses, associated with significant organ disease, is observed in patients with acquired immunosuppression. Monitoring of specific immunity combined with viral load could be used to individually assess the risk of viral reactivation and virus control. We review the current knowledge on BKV-specific cellular immunity and, more specifically, in immunocompromised patients. In the future, immune-based therapies could allow us to treat and prevent BKV-associated nephropathy.

Keywords: polyomavirus, BK-virus, renal transplantation, anti-viral immunity, polyfunctionality

Introduction

BK-virus (BKV) is a human polyomavirus, first isolated in 1971, which belongs to a subfamily of papovaviridae, and includes two main strains associated with human disease: BKV and JC-virus (JCV). BKV is frequently responsible for irrelevant infection in the general population. Up to 85% of adults have been exposed to the virus (as determined by serological testing), but recurrence of the virus can be observed with immunosuppression, suggesting the presence of an asymptomatic, latent infection. Except for children receiving a bone-marrow transplant, in most cases, in adults, BKV infection corresponds to recurrence of the virus rather than a *de novo* infection after renal transplantation. Human BKV has been associated with interstitial nephritis and ureteral stenosis in the renal transplant, and hemorrhagic cystitis in recipients of a bone-marrow transplant. BKV nephropathy, associated with viral recurrence, occurs in 1–10% of renal transplants and has emerged as a major complication after renal transplantation, often leading to graft loss (1). The absence of a non-nephrotoxic antiviral therapy leads to decrease immunosuppression to control viral replication, but can lead to organ rejection. The role of the immune system in controlling this virus is still poorly understood.

Incidence and Clinical Manifestations

Polyomaviruses in the General Population

Polyomaviruses are widespread in the general population but rarely induce apparent clinical disease or pathology. This virus family coevolved with their hosts, as evidenced by their high prevalence and

low morbidity (2, 3). Currently, the human polyomavirus family consists of 10 members. The most common are polyomavirus hominis 1 and 2, better known as BKV and JCV, respectively, named after the initials of the patients from whom they were first isolated in the 1970s (3). With a seroprevalence of more than 80% for BKV and 50% for JCV, epidemiological studies in the general population indicate early and high exposure to these polyomaviruses (4, 5). The primary infection is often subclinical and without specific symptoms. Natural transmission has not been fully clarified but likely occurs via the respiratory or oral route. After a primary infection, BKV and JCV are known to persist in the reno-urinary tract but mechanisms involved for the location of the virus in this epithelial remain unknown (3). Asymptomatic urinary shedding of BKV and JCV has been observed in 7 and 19% of healthy blood donors aged 20–59 years, respectively, with median viral loads of 3.51 and 4.64 log copies/mL, respectively. Neither BKV nor JCV viremia has been detected in plasma in immunocompetent individuals (4).

Polyomaviruses in Immunocompromised Patients

Polyomaviruses are latent viruses that can replicate in patients with acquired immunodeficiency. Significant organ diseases associated with the replication of polyomaviruses have been observed in patients with chronic acquired immunosuppression caused by organ transplantation treatments, human immunodeficiency virus (HIV) infection, or multiple sclerosis treated with natalizumab. BKV and JCV display similar behavior, with high prevalence in the general population and related diseases occurring almost only in immunocompromised population. Similar mechanisms for the replication control for these two viruses are required, implicating the host response. However, BKV disease does not directly correlate with the level of immunosuppression but usually depends on multiple complementary risk factors, including host determinants (such as immune effectors), organ determinants that favor BKV replication, or external modulators (such as immunosuppressive drugs) (2). BKV is responsible for clinical manifestations in, mainly, renal-transplant patients, and rarely in heart- or liver-transplant patients, suggesting a role for local factors, such as microinflammation and replication of BKV in the renal epithelia. However, BKV-associated hemorrhagic cystitis has also been observed in 5–15% of allogeneic hematopoietic stem-cell transplants (1).

JCV does not induce disease in solid-organ transplants, but is responsible for progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in HIV patients and patients with multiple sclerosis treated with natalizumab. Despite specific cellular immunosuppression in these patients, nephropathy caused by JCV or BKV is rare, and BKV-associated PML or encephalitis is also rare. In addition, BKV has been rarely implicated in extrarenal pathologies such as pneumonia, encephalitis, hepatitis, retinitis, capillary-leak syndrome, or cancer (1, 3). Recently, the increased use of immunosuppressors in multiple sclerosis has been associated with emerging immunocompromised-related infections. For example, Lonergan et al. have already reported a higher incidence of BKV reactivation in patients treated with natalizumab for multiple

sclerosis. However, the significance of BKV replication in the absence of renal dysfunction is unclear (6).

Bone-Marrow Transplant Recipients

In clinical studies, hemorrhagic cystitis caused by BKV has been observed in bone-marrow transplant recipients, mostly in young people. It can be effectively treated with a specific antiviral therapy such as cidofovir, leflunomide, or fluoroquinolone. However, controlled clinical trials with cidofovir, leflunomide, and fluoroquinolones used to treat BKV-associated hemorrhagic cystitis are needed to determine their true safety and efficacy in this patient population (7). In this population, the potential nephrotoxicity of cidofovir has caused a small number of acute renal failures.

Renal-Transplant Recipients

In renal transplantation, BKV reactivation has emerged as a major complication (in 1–10% of cases) (1). Its physiopathology is still poorly understood. The first case of BKV-associated nephropathy was described in 1995 and was associated with the development of immunosuppressive drugs such as tacrolimus and mycophenolate mofetil (8). Currently, BKV remains an important issue in renal transplantation and is a major cause of infectious disease that can lead to graft loss (9, 10). BKV infections usually correspond to viral reactivation from the urinary epithelium. These reactivations occur in 1–10% of kidney-transplant (KT) recipients, and are responsible for graft loss in 30–80% of cases (1). The loss is caused on one hand by the toxic effects of the virus that cause desquamation of dying epithelial cell in urine with alteration of their nuclei (viral inclusions), and induce an inflammatory interstitial response which infiltrates tubular interstitium. This is associated with the development of fibrosis and tubular atrophy. On the other hand when immunosuppression is decreased to control the viral replication, the development of an acute tubular rejection may occur. To date, the mechanisms involved in the development of the inflammation of the kidney and the fibrosis associated with BKV nephropathy are poorly understood. The phenotype of infiltrating cells during BKV nephropathy and during acute rejection is not different in re-enforcing the difficulty to diagnose BKV nephropathy from acute rejection. Moreover, these two situations may occurred sequentially since the diagnosis of BKV nephropathy will lead to a reduction of the general immunosuppression since BKV would reflect overimmunosuppression and then will favor the development of an acute rejection which would need to re-enforce immunosuppressive therapy. This highlights the need to develop specific markers for the specific responses to this virus, to avoid episodes of acute rejection, and to control viral infection. Interestingly, the recurrence of BKV in the KT population probably needs additional factors or injured tissue to replicate. Despite its high rate of prevalence in this population, only a fraction of KT recipients will develop viral reactivation and BKV nephropathy. On the other hand, patients receiving a similar immunosuppressive therapy after heart transplantation less frequently develop BKV infection. In addition, despite an important immunosuppression, some cases of BKV have been identified in recipients of bone-marrow or cardiac transplants.

Because data are lacking on the pathophysiology of this viral reactivation, therapeutic approaches have not been codified. Currently, no antiviral treatment is available except for cidofovir,

which can cause renal toxicity, particularly in those with a renal transplant (11, 12). In our experience, despite reducing the dose of immunosuppression, the use of cidofovir adapted to renal function is associated with a high rate of acute tubular necrosis.

Diagnosis of BKV-associated nephropathy is based on a combination of non-specific histological lesions plus the presence of BKV viremia (plasma BKV-DNA with a viral load of $>10^4$ copies/mL), or BKV viruria (urinary BKV-DNA with a viral load $>10^7$ copies/mL). Viruria is observed in 40% of KT recipients and usually precedes viremia (24% of cases) (13). Currently, because of the poor outcome from BKV nephropathy, physicians modulate immunosuppression before the occurrence of BKV nephropathy by reducing immunosuppression. Early diagnosis is essential to initiate treatment before the establishment of irreversible kidney damage (14).

Histological diagnosis is based on detecting signs of viral replication in epithelial cells (renal tubular cells and/or Bowman's capsular cells), and/or urinary-tract ("decoy cells"). These signs include enlarged nuclei with smudgy chromatin changes, intranuclear viral inclusions, rounding, and detachment, which are associated with an inflammatory infiltrate, necrosis, and/or fibrosis. The infiltrate is mostly composed by mononuclear cells including CD4 and CD8 lymphocytes and macrophages. The virus may be identified by immunohistochemistry by staining for the Large-SV40 tumor-antigen. The following patterns of BKV-associated nephropathy have been described (1, 2, 11) (Figures 1A–C).

- Stage A – Moderate viral cytopathic changes within normal renal parenchyma.
- Stage B – More severe cellular damages with a combination of viral cytopathic changes and focal/multifocal areas of tubular atrophy, and/or interstitial fibrosis; inflammatory infiltrates, and/or tubulitis (<25% for pattern B1; 25–50% for pattern B2; >50% for pattern B3). The most important differential diagnosis is acute rejection, which can also coexist with BKV-associated nephropathy.
- Stage C – End-stage BKV-associated nephropathy, with extensive interstitial fibrosis and tubular atrophy.

According to the histological lesions, the rate of graft loss varies from 10% in stage A to 80% in stage C (1). Hirsch et al. (13)

analyzed the replication of BKV in more than 600 *de novo* KT recipients within their first year post-transplant: viruria rate was 39.5% and viremia rate was 23.9%. Renal function at 1 year in viremic patients was significantly impaired (median glomerular-filtration rate 60.4 vs. 65.7 mL/min; $p = 0.032$) with more frequent acute-rejection episodes at 6 months (13.0% vs. 6.1%, $p = 0.030$). Risk factors for developing BKV viremia and/or BKV-associated nephropathy have been identified and correspond to high exposure to corticosteroids associated with tacrolimus and/or mycophenolate mofetil (compared to a lower incidence with cyclosporine A plus mycophenolate mofetil), being older, and male gender (13, 15).

The intensity of immunosuppression is conventionally proposed as a major determinant for the emergence of BKV-associated nephropathy. However, questions regarding the specific effects of immunosuppression (i.e., a direct effect or individual susceptibility) remain unanswered (13). On the one hand, patients with a conventional immunosuppressive therapy (triple immunosuppression without depleting induction with antibodies) may develop BKV replication and nephropathy, and on the other hand, patients highly immunocompromised (with depleting agents as an induction therapy for the graft or treated with high dose of steroids for the acute rejection treatment) did not. This suggests that individual susceptibility of patients might favor or control BKV reactivation.

Elfadawy et al. (16) evaluated the impact of persistent or transient BKV viremia on renal-graft function. The mean onset of BKV viremia was 4.03 ± 2.5 months post-transplant. The occurrence of BKV-associated nephropathy was limited to patients with persistent high BKV viremia. At 1 year, graft function was significantly reduced and the rate of acute rejection was significantly higher in KT recipients with high persistent or transient viremia. In addition, patients with persistent low viremia were 3.1-fold more likely to be cleared of the virus compared to those with persistent high viremia (hazard ratio = 3.1; $p = 0.001$), which suggests that potential control of the virus by the host's immune system is associated with a low BKV viral load. This finding suggests that mechanisms other than direct tissue invasion by BKV may be responsible for graft dysfunction as well as permissive factors or mechanisms that favor the clearance of the virus and/or activation of the immune system might participate to the graft dysfunction.

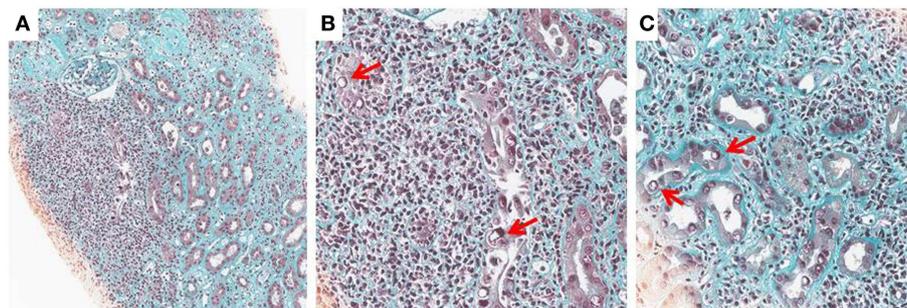


FIGURE 1 | BK-virus-associated nephropathy (A–C): intranuclear viral inclusion in epithelial cells (B,C). Histological analysis of a kidney section from a patient with BKV nephropathy (Trichrome Masson staining). At low magnification (x10), note an extensive fibrosis (green staining) with an important

inflammation (Nucleus of leukocytes appeared in black). At higher magnification (x25), the nucleus of some tubular cells is modified by the presence of a large intranuclear viral inclusion which appeared in white (see arrows). Interstitial infiltration is made by several mononuclear cells.

Human Immunodeficiency Virus 1 Infected Patients

Human immunodeficiency virus-1 infection is characterized by severe acquired defects in the cellular immune system, which are frequently more profound than those observed in transplant patients in the absence of a specific antiretroviral therapy. However, very rare cases of BKV-associated nephropathy have been observed. In contrast, although BKV reactivation is rare, these patients sometimes have reactivation of JCV in the brain. JCV is then responsible for PML, a rare demyelinating disease of the central nervous system that occurs almost exclusively in patients with severe defects in their cellular immune system. Incidence rates have decreased with the development of highly active antiretroviral therapies (HAART): i.e., 3.3 [95% CI, 1.9–5.7] and 1.3 [95% CI, 0.8–1.9] cases per 1000 person-years were at risk in 1995–1996 and in 2000–2006, respectively. However, survival after PML remains poor (median survival time was 0.4 years [95% CI, 0.0–0.7] before HAART and 1.8 years [95% CI, 0.6–3.0] after HAART), with ~50% mortality within 1 year of diagnosis (17). To date, there is no specific treatment for PML or a control for JCV replication. However, HAART has improved the prognosis for PML, probably by facilitating restoration of the immune defect. Indeed, after HAART initiation, an expansion of central memory CD4⁺ T cells was observed in treatment-naïve HIV-infected patients and might be an early indicator of immune reconstitution (18).

Description of the BK-Virus

Members of polyomavirus family have a common morphology and structure. Virions are small, non-enveloped, and appear as icosahedral particles 40–45 μm in diameter. Capsids contain circular double-stranded DNA with a 5 kb viral genome, wrapped around the host's cell-derived histones. Polyomavirus genomes are more than 80% homologous. Their viral genome is divided into three regions (2, 3):

- The non-coding control region regulates gene transcription. At the origin of viral replication, this region regulates expression of the early and late viral genes.
- The early gene region encodes for regulatory proteins called the “large tumor antigen” (LTag) and “small T-antigen” (sTag). LTag and sTag facilitate viral-genome integration and replication by abrogating cell-cycle control. LTag is capable of inactivating some proteins in the endoplasmic reticulum, in particular the p53 protein, responsible for cell-cycle control by inducing apoptosis. BKV is able to prevent lysis of infected cells and has the capacity to initiate oncogenic transformation.
- The late gene region encodes the capsid proteins: VP-1, VP-2, and VP-3.

Polyomavirus-Specific Immunity

In Healthy People

A virus-specific cellular-immunity response is critical to control virus replication and to prevent chronic disease. Viral infections with a propensity for latency require continuous immune control to restrict the rate and level of virus reactivation. T cells respond

by their cytotoxic activities and the secretion of cytokines, and have a direct antiviral effect that is essential for the control of chronic viruses (19). In addition, antibodies (developed during infection) may participate in the clearance of the virus. BKV-seropositive recipients have neutralizing antibody titers, but these are not protective against BKV replication or BKV-associated nephropathy (20, 21).

The targets for BKV-specific cellular immunity are wide and T cells respond against different BKV antigens, such as VP1, VP2, VP3, LTag, and sTag. No immunodominant antigen has been identified (22, 23). The T-cell response of healthy BKV seropositive individuals has been studied by ELISpot and flow cytometry assays. Of the total tested, 75% had more than 10 spot-forming units per 10⁶ PBMC to at least one of the BKV-derived peptide pools added in the assay. Positive responses were found to peptides derived from all five major BKV proteins (VP1, VP2, VP3, LTag, and sTag). In addition, 91% of individuals had a CD4⁺ mediated response, whereas only 33% generated a CD8⁺ T-cell response (24).

BK-virus-specific cellular and humoral immunity in 122 immunocompetent individuals has been shown to be highly prevalent in young individuals. BKV-specific cellular and humoral immunity reaches its maximum in those aged between 20 and 30 years, and then declines with increasing temporal distance from the BKV primary infection. A cellular immune response is dominated by poly functional CD4⁺ T cells, which have proliferative activity and predominantly express poly functional cytokines (25).

Polyomavirus BK in Immunosuppressed Patients

Episodes of BKV reactivation have a complex and poorly understood pathophysiology. Multiple factors have been suggested, such as host determinants (e.g., age, BKV-sero-negativity at pre-transplantation, specific cellular immune responses, ...) and infected tissue (e.g., permissiveness for BKV replication), virus determinants (e.g., replicative characteristics), and exterior modulators (e.g., immunosuppressive treatment, co-infections, inflammatory mediators, ...) (2).

In kidney transplantation, alteration of the BKV-specific T-cell response plays a crucial role in the initiation and progression of nephropathy, although we do not know the precise pathophysiological mechanisms (26, 27). Assessment of BKV-specific cellular immunity can be used in immunological monitoring to manage BKV replication. Failure to develop or expand a specific cellular immune response is a central event for the initiation and maintenance of BKV replication and the progression of BKV-associated nephropathy. BKV-specific interferon (IFN) γ -secreting T lymphocytes have been detected in the peripheral blood of healthy seropositive individuals. On the contrary, BKV-seropositive KT recipients treated with immunosuppressors had significantly lower mean frequencies of specific IFN γ -secreting T lymphocytes compared to controls, whereas no BKV-specific IFN- γ -secreting T cells were detectable in KT patients with BKV-associated nephropathy.

Reduction of immunosuppression in patients with BKV-associated nephropathy was associated with the emergence of IFN- γ -secreting T cells to the same level as that found in

healthy controls, as well as decreased BKV loads in the plasma and urine (21).

In 42 KT recipients with BKV viremia, secretion of IFN- γ by T lymphocytes was demonstrated after stimulation with LTag and VP-1. This cellular immune response was significantly higher in patients with viral clearance compared to those with persistent or increased viremia. VP-1 preferentially stimulated CD4⁺ T cells whereas LTag preferentially stimulated CD8⁺ (23). CD4⁺ T cells that concomitantly secrete IFN- γ /TNF- α /IL-2 were found at a higher frequency in patients with rapid clearance of BKV, suggesting a protective role for BKV-specific poly functional CD4⁺ T cells (22, 28). Surprisingly, in patients with BKV-associated nephropathy, expansion of the effector memory CD4⁺ T cells has been observed. These suggest that not only the control of T-cell proliferation but those other mechanisms of differentiation may also be involved in the control/expansion of BKV. In addition, despite the relatively common use of immunosuppression, the high frequency of seroprevalence in the transplant population and the small number of patients that develop a BKV nephropathy suggest that there may be individual susceptibility to BKV replication within this population.

The quality of response to BKV has been discussed in other studies. The frequencies of BKV-specific CD4⁺ T cells were significantly higher in transplant recipients with BKV replication compared to T-cell frequencies in age-matched healthy controls. Interestingly, BKV replication in renal-transplant patients was associated with a significant change in T-cell functionality, with a lower proliferative activity and lower levels of poly functional T cells compared to healthy controls. A decrease in triple cytokine productive cells was observed with a concomitant increase in cytokine-single productive cells (25). These results suggest that the poly functionality of T cells, in response to the virus, may be important for virus control. The incidence of BKV nephropathy has been reported to be less frequent with the use of mTOR inhibitors-based therapy as compared to CNIs-based therapy. Because mTOR inhibitors impair the cell cycle and have been reported to reduce proliferation of virus *in vitro*, we can speculate that mTOR inhibitors can reduce the replication of the virus. However, we cannot rule out that the use of mTOR inhibitors could have a lower immunosuppressive function. For example, it has been suggested that mTOR inhibitors are associated with a higher rate of cellular acute rejection and a higher development of anti donor-specific antibodies and chronic humoral rejection in renal transplant.

Interestingly, JCV is responsible for PML in HIV immunocompromised patients who have a CD4 deficiency, whereas JCV is rarely responsible for disease in organ-transplant patients. Similar to BKV, a T-cell response seems to play a key role in controlling JCV replication. A low CD4⁺ T-cell count (≥ 50 cells/ μ L), in particular, and a naive subset with a high number of JCV DNA copies when PML is diagnosed appear to be risk factors for mortality (17, 29, 30). A critical role for JCV's specific CD4⁺ T-cell responses to control JCV infection has been reported. The recovery of the anti-JCV T-cell response is associated with JCV clearance and improved survival. In addition, JCV-specific cytotoxic CD8⁺ T-lymphocytes (CTL) are undetectable in the active form of PML. Early detection of JCV-specific CTL had a 87% predictive value for

subsequent JCV-control, whereas the absence of CTL had a 82% predictive value for subsequent active PML ($p = 0.0009$) (31).

In PML patients, JCV-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocytes have been shown to overexpress Programmed Cell Death-1 (PD-1), an inhibitory receptor, associated with cellular exhaustion. Binding of PD-1 to its ligands, PD-L1 and PD-L2, renders T-lymphocytes anergic, preventing proliferation and the production of interleukin-2 (IL-2). Blocking the PD-1 receptor *in vitro*, increased the JCV-specific T-cell immune response in HIV-positive patients with early PML (32). These results highlight the different mechanisms that can be involved in virus maintenance and that modulation of co-stimulation through the second signal family may play a role in the antiviral response.

Experimental Models for Polyomavirus

To determine the role of the immune system in the control of the polyomavirus replication, several models of viral infection have been developed. Recently, a mouse model to study the JCV-specific immune response has been developed in humanized mice. These mice are able to develop T- and B-cell-specific human responses following contact with JCV. Six weeks after JCV inoculation, both CD4⁺ and CD8⁺ T cells overexpressed PD-1 that was found on CD4⁺ and CD8⁺ JCV-specific T cells in patients with PML, suggesting that JCV infection may have an effect on immune exhaustion (33).

No animal model has been yet conducted on BKV. However, rodents are natural hosts for murine polyomavirus (MPyV). MPyV has extensive sequence homology with the human polyomavirus. If the primo-infection is asymptomatic, viral reactivation occurs during episodes of immunosuppression. Mice infected with MPyV are a good model to study the pathophysiology of human polyomavirus infections (34, 35). Following renal transplantation, these mice developed an MPyV-associated nephropathy, similar to human BKV-associated nephropathy. Replication of MPyV was greatest, almost exclusively in kidney transplant, and was associated with renal graft loss, exacerbation of alloreactivity of CD8⁺ T cells, and an enhanced anti-donor T-cell response that led to rejection (36). This replication of MPyV occurred almost exclusively in kidney transplant, but not in native kidneys of this renal transplant mice model. This has raised the hypothesis that renal cells undergoing regeneration and differentiation, because of damage induced by transplantation or because of local inflammation, became permissive to the virus (36, 37).

Immune Antiviral Therapeutic Options

Specific Immunological Monitoring

Immuno-virological monitoring (by studying the functional capacity of specific T cells) can be used to identify patients at risk for infectious complications during acquired immunodeficiency (19). The identification of a low anti viral response against BKV, in kidney transplant could be a marker of a higher risk to develop BKV recurrence and/or BKV nephropathy. In such cases, the modulation of the immunosuppression during transplantation might enable expansion of BKV-specific T cells and, thus, the

control of viral replication. The detection of BKV-specific T cells can be used as tool to guide immunosuppression with the aim of controlling viral replication while also maintaining adequate immunosuppression to prevent rejection (27).

Innovative Immune-Based Therapeutic Treatment

Immune-based therapies may further contribute to BKV control and could be an alternative to the current treatment options in restoring an effective viral-specific immune response. A method for the generation of BKV-specific cytotoxic T lymphocytes from BKV seropositive healthy donors and KT patients, based on stimulation of PBMC with dendritic cells pulsed with inactivated BKV, has been described (38).

Ex vivo studies have shown that the generation and expansion of BKV-specific T cells were possible in KT recipients and allogeneic hematopoietic stem-cell transplant patients. These

specific lymphocytes were obtained from hematopoietic stem cells from healthy donors or after *ex vivo* expansion of BKV-specific T cells. These cells had the ability to proliferate after antigen re-stimulation, to produce pro-inflammatory cytokines, and to induce cytotoxicity *in vitro* (39).

Another immune-based therapy could be developed from vaccines. Finding immunodominant peptides would be of interest in this context to develop a peptide vaccination.

In addition, identification of the role of the PD1/PDL1-L2 receptor, a member of the second signal activation family, during JCV infection opens up new perspectives. During JCV infection, PD1 expressed by infected cells impairs T-cell activation and virus control. Regulation of this pathway or inhibition of its signal could be potentially helpful and control viral replication. However, its modulation in transplant patients could be associated with wider activation of T-cell function, leading to acute rejection.

References

- Hirsch HH, Randhawa P. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant* (2013) **13**:179–88. doi:10.1111/ajt.12110
- Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* (2003) **3**:611–23. doi:10.1016/S1473-3099(03)00770-9
- Dalianis T, Hirsch HH. Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology* (2013) **437**:63–72. doi:10.1016/j.virol.2012.12.015
- Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis* (2009) **199**:837–46. doi:10.1086/597126
- Antonsson A, Green AC, Mallitt K-A, O'Rourke PK, Pawlita M, Waterboer T, et al. Prevalence and stability of antibodies to the BK and JC polyomaviruses: a long-term longitudinal study of Australians. *J Gen Virol* (2010) **91**(Pt 7):1849–53. doi:10.1099/vir.0.020115-0
- Loneragan RM, Carr MJ, De Gascun CF, Costelloe LF, Waters A, Coughlan S, et al. Reactivation of BK polyomavirus in patients with multiple sclerosis receiving natalizumab therapy. *J Neurovirol* (2009) **15**(5–6):351–9. doi:10.3109/13550280903131923
- Dropulic LK, Jones RJ. Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* (2008) **41**(1):11–8. doi:10.1038/sj.bmt.1705886
- Purighalla R, Shapiro R, McCauley J, Randhawa P. BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy. *Am J Kidney Dis* (1995) **26**(4):671–3. doi:10.1016/0272-6386(95)90608-8
- Dall A, Hariharan S. BK virus nephritis after renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* (2008) **3**(Suppl 2):S68–75. doi:10.2215/CJN.02770707
- Hariharan S. BK virus nephritis after renal transplantation. *Kidney Int* (2006) **69**(4):655–62. doi:10.1038/sj.ki.5000040
- Costa C, Cavallo R. Polyomavirus-associated nephropathy. *World J Transplant* (2012) **2**:84–94. doi:10.5500/wjt.v2.i6.84
- Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* (2005) **79**(10):1277–86. doi:10.1097/01.TP.0000156165.83160.09
- Hirsch HH, Vincenti F, Friman S, Tuncer M, Citterio F, Wiecek A, et al. Polyomavirus BK replication in de novo kidney transplant patients receiving tacrolimus or cyclosporine: a prospective, randomized, multicenter study. *Am J Transplant* (2013) **13**:136–45. doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04320.x
- Jacobi B, Prignitz A, Büttner M, Korn K, Weidemann A, Hilgers KF, et al. BK viremia and polyomavirus nephropathy in 352 kidney transplants; risk factors and potential role of mTOR inhibition. *BMC Nephrol* (2013) **14**:207. doi:10.1186/1471-2369-14-207
- Ramos E, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hamze O, Fink JC, Klassen DK, et al. Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* (2002) **13**:2145–51. doi:10.1097/01.ASN.0000023435.07320.81
- Elfadawy N, Flechner SM, Schold JD, Srinivas TR, Poggio E, Fatica R, et al. Transient versus persistent BK viremia and long-term outcomes after kidney and kidney-pancreas transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* (2014) **9**:553–61. doi:10.2215/CJN.08420813
- Engsig FN, Hansen A-BE, Omland LH, Kronborg G, Gerstoft J, Laursen AL, et al. Incidence, clinical presentation, and outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy in HIV-infected patients during the highly active antiretroviral therapy era: a nationwide cohort study. *J Infect Dis* (2009) **199**(1):77–83. doi:10.1086/595299
- Hua W, Jiao Y, Zhang H, Zhang T, Chen D, Zhang Y, et al. Central memory CD4 cells are an early indicator of immune reconstitution in HIV/AIDS patients with anti-retroviral treatment. *Immunol Invest* (2012) **41**(1):1–14. doi:10.3109/08820139.2011.576739
- Harari A, Dutoit V, Cellera C, Bart P-A, Du Pasquier RA, Pantaleo G. Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev* (2006) **211**:236–54. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00395.x
- Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* (2002) **347**:488–96. doi:10.1056/NEJMoa020439
- Comoli P, Azzi A, Maccario R, Basso S, Botti G, Basile G, et al. Polyomavirus BK-specific immunity after kidney transplantation. *Transplantation* (2004) **78**:1229–32. doi:10.1097/01.TP.0000137932.44791.D3
- Mueller K, Schachtner T, Sattler A, Meier S, Friedrich P, Trydzenskaya H, et al. BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection. *Transplantation* (2011) **91**:100–7. doi:10.1097/TP.0b013e3181fe1335
- Binggeli S, Egli A, Schaub S, Binet I, Mayr M, Steiger J, et al. Polyomavirus BK-specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* (2007) **7**:1131–9. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.01754.x
- Tong D, Miller J, Kokko K, McLaughlin S, Lukacher A. Healthy individuals generate a predominantly CD4 cell response against polyomavirus BK. *Am J Transplant* (2005) **5**(S11):452.
- Schmidt T, Adam C, Hirsch HH, Janssen MWW, Wolf M, Dirks J, et al. BK polyomavirus-specific cellular immune responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication. *Am J Transplant* (2014) **14**(6):1334–45. doi:10.1111/ajt.12689
- Comoli P, Hirsch HH, Ginevri F. Cellular immune responses to BK virus. *Curr Opin Organ Transplant* (2008) **13**:569–74. doi:10.1097/MOT.0b013e3283186b93
- Comoli P, Cioni M, Basso S, Gagliardone C, Potenza L, Verrina E, et al. Immunity to polyomavirus BK infection: immune monitoring to regulate the balance between risk of BKV nephropathy and induction of alloimmunity. *Clin Dev Immunol* (2013) **2013**:256923. doi:10.1155/2013/256923
- Trydzenskaya H, Sattler A, Müller K, Schachtner T, Dang-Heine C, Friedrich P, et al. Novel approach for improved assessment of phenotypic

- and functional characteristics of BKV-specific T-cell immunity. *Transplantation* (2011) **92**:1269–77. doi:10.1097/TP.0b013e318234e0e5
29. Gasnault J, Costagliola D, Hendel-Chavez H, Duloust A, Pakianather S, Mazet A-A, et al. Improved survival of HIV-1-infected patients with progressive multifocal leukoencephalopathy receiving early 5-drug combination antiretroviral therapy. *PLoS One* (2011) **6**(6):e20967. doi:10.1371/journal.pone.0020967
 30. Gasnault J, Kahraman M, de Goër de Herve MG, Durali D, Delfraissy J-F, Taoufik Y. Critical role of JC virus-specific CD4 T-cell responses in preventing progressive multifocal leukoencephalopathy. *AIDS* (2003) **17**:1443–9. doi:10.1097/00002030-200307040-00004
 31. Du Pasquier RA, Kuroda MJ, Zheng Y, Jean-Jacques J, Letvin NL, Koralnik IJ. A prospective study demonstrates an association between JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes and the early control of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Brain* (2004) **127**(Pt 9):1970–8. doi:10.1093/brain/awh215
 32. Tan CS, Bord E, Broge TA Jr, Glotzbecker B, Mills H, Gheuens S, et al. Increased program cell death-1 expression on T lymphocytes of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Acquir Immune Defic Syndr* (2012) **60**:244–8. doi:10.1097/QAI.0b013e31825a313c
 33. Tan CS, Broge TA Jr, Seung E, Vrbanc V, Viscidi R, Gordon J, et al. Detection of JC virus-specific immune responses in a novel humanized mouse model. *PLoS One* (2013) **8**:e64313. doi:10.1371/journal.pone.0064313
 34. Lilley BN, Gilbert JM, Ploegh HL, Benjamin TL. Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection. *J Virol* (2006) **80**:8739–44. doi:10.1128/JVI.00791-06
 35. Swanson PA II, Lukacher AE, Szomolanyi-Tsuda E. Immunity to polyomavirus infection: the polyomavirus-mouse model. *Semin Cancer Biol* (2009) **19**(4):244–51. doi:10.1016/j.semcancer.2009.02.003
 36. Han Lee ED, Kemball CC, Wang J, Dong Y, Stapler DC Jr, Hamby KM, et al. A mouse model for polyomavirus-associated nephropathy of kidney transplants. *Am J Transplant* (2006) **6**:913–22. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01265.x
 37. Atencio IA, Shadan FF, Zhou XJ, Vaziri ND, Villarreal LP. Adult mouse kidneys become permissive to acute polyomavirus infection and reactivate persistent infections in response to cellular damage and regeneration. *J Virol* (1993) **67**:1424–32.
 38. Comoli P, Basso S, Azzi A, Moretta A, De Santis R, Del Galdo F, et al. Dendritic cells pulsed with polyomavirus BK antigen induce ex vivo polyoma BK virus-specific cytotoxic T-cell lines in seropositive healthy individuals and renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* (2003) **14**(12):3197–204. doi:10.1097/01.ASN.0000096374.08473.E3
 39. Blyth E, Clancy L, Simms R, Gaundar S, O'Connell P, Micklethwaite K, et al. BK virus-specific T cells for use in cellular therapy show specificity to multiple antigens and polyfunctional cytokine responses. *Transplantation* (2011) **92**:1077–84. doi:10.1097/TP.0b013e31823328c0

Conflict of Interest Statement: 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 © 2015 Dekeyser, François, Beaudreuil and Durrbach. 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) or licensor 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.

Annexe 2 : Dekeyser M., Ladrière M., Audonnet S., Frimat L. and De Carvalho Bittencourt M. (2017) An Early Immediate Early Protein IE-1–Specific T-Cell Polyfunctionality Is Associated With a Better Control of Cytomegalovirus Reactivation in Kidney Transplantation. *Kidney International Reports.* 2, 486–492

Abstract

Immune response quality is considered as a major factor in chronic viral infections. Cytomegalovirus (CMV) remains one of most frequent and deleterious viral infections in kidney transplantation. For the prevention of CMV disease, prophylactic or preemptive treatments are commonly proposed. Because of side effects, new methods for tailoring of anti-CMV treatments are needed to adapt to an individual's recipient risk. Assessment of the host immune system capacity to control CMV replication might be useful to predict viral reactivation control, but is not yet widely recommended. In this study, we characterized the specific memory T-cell responses against immediate early protein 1 (IE-1) and phosphoprotein 65 (pp65), 2 immunodominant proteins from the CMV virion, to better understand the immune mechanisms of viral control in CMV-seropositive patients receiving kidney transplantation.

An Early Immediate Early Protein IE-1–Specific T-Cell Polyfunctionality Is Associated With a Better Control of Cytomegalovirus Reactivation in Kidney Transplantation



To the Editor: Immune response quality is considered as a major factor in chronic viral infections.¹ Cytomegalovirus (CMV) remains one of most frequent and deleterious viral infections in kidney transplantation. For the prevention of CMV disease, prophylactic or preemptive treatments are commonly proposed. Because of side effects, new methods for tailoring of anti-CMV treatments are needed to adapt to an individual's recipient risk.^{2–4} Assessment of the host immune system capacity to control CMV replication might be useful to predict viral reactivation control, but is not yet widely recommended.^{5–9} In this study, we characterized the specific memory T-cell responses against immediate early protein 1 (IE-1) and phosphoprotein 65 (pp65), 2 immunodominant proteins from the CMV virion, to better understand the immune mechanisms of viral control in CMV-seropositive patients receiving kidney transplantation.

PATIENTS, MATERIAL, AND METHODS

According to France's bioethics specifications, we realized a prospective monocentric observational study. Consecutive CMV-seropositive patients receiving *de novo* kidney transplant (KTR) and CMV-seropositive healthy donors (French blood bank donors) were included from January to November 2013. In the KTR group, CMV-DNAemia was monitored weekly in whole blood during the 6 months' follow-up. CMV infection or disease was defined according to International Guidelines and American Society of Transplantation recommendations for use in clinical trials.^{3,4,10} Antiviral therapy was initiated in case of CMV infection (defined by an increase of CMV-DNAemia kinetic more than 10 times between 2 consecutive samples, without symptoms, treated by preemptive valganciclovir) or CMV disease (curative ganciclovir treatment, followed by preemptive therapy). On renal transplant day (D0), 6 weeks, 3 months, and 6 months after transplantation,

peripheral blood mononuclear cells were stimulated overnight with CMV peptide pools (IE-1 or pp65). After stimulation, cells were stained for memory T-cell subpopulation identification^{11–13} (stem-cell memory [T_{SCM}], central-memory [T_{CM}], effector-memory [T_{EM}], and terminally differentiated effector T cells [T_D]), and then for intracellular cytokine secretions (Figure 1, Supplementary Material and Methods online). Lymphocyte polyfunctionality was evaluated by the capacity of CMV-specific T cells to perform single, double, and triple cytokine secretions. To ensure the robust analysis of CMV-specific T-cell subpopulations, only samples with CMV-specific T-cell responses more than twice the background (no antigen) and a minimum of 40 cytokine-secreting cells were considered positives and included (Supplementary Figure S1).

RESULTS

Clinical Data

Fifteen CMV-seropositive KTR were followed for 6 months after transplantation. As the control group, 17 CMV-seropositive healthy donors were included. Controls were comparable to KTR for age and gender ($P > 0.05$). Two groups of KTR were identified per the occurrence of CMV infection/disease: 7 KTR presented CMV infection/disease requiring antiviral treatment (CMV⁺ KTR), whereas 8 KTR did not (CMV⁻ KTR). Median CMV-viral load peak was 55,800 copies/ml (1070–801,000) with a median time of 6 weeks after transplantation. During the follow-up period, the CMV⁺ KTR group presented more viral infectious complications, without a statistical difference concerning the immunosuppressive regiment, nor in graft function (Table 1).

At D0, CMV-Specific Memory T Cells Were Less Frequent, With Lower CD8 T_{SCM} and T_{CM} Counts in Patients Awaiting Renal Transplantation

In pretransplantation, CD4 and CD8 T-cell total counts were similar in KTR groups compared with healthy donors and, on the sixth week after transplantation, CMV⁺ KTR presented CD8 lymphopenia compared with CMV⁻ KTR ($P = 0.04$; Figure 2a). On D0, CMV-specific CD8 T cells were lower in KTR groups compared with healthy donors (IE-1: $P = 0.004$, pp65: $P = 0.04$; Figure 2b) and, on the third month after transplantation, a lower IE-1–specific CD4 T-cell count was found in the CMV⁺ KTR compared with the CMV⁻ KTR group ($P = 0.04$; Figure 2b).

In pretransplantation, compared with healthy donors, CMV-specific T_{SCM} and T_{CM} were lower in CMV⁺ KTR (IE-1-CD4 and CD8 T_{CM}, IE-1-CD8 T_{SCM},

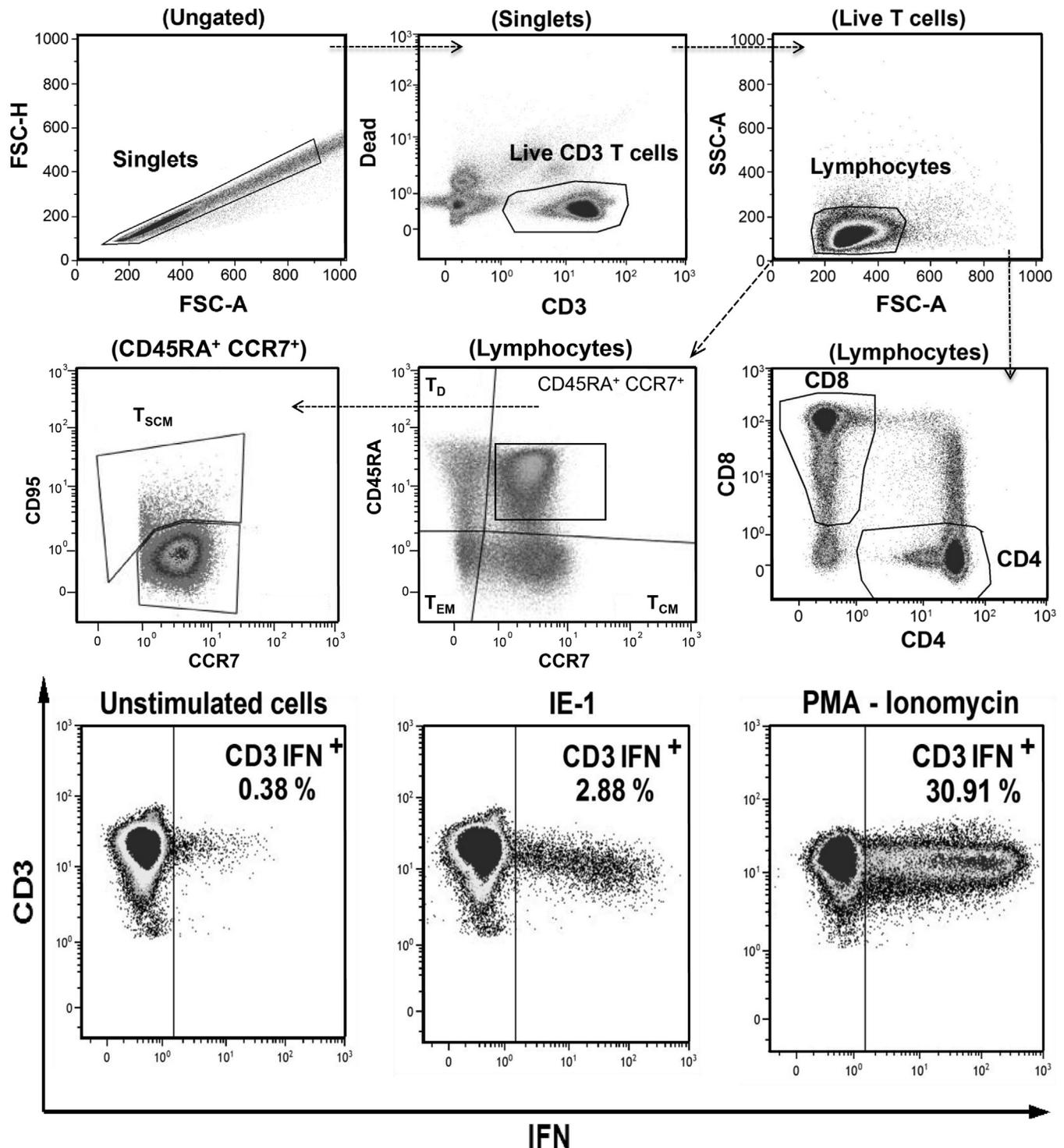


Figure 1. Gating strategy for the identification of IE-1 and pp65-specific memory T cells. One million fresh peripheral blood mononuclear cells were incubated overnight in AIM-V medium alone (unstimulated cells) or with CMV peptides (IE-1 or pp65 peptide pools) or with positive control (PMA-ionomycin). After activation, cells were stained by surface markers (antibodies anti-CD3, -CD4, -CD8, -CCR7, -CD45RA, -CD95) and then fixed and permeabilized for intracellular cytokine staining (antibodies anti-IL2⁺, TNF α ⁺, or IFN γ ⁺) on CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T lymphocytes. In IE-1, pp65, and PMA/ionomycin stimulation, the same gating strategy was used to define the cytokine-secreting cells. The percentage of cytokine-producing CD4 or CD8 T cells was determined after subtracting the background in unstimulated controls. Shown are examples on a representative healthy donor of IFN γ -secreting CD3⁺ T cells (percentage of CD3⁺ T cells expressing IFN γ) in unstimulated cells, after IE-1 and PMA/ionomycin (Continued)

Table 1. Characteristics and clinical evolution of CMV-seropositive patients with *de novo* kidney transplantation, according to the occurrence of CMV infection/disease, during the 6 months of follow-up

Time		CMV ⁺ KTR (n = 7)	CMV ⁻ KTR (n = 8)	P value
D0	Male (n)	4	7	0.282
	Age (yr)	70 (49–77)	50 (31–74)	0.088
	Diabetic and/or vascular nephropathy (n)	4	4	1.000
	Malformative uropathy (n)	1	1	1.000
	Glomerulopathy (n)	2	3	1.000
	Dialysis (mo)	45 (23–104)	23 (0–159)	0.219
	Hemodialysis (n)	6	6	1.000
	First kidney transplant (n)	6	6	1.000
	I and II class HLA mismatches (n)	4 (2–8)	5.5 (2–8)	0.788
	Thymoglobulin (n)	3	3	1.000
	Tacrolimus (n)	3	6	0.315
	Mycophenolate mofetil (n)	6	8	0.467
	Corticosteroids (n)	6	8	0.467
	CMV-specific IgG antibody (UA/ml)	222 (101–250)	250 (125–250)	0.689
W6	CMV viral load peak (copies/ml)	55,800 (1070–801,000)	0 (0–2867 ^a)	**0.002
	Delay between CMV infection/disease and transplant day (wk)	6.3 (2.3–11)	0	*0.016
	Valganciclovir (n)	5	–	–
	Ganciclovir or valganciclovir (n)	2	–	–
	Creatininemia (μmol/l)	204 (98–412)	149 (93–210)	0.456
M6	Creatininemia (μmol/l)	183 (96–542)	140 (78–210)	0.149
	Graft rejection (n)	2	1	0.569
	Graft lost (n)	2	0	0.200
	Viral infectious complications other than CMV infection/disease (n)	6	2	*0.041

Median (Minimum–Maximum), Mann-Whitney. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$.

Seven KTR presented CMV infection/disease requiring treatment (CMV⁺ KTR), whereas 8 KTR did not (CMV⁻ KTR). There was no statistical difference concerning the immunosuppressive regimen, nor in graft function from the transplant day to the sixth month. During the follow-up period, patients from the CMV⁺ KTR group had more viral infectious complications such as EBV or HSV reactivation, compared with the CMV⁻ KTR group.

CMV, cytomegalovirus; CMV⁺ KTR, CMV-seropositive kidney transplant recipients with CMV-infection/disease; CMV⁻ KTR, CMV-seropositive kidney transplant recipients without CMV-infection/disease; D0, transplantation day; M6, 6th month after kidney transplantation; n, number; W6, 6th week after kidney transplantation.

^aTwo patients from the CMV⁻ KTR group presented a latent CMV, without antiviral treatment requirement (asymptomatic lower CMV viremia with spontaneous normalization between 2 consecutive samples).

pp65-CD8 T_{SCM} and T_{CM}, all $P < 0.05$; Figure 3a and b). In healthy donors, compared with CMV⁺ KTR, IE-1-specific CD8 T_{EM} and T_D were also higher ($P = 0.04$ and $P = 0.009$, respectively; Figure 3a). Although the CMV-specific T-cell differentiation states were similar between the 2 KTR groups on the transplant day, on the third and sixth months after transplantation, IE-1-specific CD8 T_{CM} counts were lower in CMV⁺ KTR ($P = 0.01$ and $P = 0.003$, respectively; Figure 3c).

IE-1-Specific Lymphocyte Polyfunctionality Increased Early in KTR Without CMV Infection/Disease

Concerning the IE-1-specific lymphocyte polyfunctionality, in pretransplantation, IE-1-specific one-cytokine-secreting CD8 T cells were more frequent in healthy donors compared with KTR ($P = 0.0001$, $P = 0.005$, respectively; Figure 4a), without differences between the 2 KTR groups (Figure 4a). However, we observed, on the sixth week, higher double- and triple-cytokine-secretion counts of IE-1-CD4 T cells ($P = 0.01$, $P = 0.05$, respectively; Figure 4b) in CMV⁻ KTR

compared with CMV⁺ KTR. On the third and sixth months after transplant, triple-cytokine-secreting CD8 T-cell counts were higher in CMV⁻ KTR ($P = 0.04$, $P = 0.03$, respectively; Figure 4b).

Concerning the pp65-specific lymphocyte polyfunctionality, there was no difference between KTR with or without CMV infection/disease during the follow-up period (Supplementary Figure S2b).

DISCUSSION

Our study aimed to better understand the immune mechanisms of viral control in CMV-seropositive patients receiving kidney transplantation. Immunological memory is the key feature of the adaptive immune system to provide life-long protection against pathogens.^{11,14} Here, CMV-specific memory T cells were numerically lower in patients awaiting kidney transplantation. In KTR with CMV infection/disease, we found a decrease of CMV-specific T-cell subsets with lower T_{SCM} and T_{CM} counts in pretransplantation, compared with healthy donors. A premature immunological aging in patients with end-stage renal failure

Figure 1. (Continued) stimulation. Similar results were found for IL2 and TNF α secretions, and after pp65 stimulation (data not shown). Lymphocyte polyfunctionality was evaluated by the capacity of the CMV-specific T cells to perform single, double, and triple cytokine secretions. Mono-, bi-, and trifunctional T cells were identified by Boolean gates. Total frequency of polyfunctional cells was determined by summing the total number of cytokine-secreting cells. CD3 IFN γ ⁺, interferon γ -producing CD3 T cells; IE-1, immediate early protein 1; IFN γ , interferon γ ; pp65, phosphoprotein 65; T_{CM}, central-memory T cells; T_D, terminally differentiated effector T cells; T_{EM}, effector-memory T cells; T_{SCM}, stem-cell memory T cells.

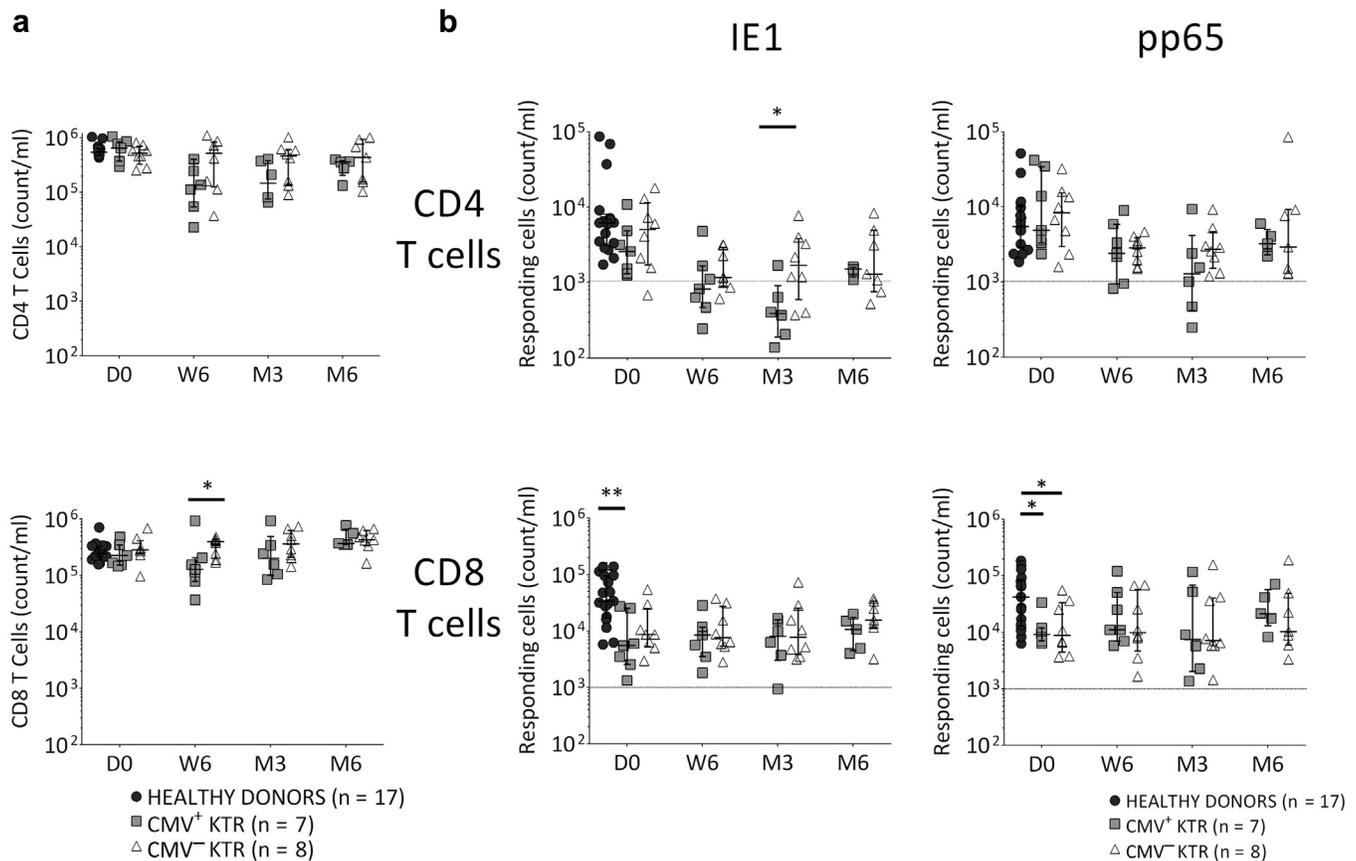


Figure 2. Evolution of CD4 and CD8 T-cell counts and CMV-specific CD4 and CD8 T-cell counts in healthy donors and CMV-seropositive KTR, from transplant day to 6 months after transplantation. (a) On the transplant day, there were no differences in absolute cell numbers of CD4 and CD8 T cells between healthy donors and KTR groups. From the sixth week after transplantation, CMV⁺ KTR presented CD8 T-cell lymphopenia, compared with the CMV⁻ KTR group. (b) On the transplant day, absolute cell numbers of CMV-specific CD8 T cells were lower in CMV-seropositive KTR, compared with healthy donors. From the third month after transplantation, CMV⁺ KTR presented lower absolute cell numbers of IE-1-specific CD4 T cells, compared with the CMV⁻ KTR group. Median and 25th and 75th percentiles, Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests for comparison of 2 or 3 groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$. The dotted line represents a strong CMV-specific response. CMV⁺ KTR, CMV-seropositive kidney transplant recipients with CMV infection/disease; CMV⁻ KTR, CMV-seropositive kidney transplant recipients without CMV infection/disease; D0, transplantation day; IE-1, immediate early protein 1; M3, third month after kidney transplantation; M6, sixth month after kidney transplantation; n, number; pp65, phosphoprotein 65; W6, sixth week after kidney transplantation.

was observed in previous studies, showing a selective loss of naive and T_{CM} T cells.^{15–18} In healthy aged donors, CMV-specific response may represent over 10% of the CD8 T-cell pool.¹⁹ Here, CMV-specific CD8 T cells mainly produced one cytokine in healthy donors. This relative monofunctionality in healthy donors could be explained by the expansion of IE-specific T_{EM} and T_D CD8 T cells. Interestingly, the higher T_{SCM} and T_{CM} counts in healthy donors can suggest increased self-renewal and multipotency capacities, providing a potential reservoir for T-cell memory.¹³ Lymphocyte phenotype and functionality are intrinsically linked and effector T cells may exercise effector functions in situations of viral reactivation.²⁰ CMV-specific T-cell differentiation state was not an early predictive factor allowing identifying recipients at CMV infection/disease risk. Although immunosuppressive regimens were similar in our

study, quantitative and qualitative changes have been described to occur in CMV-specific CD8 T cells in response to immunosuppressive treatment, with predominantly effector phenotype and cytotoxic capacities.²¹ In liver or lung transplantation, polyfunctional CMV-specific T cells have been found to be associated with a lower risk of CMV reactivation.^{22–24} Also, precedent studies found that higher frequencies of IE-1 but not pp65-specific CD8 T cells correlated with protection against CMV disease.^{25–27} Here, we found a higher IE-1-specific lymphocyte polyfunctionality in KTR without CMV infection/disease compared with those with CMV infection/disease, with a superior double-functionality of CD4 T cells at an early period, that is, 6 weeks after transplantation and a superior trifunctionality of CD8 T cells at 3 and 6 months after transplantation. Importantly, polyfunctionality of CMV-specific T cells in pretransplantation was not

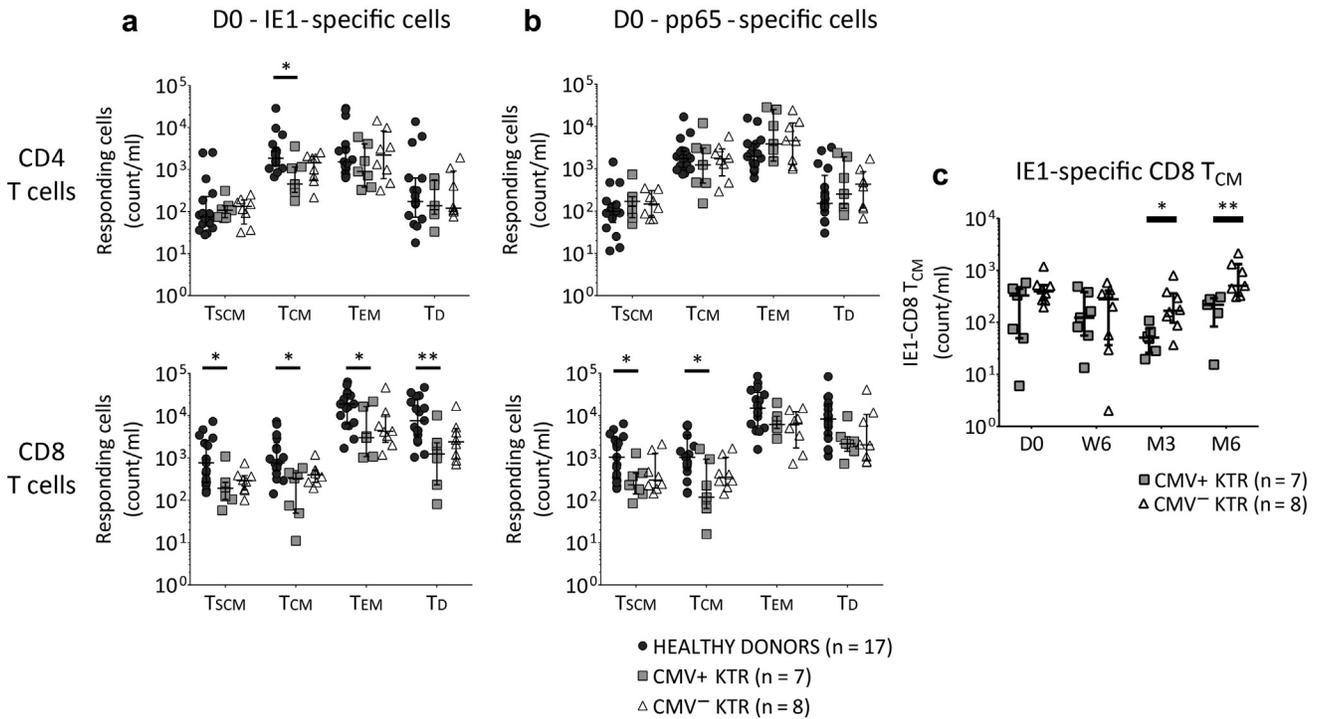


Figure 3. CMV-specific memory CD8 T_{SCM} and T_{CM} are lower in kidney transplant recipients with CMV infection/disease. (a) On the transplant day, absolute numbers of IE-1-specific CD4 T_{CM} were lower in CMV⁺ KTR, compared with healthy donors. The distribution of IE-1-specific CD8 T-cell differentiation was more important in healthy donors, with an expansion of T_{SCM}, T_{CM}, T_{EM}, and T_D. (b) On the transplant day, without a difference in pp65-specific CD4 T-cell differentiation, absolute cell numbers of pp65-specific CD8 T_{SCM} and T_{CM} were lower in CMV⁺ KTR, compared with healthy donors. (c) On the third and sixth months after transplantation, CMV⁺ KTR presented a lower absolute cell numbers of IE-1-specific CD8 T_{CM} compared with the CMV⁻ KTR group. Median and 25th and 75th percentiles, Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests for comparison of 2 or 3 groups. **P* < 0.05, ***P* < 0.005. CMV⁺ KTR, CMV-seropositive kidney transplant recipients with CMV infection/disease; CMV⁻ KTR, CMV-seropositive kidney transplant recipients without CMV infection/disease; IE-1, immediate early protein 1; n, number; pp65, phosphoprotein 65; T_{CM}, central-memory T cells; T_D, terminally differentiated effector T cells; T_{EM}, effector-memory T cells; T_{SCM}, stem-cell memory T cells.

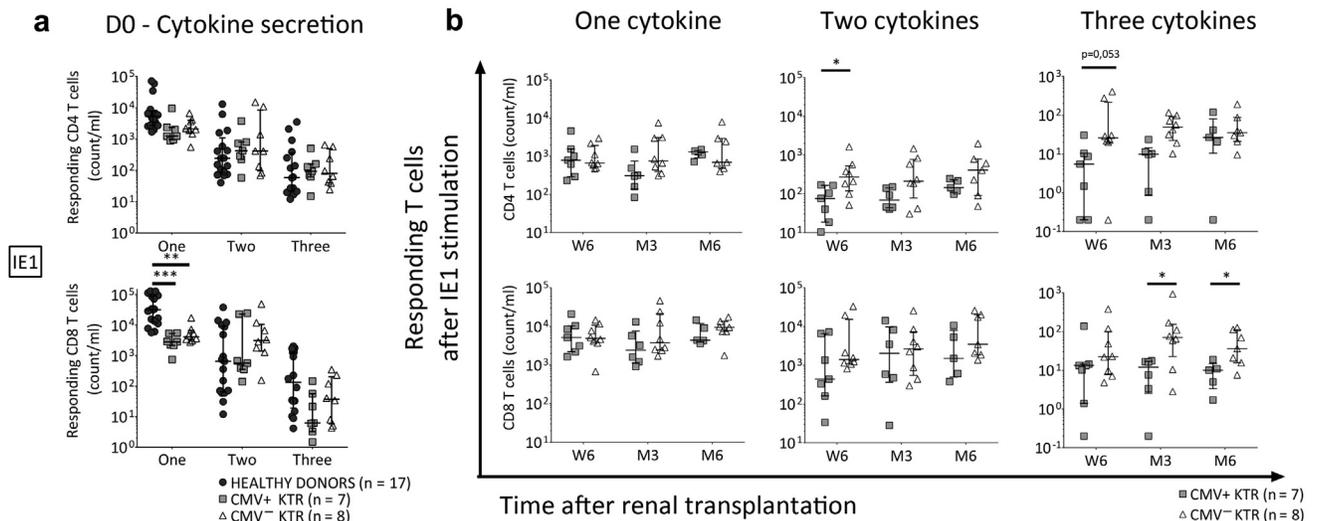


Figure 4. IE-1-specific lymphocyte polyfunctionality is precociously more important in KTR without CMV infection/disease. An early increase of IE-1-specific lymphocyte polyfunctionality in kidney transplant recipients without CMV infection/disease was observed. (a) On the transplant day, the absolute number of IE-1-specific CD8 T cells producing 1 cytokine was higher in healthy donors, compared with KTR groups. No differences were found in T cells secreting double and triple cytokines on D0. (b) From the sixth week after transplantation, double-cytokine-producing CD4 T cells were higher in KTR without CMV infection/disease. On the third and sixth months after transplant, concomitant secretion of 3 cytokines by IE-1-specific CD8 T cells was higher in CMV⁻ KTR. Median and 25th and 75th percentiles, Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests for comparison of 2 or 3 groups. **P* < 0.05, ***P* < 0.005, ****P* < 0.0005. CMV⁺ KTR, CMV-seropositive kidney transplant recipients with CMV infection/disease; CMV⁻ KTR, CMV-seropositive kidney transplant recipients without CMV infection/disease; D0, transplantation day; IE-1, immediate early protein 1; M3, third month after kidney transplantation; M6, sixth month after kidney transplantation; n, number; W6, sixth week after kidney transplantation.

different between KTR with or without CMV infection/disease. Despite the small number of patients and a relatively limited lymphocyte polyfunctionality evaluation, our pilot study was prospective and assessed the CMV-specific cellular immunity in the absence of systematic prophylactic treatment. In conclusion, our study suggests that an early posttransplantation emergence of polyfunctional IE-1-specific T cells is associated with a decreased risk of CMV infection/disease, and therefore, the identification of such T cells might possibly be used as a predictive biomarker of viral replication control in the renal transplant setting. Further multicenter studies with higher numbers of patients are needed to confirm this hypothesis.

Manon Dekeyser¹, Marc Ladrière¹,
Sandra Audonnet², Luc Frimat¹ and Marcelo De
Carvalho Bittencourt²

¹Department of Nephrology and Kidney Transplantation, CHRU Nancy, Nancy, France; and ²Laboratory of Immunology, Nancy-tomique, Pôle Laboratoires, CHRU Nancy, Nancy, France

Correspondence: Manon Dekeyser, Department of Nephrology and Kidney Transplantation, CHRU Nancy, Avenue du Morvan, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, Nancy, France. E-mail: manondekeyser@gmail.com

DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplemental Material and Methods.

Figure S1. Absolute number of T cells (CD4, CD8, CMV-specific CD4 and CD8 T cells) included in CMV-specific memory T-cell analyses during the study follow-up. CMV⁺ KTR, CMV-seropositive kidney transplant recipients with CMV-infection/disease; CMV⁻ KTR, CMV-seropositive kidney transplant recipients without CMV-infection/disease; D0, day of transplantation; IE-1, Immediate Early protein 1; M3, third month after kidney transplantation; M6, sixth month after kidney transplantation; n, number; pp65: Phosphoprotein 65; W6, sixth week after kidney transplantation. Median and 25th and 75th percentiles. The dotted line represents a strong CMV-specific response.

Figure S2. Evaluation of pp65-specific T-cell polyfunctionality in KTR with or without CMV infection/disease, from the transplant day to 6 months. On the transplant day, the absolute number of pp65-specific T cells producing one cytokine was higher in healthy donors, while double-cytokine secreting pp65-specific T-cells were higher in KTR group. There were no differences between KTR with or without CMV-infection/disease during the follow-up period. CMV⁺ KTR, CMV-seropositive kidney transplant recipients with CMV-infection/disease; CMV⁻ KTR, CMV-seropositive kidney transplant recipients without

CMV-infection/disease; D0, transplantation day; M3, third month after kidney transplantation; M6, sixth month after kidney transplantation; n, number; pp65, Phosphoprotein 65; W6, sixth week after kidney transplantation. Median and 25th and 75th percentiles, Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests for comparison of 2 or 3 groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$.

Supplementary material is linked to the online version of the paper at www.kireports.org.

REFERENCES

- Harari A, Dutoit V, Cellerai C, et al. Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev*. 2006;211:236–254.
- Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med*. 2007;357:2601–2614.
- Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation*. 2010;89:779–795.
- Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation*. 2013;96:333–360.
- Lúcia M, Crespo E, Cruzado JM, et al. Human CMV-specific T-cell responses in kidney transplantation; toward changing current risk-stratification paradigm. *Transpl Int*. 2014;27:643–656.
- Rittà M, Costa C, Sidoti F, et al. Pre-transplant assessment of CMV-specific immune response by Elispot assay in kidney transplant recipients. *New Microbiol*. 2015;38:329–335.
- Costa C, Balloco C, Sidoti F, et al. Evaluation of CMV-specific cellular immune response by Elispot assay in kidney transplant patients. *J Clin Virol*. 2014;61:523–528.
- Egli A, Humar A, Kumar D. State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin Infect Dis*. 2012;55:1678–1689.
- Sester M, Leboeuf C, Schmidt T, et al. The “ABC” of Virus-Specific T Cell Immunity in Solid Organ Transplantation. *Am J Transplant*. 2016;16:1697–1706.
- Humar A, Michaels M, AST ID Working Group on Infectious Disease Monitoring. American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6:262–274.
- Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:24–35.
- Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 2011;17:1290–1297.
- Lugli E, Dominguez MH, Gattinoni L, et al. Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory. *J Clin Invest*. 2013;123:594–599.
- van de Berg PJEJ, van Stijn A, Ten Berge IJM, et al. A fingerprint left by cytomegalovirus infection in the human T cell compartment. *J Clin Virol*. 2008;41:213–217.

15. Betjes MGH, Huisman M, Weimar W, et al. Expansion of cytolytic CD4⁺CD28⁻ T cells in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2008;74:760–767.
16. Betjes MGH, Langerak AW, van der Spek A, et al. Premature aging of circulating T cells in patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2011;80:208–217.
17. Litjens NHR, van Druningen CJ, Betjes MGH. Progressive loss of renal function is associated with activation and depletion of naive T lymphocytes. *Clin Immunol.* 2006;118:83–91.
18. Betjes MGH. Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9:255–265.
19. Khan N, Hislop A, Gudgeon N, et al. Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. *J Immunol.* 2004;173:7481–7489.
20. van Leeuwen EM, Gamadia LE, Baars PA, et al. Proliferation requirements of cytomegalovirus-specific, effector-type human CD8⁺ T cells. *J Immunol.* 2002;169:5838–5843.
21. Gamadia LE, Rentenaar RJ, Baars PA, et al. Differentiation of cytomegalovirus-specific CD8(+) T cells in healthy and immunosuppressed virus carriers. *Blood.* 2001;98:754–761.
22. Nebbia G, Mattes FM, Smith C, et al. Polyfunctional cytomegalovirus-specific CD4⁺ and pp65 CD8⁺ T cells protect against high-level replication after liver transplantation. *Am J Transplant.* 2008;8:2590–2599.
23. Snyder LD, Medinas R, Chan C, et al. Polyfunctional cytomegalovirus-specific immunity in lung transplant recipients receiving valganciclovir prophylaxis. *Am J Transplant.* 2011;11:553–560.
24. Snyder LD, Chan C, Kwon D, et al. Polyfunctional T-cell signatures to predict protection from cytomegalovirus after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193:78–85.
25. Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, et al. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med.* 2005;201:1031–1036.
26. Nickel P, Bold G, Presber F, et al. High levels of CMV-IE-1-specific memory T cells are associated with less alloimmunity and improved renal allograft function. *Transpl Immunol.* 2009;20:238–242.
27. Bestard O, Lucia M, Crespo E, et al. Pretransplant immediately early-1-specific T cell responses provide protection for CMV infection after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2013;13:1793–1805.

Received 30 June 2016; revised 21 February 2017; accepted 22 February 2017; published online 1 March 2017

© 2017 International Society of Nephrology. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Kidney Int Rep (2017) 2, 486–492; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ekir.2017.02.016>

Annexe 3 : Matériel et Méthodes supplémentaires

Nous avons conduit une étude observationnelle d'Avril 2014 à Avril 2018. Il s'agit de l'étude MeITyk, étude monocentrique incluant des patients du service de Néphrologie de l'hôpital Bicêtre - Hôpitaux Universitaires Paris Sud (étude en soins courants, réalisée selon les bonnes pratiques de réalisation de recherche clinique - Protocole n°PP 14-046 en date du 18/12/2014).

Les critères d'inclusion ont été les suivants :

- patients âgés de plus de 18 ans,
- pas d'autre transplantation d'organe hormis celle rénale,
- pas d'infection VIH/VHB/VHC chronique active.

Les patients inclus sont tous issus du service de Néphrologie de l'hôpital Bicêtre (Hôpitaux Universitaires Paris Sud). Le CPP Ile de France 7 a été consulté et n'a pas retrouvé d'obstacle éthique à la réalisation de l'étude. Une lettre d'information a été donnée à l'ensemble des patients, leur consentement ayant été recueilli par écrit.

Sur 250 patients transplantés rénaux régulièrement suivis dans notre service (avec charges virales BK-v disponibles), nous avons sélectionné 100 patients transplantés rénaux correspondant aux critères définis plus haut. Cent patients ont été exclus pour transplantation combinée d'organes, 50 autres patients ont été exclus pour données manquantes et/ou virémie ou Nx à BK-v précédemment résolutive.

Les 100 patients transplantés rénaux inclus ont été répartis-en 4 groupes selon leur niveau de réactivation BK-v puis suivis pendant 36 mois. Le nombre de patients a été défini en accord avec un calcul statistique du nombre de sujet nécessaires suffisant pour obtenir une puissance statistique supérieure ou égale à 80%.

La **Figure 28** ci-dessous présente le flow chart de l'étude MelTyk.

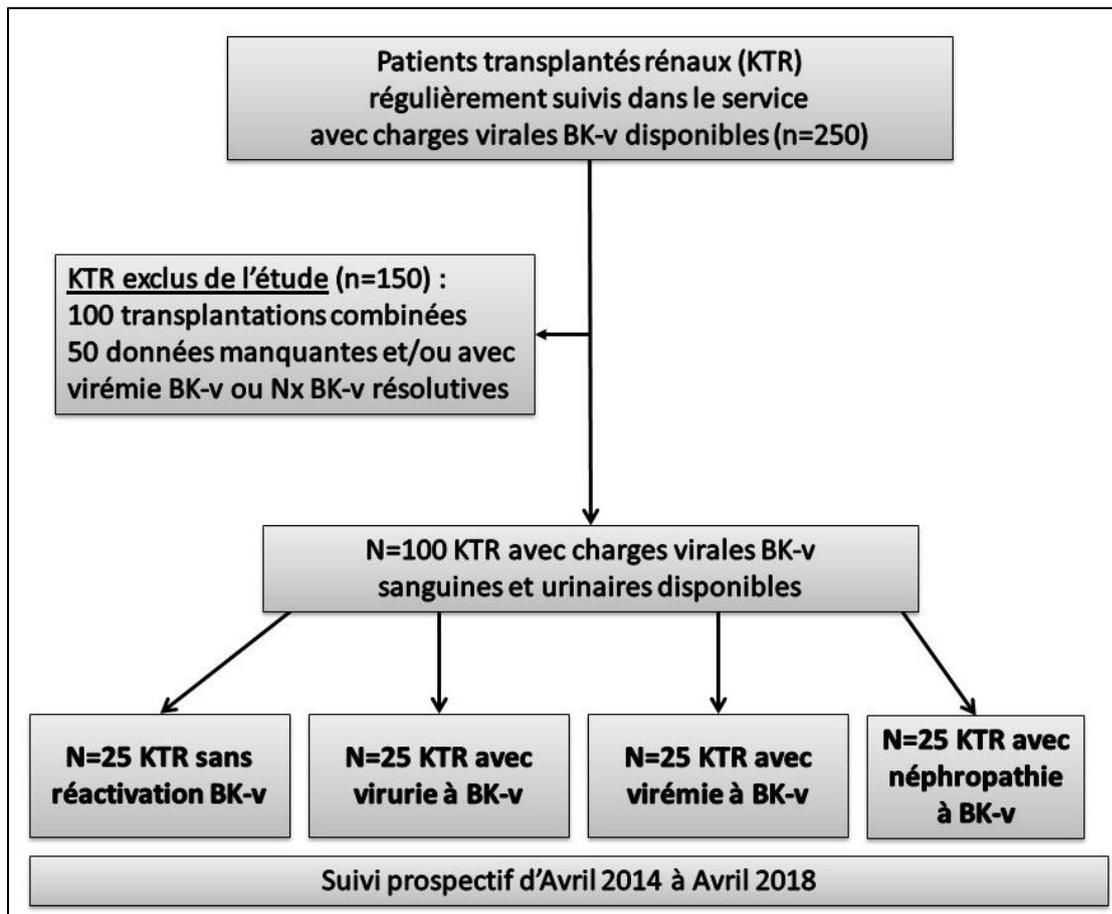


Figure 28 : Flow chart de l'étude MelTyk

Dans chaque groupe de patients, nous avons évalué les caractéristiques cliniques en pré-transplantation, l'évolution du greffon rénal en termes de fonction et de survie du greffon rénal, le traitement immunosuppresseur, la charge virale BK-v sanguine et urinaire, le nombre d'incompatibilités HLA (HLA-A, HLA-B, HLA-DR et HLA-DQ) entre le donneur et le receveur et la fonctionnalité des LT mémoires spécifiques du BK-v du receveur.

Les 4 groupes comportant chacun 25 patients par groupe se composent ainsi :

- un groupe sans réactivation BK-v
 - charge virale BK-v plasmatique et urinaire indétectable
 - pendant au moins 12 mois ;
- un groupe avec virurie BK-v
 - virurie BK-v > 200 copies/ml et
 - virémie BK-v indétectable pendant au moins 12 mois ;
- un groupe avec virémie BK-v isolée
 - virémie BK-v > 200 copies/ml depuis au moins 6 mois
 - en l'absence de diagnostic de Nx BK-v à la biopsie de greffon rénal ;
- un groupe avec Nx BK-v
 - diagnostic de Nx BK-v sur la biopsie de greffon rénal
 - en présence d'une virémie BK-v > 200 copies/ml.

Notre étude comporte un versant clinique (recueil exhaustif de données clinico-biologiques sur un suivi prospectif de 36 mois) ainsi qu'un versant immunologique (étude des cellules mononuclées du sang total (PBMC) sur prélèvement de sang périphérique).

Concernant la partie clinique de l'étude, nous avons recueillis les données clinico-biologiques suivantes sur une période prospective de 36 mois :

- Age, sexe, maladie rénale initiale, méthode et ancienneté de dialyse
- Caractéristiques de la transplantation rénale :
 - Ancienneté de la transplantation rénale,
 - Type de donneur,
 - Rang de la transplantation (1ère greffe ou 2ème/3ème/... greffe),

- Patient hyperimmunisé ou non,
- Rejet de greffe
- Durée de répllication (exprimée en mois) et charges virales BK-v médianes sanguines et urinaires (évaluées par PCR BK-v et exprimés en copies/mL)
- Estimation du Débit de Filtration Glomérulaire (selon la formule MDRD) à 1 mois et 6 mois post-greffe, au diagnostic de Nx BK-v ou à 12 mois post-greffe, puis en fin de suivi
- Traitement immunosuppresseur :
 - Traitement d'induction et traitement d'entretien
 - Taux résiduel d'immunosuppresseurs (dosage résiduel des anticalcineurines et/ou des inhibiteurs de la voie mTor et/ou AUC des antimétabolites) au diagnostic de Nx BK-v ou à 12 mois post-transplantation
- Modification du traitement immunosuppresseur faisant suite au diagnostic de Nx BK-v.

Concernant la partie immunologique de l'étude, nous avons caractérisé le phénotype et la fonctionnalité des LT spécifiques du BK-v en fonction des différents niveaux de réactivation BK-v. Nous avons prélevé, à l'inclusion des patients, 30 ml de sang total sur un prélèvement sanguin unique (3 tubes héparinates de lithium de 10ml). Ces prélèvements sont effectués lors des bilans biologiques réalisés pour le suivi habituel des patients. Dans les groupes avec virurie, virémie et Nx BK-v, nous réalisons également un suivi longitudinal avec la réalisation d'un nouveau prélèvement à 12 et 24 mois de l'inclusion afin d'évaluer le profil évolutif des LT spécifiques du BK-v. A ce jour, l'ensemble des prélèvements à l'inclusion des patients ont été analysés, les suivis à 12 et 24 mois post-inclusion étant actuellement cryopréservés.

Les PBMC sont isolées par gradient de FICOLL, congelées puis conservées à -150°C. A partir de 30 ml de sang total, nous isolons en moyenne 18 millions de PBMC et effectuons la cryopréservation de 2 ampoules de 9 millions de PBMC. Ceci témoigne de la lymphopénie relative de nos patients (0,6 millions de PBMC/ml de sang total). Du sérum est également conservé à -80°C. La cryoconservation à -150°C des échantillons biologiques est réalisée au sein de l'unité. Afin de s'assurer de la bonne viabilité et de la préservation de la fonctionnalité lymphocytaire après décongélation, la cryopréservation des échantillons biologiques est réalisée selon les recommandations communément admises en immunologie cellulaire (Angel et al. 2016). La température est contrôlée de façon constante, permettant ainsi d'éviter des variations de température. Les échantillons biologiques sont conservés pendant une durée moyenne inférieure à 36 mois. Il est important de noter que les LT CD8 sont décrits pour être plus résistants à la congélation que les LT CD4 (Ford et al. 2017). Nos résultats illustrent la bonne préservation de la fonctionnalité lymphocytaire lors de nos expériences.

Afin de caractériser la réponse lymphocytaire T mémoire spécifique du BK-v en post-transplantation rénale, nous avons caractérisé la fonctionnalité des LT mémoires spécifiques du BK-v en fonction des différents niveaux de réactivation BK-v. Toutes les analyses de fonctionnalité lymphocytaires ont été faites sur PBMC décongelées pour des raisons pratiques, l'ensemble des expériences cellulaires nécessitant plusieurs jours.

Nous avons ainsi réalisé une activation spécifique de l'immunité cellulaire du BK-v par la mise en culture des PBMC avec un pool de peptides chevauchants recouvrant les protéines VP1 et LT-Ag du BK-v, à la concentration finale de 1µg/ml par peptide (PepTivator BKV, société Miltenyi®). Ces pools de peptides activent les LT CD4 et CD8 et couvrent les 2 cycles de réplication du BK-v. Nous avons également évalué la réponse anti-virale globale après stimulation par un pool de peptides couvrant les virus Cytomégalovirus, Epstein-Barr et Influenza (CEF peptide pool de Axxora®, référence PT-PA-CEF-002).

Après stimulation lymphocytaire, nous avons évalué le phénotype et la fonctionnalité des LT par cytométrie de flux en termes de :

- Sécrétions cytokiniques :

- Incubation pendant 8 à 10h de 4 millions de PBMC (800.000 PBMC/condition) en présence de peptides spécifiques du BK-v et de Bréfeldine A,
- Suivi de l'étude des capacités de sécrétions d'IL2, d'IFN- γ et de TNF- α .

- Prolifération lymphocytaire :

- Mise en culture pendant 5 jours de 2 millions de PBMC marquées CFSE (400.000 PBMC/condition) en présence de peptides spécifiques du BKv,
- Suivi de l'étude des capacités de prolifération par visualisation de la dilution du CFSE.

- Cytotoxicité T CD8 directe :

- Obtention de cellules cibles autologues à partir de PBMC déplétées en LT CD8, marquées CFSE et incubées pendant 2h en présence ou non des peptides spécifiques du BK-v,
- Mise en co-culture pendant 8 à 10h de 4 millions de PBMC (800.000 PBMC/condition) avec les cellules cibles autologues. Un ratio de 3 à 5 LT CD8 pour 1 cellule cible a été défini comme le plus optimal pour évaluer la cytotoxicité T CD8,
- Suivi de l'étude de la mortalité des cellules cibles autologues par l'expression de 7AAD

- Caractérisation de l'épuisement des LT spécifiques du BK-v :

- Phénotypage lymphocytaire sur la base des marqueurs de surface

CD3, CD4, CD8, CD27, CCR7, CD45RA, CD45RO et CD95,

- Étude spécifique de l'épuisement lymphocytaire par l'expression des récepteurs inhibiteurs CTLA-4 et PD-1.

Tous les tests de fonctionnalité lymphocytaire ont été comparés à des contrôles négatifs (réalisation des expériences selon les mêmes conditions expérimentales mais en l'absence des peptides spécifiques du BK-v). L'ensemble des acquisitions en cytométrie de flux ont été faites sur un cytomètre 18 couleurs (BD LSR Fortessa™) et les analyses ont été faites sur le logiciel d'analyse spécifique FlowJo.

La **Figure 29** ci-dessous est un exemple de protocole d'évaluation de la réponse lymphocytaire T spécifique du BK-v, via l'analyse des capacités de prolifération lymphocytaire. La proportion des LT spécifiques du BK-v ayant activement proliférés (proportion de LT CFSE^{low}) est mesurée en soustrayant la proportion de LT CFSE^{low} mesurée en absence de stimulation peptidique à la proportion de LT CFSE^{low} mesurée en présence des peptides du BK-v.

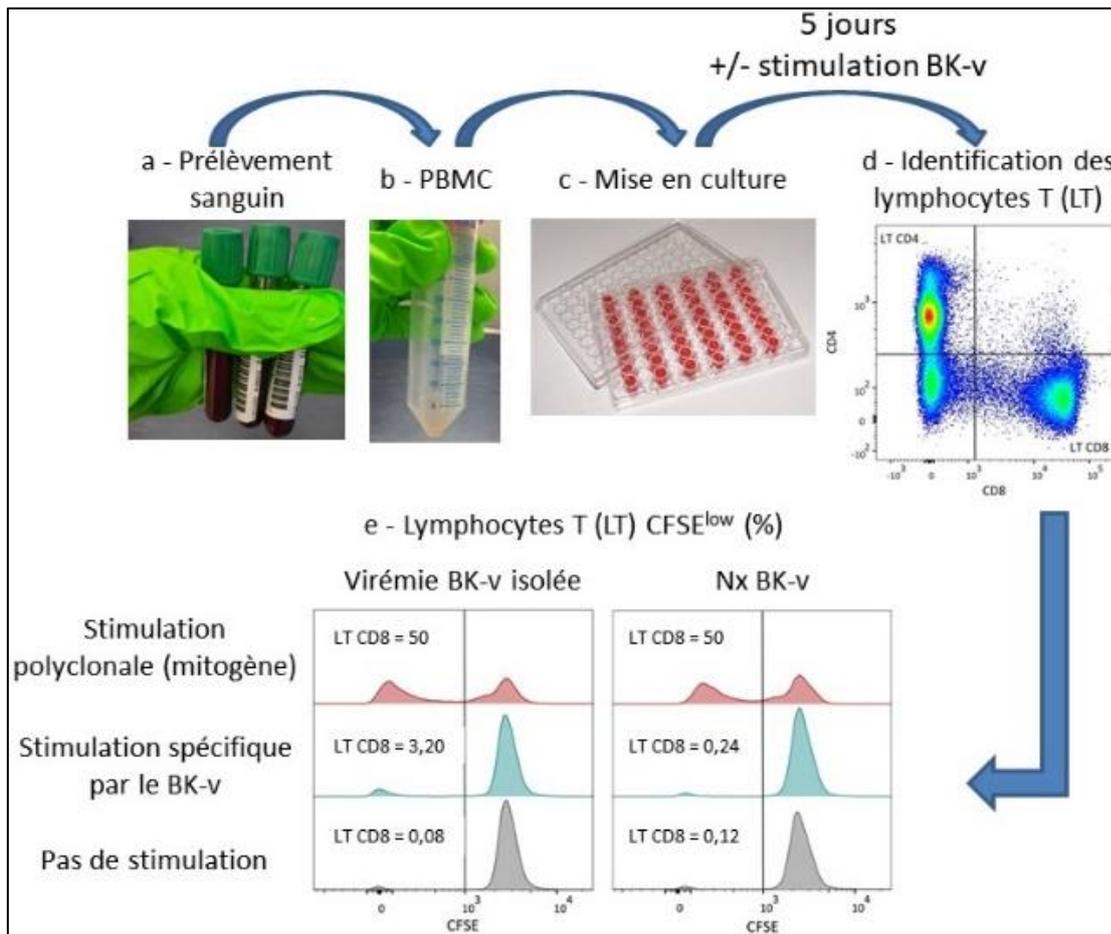


Figure 29 : Protocole expérimental d'évaluation de la fonctionnalité lymphocytaire des LT spécifiques du BK-v (ici, évaluation par prolifération lymphocytaire)

BIBLIOGRAPHIE

- Aalderen, Michiel C. van, Ester B. M. Remmerswaal, Kirstin M. Heutinck, Anja ten Brinke, Hanspeter Pircher, René A. W. van Lier, et Ineke J. M. ten Berge. 2013. « Phenotypic and Functional Characterization of Circulating Polyomavirus BK VP1-Specific CD8+ T Cells in Healthy Adults ». *Journal of Virology* 87 (18): 10263-72. <https://doi.org/10.1128/JVI.01540-13>.
- Aalderen, Michiel C. van, Ester B. M. Remmerswaal, Niels J. M. Verstegen, Pleun Hombrink, Anja ten Brinke, Hanspeter Pircher, Neeltje A. Kootstra, Ineke J. M. ten Berge, et René A. W. van Lier. 2015. « Infection History Determines the Differentiation State of Human CD8+ T Cells ». *Journal of Virology* 89 (9): 5110-23. <https://doi.org/10.1128/JVI.03478-14>.
- Abboud, Georges, Jessica Stanfield, Vikas Tahiliani, Pritesh Desai, Tarun E. Hutchinson, Kyle J. Lorentsen, Jonathan J. Cho, Dorina Avram, et Shahram Salek-Ardakani. 2016. « Transcription Factor Bcl11b Controls Effector and Memory CD8 T Cell Fate Decision and Function during Poxvirus Infection ». *Frontiers in Immunology* 7: 425. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00425>.
- Agence de la Biomédecine. 2017. « Rapport Annuel REIN (Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie) 2015 ». 2017. <https://www.agence-biomedecine.fr>.
- Agence de la Biomédecine (ABM). 2017. « Le rapport médical et scientifique du prélèvement et de la greffe en France en 2015 ». <https://www.agence-biomedecine.fr>.
- Agostini, H. T., C. F. Ryschkewitsch, E. J. Singer, et G. L. Stoner. 1997. « JC Virus Regulatory Region Rearrangements and Genotypes in Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: Two Independent Aspects of Virus Variation ». *The Journal of General Virology* 78 (Pt 3) (mars): 659-64. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-3-659>.
- Ahmed, Rafi, Michael J. Bevan, Steven L. Reiner, et Douglas T. Fearon. 2009. « The Precursors of Memory: Models and Controversies ». *Nature Reviews. Immunology* 9 (9): 662-68. <https://doi.org/10.1038/nri2619>.
- Ajuh, Elvis T., Zongsong Wu, Emma Kraus, Fabian H. Weissbach, Tobias Bethge, Rainer Gosert, Nicole Fischer, et Hans H. Hirsch. 2018. « Novel Human Polyomavirus Noncoding Control Regions Differ in Bidirectional Gene Expression According to Host Cell, Large T-Antigen Expression, and Clinically Occurring Rearrangements ». *Journal of Virology* 92 (7). <https://doi.org/10.1128/JVI.02231-17>.
- Albrecht, J. A., Y. Dong, J. Wang, C. Breeden, A. B. Farris, A. E. Lukacher, et K. A. Newell. 2012. « Adaptive Immunity Rather than Viral Cytopathology Mediates Polyomavirus-Associated Nephropathy in Mice ». *American Journal of Transplantation* 12 (6): 1419-28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04005.x>.
- Allison, Anthony C., et Elsie M. Eugui. 2005. « Mechanisms of Action of Mycophenolate Mofetil in Preventing Acute and Chronic Allograft Rejection ». *Transplantation* 80: S181-190.
- Ambalathingal, George R., Ross S. Francis, Mark J. Smyth, Corey Smith, et Rajiv Khanna. 2017. « BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies ». *Clinical Microbiology Reviews* 30 (2): 503-28. <https://doi.org/10.1128/CMR.00074-16>.
- Angel, Stephanie, Hagen von Briesen, Young-Joo Oh, Marko K. Baller, Heiko Zimmermann, et Anja Germann. 2016. « Toward Optimal Cryopreservation and Storage for Achievement of High Cell Recovery and Maintenance of Cell Viability and T Cell Functionality ». *Biopreservation and Biobanking* 14 (6): 539-47. <https://doi.org/10.1089/bio.2016.0046>.

- Antony, Paul A., Chrystal M. Paulos, Mojgan Ahmadzadeh, Akgül Akpinarli, Douglas C. Palmer, Noriko Sato, Andrew Kaiser, et al. 2006. « Interleukin-2-Dependent Mechanisms of Tolerance and Immunity in Vivo ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176 (9): 5255-66.
- Appay, Victor, Rene A W van Lier, Federica Sallusto, et Mario Roederer. 2008. « Phenotype and Function of Human T Lymphocyte Subsets: Consensus and Issues ». *Cytometry A* 73 (novembre): 975-83. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20643>.
- Arakaki, Rieko, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, Yoshio Hayashi, et Naozumi Ishimaru. 2014. « Mechanism of Activation-Induced Cell Death of T Cells and Regulation of FasL Expression ». *Critical Reviews in Immunology* 34 (4): 301-14.
- Araki, Koichi, Ben Youngblood, et Rafi Ahmed. 2010. « The Role of MTOR in Memory CD8+ T-Cell Differentiation ». *Immunological Reviews* 235 (1): 234. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00898.x>.
- Arens, Ramon, et Stephen P. Schoenberger. 2010. « Plasticity in Programming of Effector and Memory CD8 T-Cell Formation ». *Immunological Reviews* 235 (1): 190-205. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00899.x>.
- Arsenio, Janilyn, Patrick J. Metz, et John T. Chang. 2015. « Asymmetric Cell Division in T Lymphocyte Fate Diversification ». *Trends in Immunology* 36 (11): 670-83. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.09.004>.
- Atencio, I A, F F Shadan, X J Zhou, N D Vaziri, et L P Villarreal. 1993. « Adult Mouse Kidneys Become Permissive to Acute Polyomavirus Infection and Reactivate Persistent Infections in Response to Cellular Damage and Regeneration ». *Journal of Virology* 67 (mars): 1424-32.
- Awadalla, Yehia, Parmjeet Randhawa, Kris Ruppert, Adriana Zeevi, et Rene J. Duquesnoy. 2004. « HLA Mismatching Increases the Risk of BK Virus Nephropathy in Renal Transplant Recipients ». *American Journal of Transplantation* 4 (10): 1691-96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00563.x>.
- Baaten, Bas J. G., Cheng-Rui Li, Mia F. Deiro, Melissa M. Lin, Phyllis J. Linton, et Linda M. Bradley. 2010. « CD44 Regulates Survival and Memory Development in Th1 Cells ». *Immunity* 32 (1): 104-15. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.10.011>.
- Babel, Nina, Hans-Dieter Volk, et Petra Reinke. 2011. « BK Polyomavirus Infection and Nephropathy: The Virus-Immune System Interplay ». *Nature Reviews. Nephrology* 7 (7): 399-406. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.59>.
- Baker, R. J., M. P. Hernandez-Fuentes, P. A. Brookes, A. N. Chaudhry, H. T. Cook, et R. I. Lechler. 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.
- Balfour, Henry H., Samantha K. Dunmire, et Kristin A. Hogquist. 2015. « Infectious Mononucleosis ». *Clinical & Translational Immunology* 4 (2): e33. <https://doi.org/10.1038/cti.2015.1>.
- Bamoulid, Jamal, Thomas Crépin, Cécile Courivaud, Jean-Michel Rebibou, Philippe Saas, et Didier Ducloux. 2017. « Antithymocyte Globulins in Renal Transplantation-from Lymphocyte Depletion to Lymphocyte Activation: The Doubled-Edged Sword ». *Transplantation Reviews (Orlando, Fla.)* 31 (3): 180-87. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2017.02.004>.

- Banerjee, Arnob, Scott M. Gordon, Andrew M. Intlekofer, Michael A. Paley, Erin C. Mooney, Tullia Lindsten, E. John Wherry, et Steven L. Reiner. 2010. « Cutting Edge: The Transcription Factor Eomesodermin Enables CD8⁺ T Cells to Compete for the Memory Cell Niche ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (9): 4988-92. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002042>.
- Bannard, Oliver, Matthew Kraman, et Douglas T. Fearon. 2009. « Secondary Replicative Function of CD8⁺ T Cells That Had Developed an Effector Phenotype ». *Science (New York, N.Y.)* 323 (5913): 505-9. <https://doi.org/10.1126/science.1166831>.
- Barber, Daniel L., E. John Wherry, David Masopust, Baogong Zhu, James P. Allison, Arlene H. Sharpe, Gordon J. Freeman, et Rafi Ahmed. 2006. « Restoring Function in Exhausted CD8 T Cells during Chronic Viral Infection ». *Nature* 439 (7077): 682-87. <https://doi.org/10.1038/nature04444>.
- Barracough, Katherine A., Nicole M. Isbel, Christine E. Staats, et David W. Johnson. 2011. « BK Virus in Kidney Transplant Recipients: The Influence of Immunosuppression ». *Journal of Transplantation* 2011: 750836. <https://doi.org/10.1155/2011/750836>.
- Batal, Ibrahim, Adriana Zeevi, Amer Heider, Alin Girnita, Amit Basu, Henkie Tan, Ron Shapiro, et Parmjeet Randhawa. 2008. « Measurements of Global Cell-Mediated Immunity in Renal Transplant Recipients with BK Virus Reactivation ». *American Journal of Clinical Pathology* 129 (4): 587-91. <https://doi.org/10.1309/23YGPB1E758ECCFP>.
- Bate, Sheri Lewis, Sheila C Dollard, et Michael J Cannon. 2010. « Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988-2004 ». *Clinical Infectious Diseases* 50 (juin): 1439-47. <https://doi.org/10.1086/652438>.
- Behr, Felix M., Ammarina Chuwonpad, Regina Stark, et Klaas P. J. M. van Gisbergen. 2018. « Armed and Ready: Transcriptional Regulation of Tissue-Resident Memory CD8 T Cells ». *Frontiers in Immunology* 9: 1770. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01770>.
- Bekker, L. G., S. Freeman, P. J. Murray, B. Ryffel, et G. Kaplan. 2001. « TNF-Alpha Controls Intracellular Mycobacterial Growth by Both Inducible Nitric Oxide Synthase-Dependent and Inducible Nitric Oxide Synthase-Independent Pathways ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166 (11): 6728-34.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, R. A. Flavell, J. F. Miller, et W. R. Heath. 1998. « Help for Cytotoxic-T-Cell Responses Is Mediated by CD40 Signalling ». *Nature* 393 (6684): 478-80. <https://doi.org/10.1038/30996>.
- Berg, Pablo J E J van de, Amber van Stijn, Ineke J M Ten Berge, et René A W van Lier. 2008. « A fingerprint left by cytomegalovirus infection in the human T cell compartment ». *Journal of Clinical Virology* 41 (mars): 213-17. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.10.016>.
- Berger, Joseph R., et Robert J. Fox. 2016. « Reassessing the Risk of Natalizumab-Associated PML ». *Journal of Neurovirology* 22 (4): 533-35. <https://doi.org/10.1007/s13365-016-0427-6>.
- Betjes, Michiel G. H. 2013. « Immune Cell Dysfunction and Inflammation in End-Stage Renal Disease ». *Nature Reviews. Nephrology* 9 (mai): 255-65. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.44>.
- Betjes, Michiel G H, Martin Huisman, Willem Weimar, et Nicolle H R Litjens. 2008. « Expansion of cytolytic CD4⁺CD28⁻ T cells in end-stage renal disease ». *Kidney International* 74: 760-67. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.301>.

- Betjes, Michiel G H, Anton W Langerak, Ashley van der Spek, Elly A de Wit, et Nicolle H R Litjens. 2011. « Premature aging of circulating T cells in patients with end-stage renal disease ». *Kidney International* 80: 208-17. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.110>.
- Beura, L. K., P. C. Rosato, et D. Masopust. 2017. « Implications of Resident Memory T Cells for Transplantation ». *American Journal of Transplantation* 17 (5): 1167-75. <https://doi.org/10.1111/ajt.14101>.
- Bhattacharjee, Soumen, et Sutanuka Chattaraj. 2017. « Entry, Infection, Replication, and Egress of Human Polyomaviruses: An Update ». *Canadian Journal of Microbiology* 63 (3): 193-211. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0519>.
- Bialasiewicz, Seweryn, David M. Whiley, Stephen B. Lambert, Michael D. Nissen, et Theo P. Sloots. 2009. « Detection of BK, JC, WU, or KI Polyomaviruses in Faecal, Urine, Blood, Cerebrospinal Fluid and Respiratory Samples ». *Journal of Clinical Virology* 45 (3): 249-54. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.05.002>.
- Binggeli, S, A Egli, S Schaub, I Binet, M Mayr, J Steiger, et H H Hirsch. 2007. « Polyomavirus BK-Specific Cellular Immune Response to VP1 and Large T-Antigen in Kidney Transplant Recipients ». *American Journal of Transplantation* 7 (mai): 1131-39. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.01754.x>.
- Blackburn, Shawn D., Haina Shin, W. Nicholas Haining, Tao Zou, Creg J. Workman, Antonio Polley, Michael R. Betts, Gordon J. Freeman, Dario A. A. Vignali, et E. John Wherry. 2009. « Coregulation of CD8+ T Cell Exhaustion by Multiple Inhibitory Receptors during Chronic Viral Infection ». *Nature Immunology* 10 (1): 29-37. <https://doi.org/10.1038/ni.1679>.
- Blake, Stephen J., William C. Dougall, John J. Miles, Michele W. L. Teng, et Mark J. Smyth. 2016. « Molecular Pathways: Targeting CD96 and TIGIT for Cancer Immunotherapy ». *Clinical Cancer Research* 22 (21): 5183-88. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0933>.
- Blattman, Joseph N., Rustom Antia, David J. D. Sourdive, Xiaochi Wang, Susan M. Kaech, Kaja Murali-Krishna, John D. Altman, et Rafi Ahmed. 2002. « Estimating the Precursor Frequency of Naive Antigen-Specific CD8 T Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 195 (5): 657-64.
- Bloomgren, Gary, Sandra Richman, Christophe Hotermans, Meena Subramanyam, Susan Goelz, Amy Natarajan, Sophia Lee, et al. 2012. « Risk of Natalizumab-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy ». *The New England Journal of Medicine* 366 (20): 1870-80. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal107829>.
- Blyth, Emily, Leighton Clancy, Renee Simms, Shivashni Gaundar, Philip O'Connell, Kenneth Micklethwaite, et David J Gottlieb. 2011. « BK Virus-Specific T Cells for Use in Cellular Therapy Show Specificity to Multiple Antigens and Polyfunctional Cytokine Responses ». *Transplantation* 92 (novembre): 1077-84. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31823328c0>.
- Bohl, Daniel L., Gregory A. Storch, Caroline Ryschkewitsch, Monique Gaudreault-Keener, Mark A. Schnitzler, Eugene O. Major, et Daniel C. Brennan. 2005. « Donor Origin of BK Virus in Renal Transplantation and Role of HLA C7 in Susceptibility to Sustained BK Viremia ». *American Journal of Transplantation* 5 (9): 2213-21. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01000.x>.

- Bourgeois, Christine, Benedita Rocha, et Corinne Tanchot. 2002. « A Role for CD40 Expression on CD8+ T Cells in the Generation of CD8+ T Cell Memory ». *Science (New York, N.Y.)* 297 (5589): 2060-63. <https://doi.org/10.1126/science.1072615>.
- Bour-Jordan, H el ene, et Jeffrey A. Blueston. 2002. « CD28 Function: A Balance of Costimulatory and Regulatory Signals ». *Journal of Clinical Immunology* 22 (1): 1-7.
- Bowman, Lyndsey J., Andrew J. Brueckner, et Christina T. Doligalski. 2018. « The Role of MTOR Inhibitors in the Management of Viral Infections: A Review of Current Literature ». *Transplantation* 102 (2S Suppl 1): S50-59. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001777>.
- Bradley, Linda M., Laura Haynes, et Susan L. Swain. 2005. « IL-7: Maintaining T-Cell Memory and Achieving Homeostasis ». *Trends in Immunology* 26 (3): 172-76. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.01.004>.
- Brennan, Daniel C., Irfan Agha, Daniel L. Bohl, Mark A. Schnitzler, Karen L. Hardinger, Mark Lockwood, Stephanie Torrence, et al. 2005. « Incidence of BK with Tacrolimus versus Cyclosporine and Impact of Preemptive Immunosuppression Reduction ». *American Journal of Transplantation* 5 (3): 582-94. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00742.x>.
- Brennan, Daniel C., John A. Daller, Kathleen D. Lake, Diane Cibrik, Domingo Del Castillo, et Thymoglobulin Induction Study Group. 2006. « Rabbit Antithymocyte Globulin versus Basiliximab in Renal Transplantation ». *The New England Journal of Medicine* 355 (19): 1967-77. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa060068>.
- Brew, Bruce J., Nicholas W. S. Davies, Paola Cinque, David B. Clifford, et Avindra Nath. 2010. « Progressive Multifocal Leukoencephalopathy and Other Forms of JC Virus Disease ». *Nature Reviews. Neurology* 6 (d ecembre): 667-79. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2010.164>.
- Briggs, J. D. 2001. « Causes of Death after Renal Transplantation ». *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 16 (8): 1545-49.
- Bromley, S. K., W. R. Burack, K. G. Johnson, K. Somersalo, T. N. Sims, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, et M. L. Dustin. 2001. « The Immunological Synapse ». *Annual Review of Immunology* 19: 375-96. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.375>.
- Brooks, David G., Dorian B. McGavern, et Michael B. A. Oldstone. 2006. « Reprogramming of Antiviral T Cells Prevents Inactivation and Restores T Cell Activity during Persistent Viral Infection ». *The Journal of Clinical Investigation* 116 (6): 1675-85. <https://doi.org/10.1172/JCI26856>.
- Brooks, David G., Matthew J. Trifilo, Kurt H. Edelmann, Luc Teyton, Dorian B. McGavern, et Michael B. A. Oldstone. 2006. « Interleukin-10 Determines Viral Clearance or Persistence in Vivo ». *Nature Medicine* 12 (11): 1301-9. <https://doi.org/10.1038/nm1492>.
- Brown, Ian E., Christian Blank, Justin Kline, Aalok K. Kacha, et Thomas F. Gajewski. 2006. « Homeostatic Proliferation as an Isolated Variable Reverses CD8+ T Cell Anergy and Promotes Tumor Rejection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (7): 4521-29.
- Caillard, S., F. X. Lamy, C. Quelen, J. Dantal, Y. Lebranchu, P. Lang, M. Velten, B. Moulin, et French Transplant Centers. 2012. « Epidemiology of Posttransplant Lymphoproliferative Disorders in Adult Kidney and Kidney Pancreas Recipients: Report of the French Registry and Analysis of Subgroups of Lymphomas ». *American Journal of Transplantation* 12 (3): 682-93. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03896.x>.

- Caillard, S., C. Lelong, F. Pessione, B. Moulin, et French PTLD Working Group. 2006. « Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders Occurring after Renal Transplantation in Adults: Report of 230 Cases from the French Registry ». *American Journal of Transplantation* 6 (11): 2735-42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01540.x>.
- Calabrese, Leonard H., Eamonn Molloy, et Joseph Berger. 2015. « Sorting out the Risks in Progressive Multifocal Leukoencephalopathy ». *Nature Reviews. Rheumatology* 11 (2): 119-23. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.167>.
- Call, Matthew E., Jason Pyrdol, Martin Wiedmann, et Kai W. Wucherpfennig. 2002. « The Organizing Principle in the Formation of the T Cell Receptor-CD3 Complex ». *Cell* 111 (7): 967-79.
- Campbell, Daniel J., et Eugene C. Butcher. 2002. « Rapid Acquisition of Tissue-Specific Homing Phenotypes by CD4(+) T Cells Activated in Cutaneous or Mucosal Lymphoid Tissues ». *The Journal of Experimental Medicine* 195 (1): 135-41.
- Campistol, Josep M., Josette Eris, Rainer Oberbauer, Peter Friend, Brian Hutchison, José M. Morales, Kerstin Claesson, et al. 2006. « Sirolimus Therapy after Early Cyclosporine Withdrawal Reduces the Risk for Cancer in Adult Renal Transplantation ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 17 (2): 581-89. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005090993>.
- Cannon, Michael J., D. Scott Schmid, et Terri B. Hyde. 2010. « Review of Cytomegalovirus Seroprevalence and Demographic Characteristics Associated with Infection ». *Reviews in Medical Virology* 20 (4): 202-13. <https://doi.org/10.1002/rmv.655>.
- Cárdenas Sierra, D., G. Vélez Colmenares, A. Orfao de Matos, S. Fiorentino Gómez, et S. M. Quijano Gómez. 2014. « Age-Associated Epstein-Barr Virus-Specific T Cell Responses in Seropositive Healthy Adults ». *Clinical and Experimental Immunology* 177 (1): 320-32. <https://doi.org/10.1111/cei.12337>.
- Chang, John T., Maria L. Ciocca, Ichiko Kinjyo, Vikram R. Palanivel, Courtney E. McClurkin, Caitlin S. Dejong, Erin C. Mooney, et al. 2011. « Asymmetric Proteasome Segregation as a Mechanism for Unequal Partitioning of the Transcription Factor T-Bet during T Lymphocyte Division ». *Immunity* 34 (4): 492-504. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.017>.
- Chang, John T., Vikram R. Palanivel, Ichiko Kinjyo, Felix Schambach, Andrew M. Intlekofer, Arnob Banerjee, Sarah A. Longworth, et al. 2007. « Asymmetric T Lymphocyte Division in the Initiation of Adaptive Immune Responses ». *Science (New York, N.Y.)* 315 (5819): 1687-91. <https://doi.org/10.1126/science.1139393>.
- Chang, John T., E. John Wherry, et Ananda W. Goldrath. 2014. « Molecular Regulation of Effector and Memory T Cell Differentiation ». *Nature Immunology* 15 (12): 1104. <https://doi.org/10.1038/ni.3031>.
- Chen, Lieping, et Dallas B. Flies. 2013. « Molecular Mechanisms of T Cell Co-Stimulation and Co-Inhibition ». *Nature Reviews. Immunology* 13 (4): 227-42. <https://doi.org/10.1038/nri3405>.
- Chen, Yiping, Jennifer Trofe, Jennifer Gordon, Renaud A. Du Pasquier, Prabir Roy-Chaudhury, Marcelo J. Kuroda, E. Steve Woodle, Kamel Khalili, et Igor J. Koralnik. 2006. « Interplay of Cellular and Humoral Immune Responses against BK Virus in Kidney Transplant Recipients with Polyomavirus Nephropathy ». *Journal of Virology* 80 (7): 3495-3505. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3495-3505.2006>.

- Chew, Glen M., Tsuyoshi Fujita, Gabriela M. Webb, Benjamin J. Burwitz, Helen L. Wu, Jason S. Reed, Katherine B. Hammond, et al. 2016. « TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection ». *PLoS Pathogens* 12 (1): e1005349. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005349>.
- Chiu, Yen-Ling, Kai-Hsiang Shu, Feng-Jung Yang, Tzu-Ying Chou, Ping-Min Chen, Fang-Yun Lay, Szu-Yu Pan, et al. 2018. « A Comprehensive Characterization of Aggravated Aging-Related Changes in T Lymphocytes and Monocytes in End-Stage Renal Disease: The IESRD Study ». *Immunity & Ageing: I & A* 15: 27. <https://doi.org/10.1186/s12979-018-0131-x>.
- Choi, Seeyoung, et Ronald H. Schwartz. 2007. « Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models ». *Seminars in Immunology*, Molecular Mechanisms Supporting Peripheral T cell Tolerance: Potential Therapeutic Approaches to Autoimmunity and Allograft Rejection, 19 (3): 140-52. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.02.005>.
- Chung, Byung Ha, Yu Ah Hong, Hyun Gyung Kim, In O. Sun, Sun Ryoung Choi, Hoon Suk Park, Sung Hak Lee, et al. 2012. « Clinical Usefulness of BK Virus Plasma Quantitative PCR to Prevent BK Virus Associated Nephropathy ». *Transplant International* 25 (6): 687-95. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2012.01480.x>.
- Clipstone, N. A., et G. R. Crabtree. 1993. « Calcineurin Is a Key Signaling Enzyme in T Lymphocyte Activation and the Target of the Immunosuppressive Drugs Cyclosporin A and FK506 ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 696 (novembre): 20-30.
- Cohen, J. I. 2000. « Epstein-Barr Virus Infection ». *The New England Journal of Medicine* 343 (7): 481-92. <https://doi.org/10.1056/NEJM200008173430707>.
- Comoli, Patrizia, Sabrina Basso, Alberta Azzi, Antonia Moretta, Riccardo De Santis, Francesco Del Galdo, Raffaele De Palma, et al. 2003. « Dendritic Cells Pulsed with Polyomavirus BK Antigen Induce Ex Vivo Polyoma BK Virus-Specific Cytotoxic T-Cell Lines in Seropositive Healthy Individuals and Renal Transplant Recipients ». *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 14 (12): 3197-3204.
- Comoli, Patrizia, Michela Cioni, Sabrina Basso, Chiara Gagliardone, Leonardo Potenza, Enrico Verrina, Mario Luppi, Marco Zecca, Gian Marco Ghiggeri, et Fabrizio Ginevri. 2013. « Immunity to Polyomavirus BK Infection: Immune Monitoring to Regulate the Balance between Risk of BKV Nephropathy and Induction of Alloimmunity ». *Clinical & Developmental Immunology* 2013: 256923. <https://doi.org/10.1155/2013/256923>.
- Comoli, Patrizia, Hans H Hirsch, et Fabrizio Ginevri. 2008. « Cellular Immune Responses to BK Virus ». *Current Opinion in Organ Transplantation* 13 (décembre): 569-74. <https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e3283186b93>.
- Cordoba, F., G. Wieczorek, M. Audet, L. Roth, M. A. Schneider, A. Kunkler, N. Stuber, et al. 2015. « A Novel, Blocking, Fc-Silent Anti-CD40 Monoclonal Antibody Prolongs Nonhuman Primate Renal Allograft Survival in the Absence of B Cell Depletion ». *American Journal of Transplantation* 15 (11): 2825-36. <https://doi.org/10.1111/ajt.13377>.
- Cornberg, Markus, Laurie L. Kenney, Alex T. Chen, Stephen N. Waggoner, Sung-Kwon Kim, Hans P. Dienes, Raymond M. Welsh, et Liisa K. Selin. 2013. « Clonal Exhaustion as a Mechanism to Protect against Severe Immunopathology and Death from an Overwhelming CD8 T Cell Response ». *Frontiers in Immunology* 4: 475. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00475>.

- Cornell, Lynn D., R. Neal Smith, et Robert B. Colvin. 2008. « Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection and Acceptance ». *Annual Review of Pathology* 3: 189-220. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151508>.
- Costa Del Amo, Pedro, Julio Lahoz-Beneytez, Lies Boelen, Raya Ahmed, Kelly L. Miners, Yan Zhang, Laureline Roger, et al. 2018. « Human TSCM Cell Dynamics in Vivo Are Compatible with Long-Lived Immunological Memory and Stemness ». *PLoS Biology* 16 (6): e2005523. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005523>.
- Crotty, Shane. 2011. « Follicular Helper CD4 T Cells (TFH) ». *Annual Review of Immunology* 29: 621-63. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101400>.
- Crotty, Shane, Robert J. Johnston, et Stephen P. Schoenberger. 2010. « Effectors and Memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B Lymphocyte Differentiation ». *Nature Immunology* 11 (2): 114-20. <https://doi.org/10.1038/ni.1837>.
- Crough, Tania, et Rajiv Khanna. 2009. « Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside ». *Clinical Microbiology Reviews* 22: 76-98. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-08>.
- Csoma, Eszter, Tamás Sápy, Beáta Mészáros, et Lajos Gergely. 2012. « Novel Human Polyomaviruses in Pregnancy: Higher Prevalence of BKPyV, but No WUPyV, KIPyV and HPyV9 ». *Journal of Clinical Virology* 55 (3): 262-65. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.07.009>.
- Cui, Weiguo, et Susan M. Kaech. 2010. « Generation of Effector CD8+ T Cells and Their Conversion to Memory T Cells ». *Immunological Reviews* 236 (juillet): 151-66. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00926.x>.
- Cui, Weiguo, Ying Liu, Jason S. Weinstein, Joseph Craft, et Susan M. Kaech. 2011. « An Interleukin-21-Interleukin-10-STAT3 Pathway Is Critical for Functional Maturation of Memory CD8+ T Cells ». *Immunity* 35 (5): 792-805. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.017>.
- Curtsinger, Julie M., Javier O. Valenzuela, Pujya Agarwal, Debra Lins, et Matthew F. Mescher. 2005. « Type I IFNs Provide a Third Signal to CD8 T Cells to Stimulate Clonal Expansion and Differentiation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (8): 4465-69.
- Cyster, Jason G., et Susan R. Schwab. 2012. « Sphingosine-1-Phosphate and Lymphocyte Egress from Lymphoid Organs ». *Annual Review of Immunology* 30: 69-94. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075011>.
- Dalianis, Tina, et Hans H Hirsch. 2013. « Human Polyomaviruses in Disease and Cancer ». *Virology* 437: 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.12.015>.
- De Vlaminck, I., K. K. Khush, C. Strehl, B. Kohli, H. Luikart, N. F. Neff, J. Okamoto, et al. 2013. « Temporal Response of the Human Virome to Immunosuppression and Antiviral Therapy ». *Cell* 155 (5): 1178-87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.034>.
- Delgoffe, Greg M., et Jonathan D. Powell. 2015. « Feeding an Army: The Metabolism of T Cells in Activation, Anergy, and Exhaustion ». *Molecular Immunology* 68 (décembre): 492-96. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.07.026>.
- Demey, Baptiste, Claire Tinez, Catherine François, François Helle, Gabriel Choukroun, Gilles Duverlie, Sandrine Castelain, et Etienne Brochot. 2018. « Risk Factors for BK Virus Viremia and Nephropathy after Kidney Transplantation: A Systematic Review ». *Journal of Clinical Virology* 109 (octobre): 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.10.002>.

- Dharmidharka, Vikas R., Wida S. Cherikh, et Kevin C. Abbott. 2009. « An OPTN Analysis of National Registry Data on Treatment of BK Virus Allograft Nephropathy in the United States ». *Transplantation* 87 (7): 1019-26. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31819cc383>.
- Dharmidharka, Vikas R., Angela C. Webster, Olivia M. Martinez, Jutta K. Preiksaitis, Veronique Leblond, et Sylvain Choquet. 2016. « Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders ». *Nature Reviews. Disease Primers* 2: 15088. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.88>.
- Domingo-Calap, Pilar, Benjamin Schubert, Mélanie Joly, Morgane Solis, Meiggie Untrau, Raphael Carapito, Philippe Georgel, et al. 2018. « An Unusually High Substitution Rate in Transplant-Associated BK Polyomavirus in Vivo Is Further Concentrated in HLA-C-Bound Viral Peptides ». *PLoS Pathogens* 14 (10): e1007368. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007368>.
- Dooms, Hans, Kristen Wolslegel, Patricia Lin, et Abul K. Abbas. 2007. « Interleukin-2 Enhances CD4+ T Cell Memory by Promoting the Generation of IL-7R Alpha-Expressing Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (3): 547-57. <https://doi.org/10.1084/jem.20062381>.
- Dorner, Brigitte G., Alexander Scheffold, Michael S. Rolph, Martin B. Huser, Stefan H. E. Kaufmann, Andreas Radbruch, Inge E. A. Flesch, et Richard A. Kroczeck. 2002. « MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/Lymphotactin Function Together with IFN-Gamma as Type 1 Cytokines ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (9): 6181-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.092141999>.
- Drachenberg, Cinthia B., John C. Papadimitriou, Dean Mann, Hans H. Hirsch, Ravinder Wali, et Emilio Ramos. 2005. « Negative Impact of Human Leukocyte Antigen Matching in the Outcome of Polyomavirus Nephropathy ». *Transplantation* 80 (2): 276-78.
- Du Pasquier, R. A., J. E. Schmitz, J. Jean-Jacques, Y. Zheng, J. Gordon, K. Khalili, N. L. Letvin, et I. J. Koralnik. 2004. « Detection of JC Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Healthy Individuals ». *Journal of Virology* 78 (18): 10206-10. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.18.10206-10210.2004>.
- Du Pasquier, Renaud A., Marcelo J. Kuroda, Yue Zheng, Jims Jean-Jacques, Norman L. Letvin, et Igor J. Koralnik. 2004. « A Prospective Study Demonstrates an Association between JC Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes and the Early Control of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy ». *Brain: A Journal of Neurology* 127 (Pt 9): 1970-78. <https://doi.org/10.1093/brain/awh215>.
- Ducloux, Didier, Cécile Courivaud, Jamal Bamoulid, Bérengère Vivet, Aline Chabroux, Marina Deschamps, Jean-Michel Rebibou, et al. 2010. « Prolonged CD4 T Cell Lymphopenia Increases Morbidity and Mortality after Renal Transplantation ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 21 (5): 868-75. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009090976>.
- Dustin, Michael L., et David Depoil. 2011. « New Insights into the T Cell Synapse from Single Molecule Techniques ». *Nature Reviews. Immunology* 11 (10): 672-84. <https://doi.org/10.1038/nri3066>.
- Dustin, Michael L., et Eric O. Long. 2010. « Cytotoxic Immunological Synapses ». *Immunological Reviews* 235 (1): 24-34. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00904.x>.
- Egli, Adrian, Laura Infanti, Alexis Dumoulin, Andreas Buser, Jacqueline Samaridis, Christine Stebler, Rainer Gosert, et Hans H Hirsch. 2009. « Prevalence of Polyomavirus BK and JC

- Infection and Replication in 400 Healthy Blood Donors ». *The Journal of Infectious Diseases* 199: 837-46.
- Egli, Adrian, Sabrina Köhli, Michael Dickenmann, et Hans H. Hirsch. 2009. « Inhibition of Polyomavirus BK-Specific T-Cell Responses by Immunosuppressive Drugs ». *Transplantation* 88 (10): 1161-68. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181bca422>.
- Ejrnaes, Mette, Christophe M. Filippi, Marianne M. Martinic, Eleanor M. Ling, Lisa M. Togher, Shane Crotty, et Matthias G. von Herrath. 2006. « Resolution of a Chronic Viral Infection after Interleukin-10 Receptor Blockade ». *The Journal of Experimental Medicine* 203 (11): 2461-72. <https://doi.org/10.1084/jem.20061462>.
- Espinosa, Jaclyn R., Kannan P. Samy, et Allan D. Kirk. 2016. « Memory T Cells in Organ Transplantation: Progress and Challenges ». *Nature Reviews. Nephrology* 12 (6): 339-47. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.9>.
- Eurotransplant International Foundation. 2016. « Annual Report 2015 ». https://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=AR_ET_2015.pdf.
- Everly, M., R. Townsend, H. Gebel, et R. Bray. 2017. « Reduced Conversion from IgM Anti-HLA-DSA to IgG Anti-HLA-DSA in Belatacept-Treated vs. Cyclosporine-Treated Patients in BENEFIT and BENEFIT-EXT Trials. » *American Journal of Transplantation* 17 (Suppl 3: ATC 2017 Oral Abstract# 167): 205-410. <https://doi.org/10.1111/ajt.14305>.
- Fang, Difeng, et Jinfang Zhu. 2017. « Dynamic Balance between Master Transcription Factors Determines the Fates and Functions of CD4 T Cell and Innate Lymphoid Cell Subsets ». *The Journal of Experimental Medicine* 214 (7): 1861-76. <https://doi.org/10.1084/jem.20170494>.
- Fathman, C. Garrison, et Neil B. Lineberry. 2007. « Molecular Mechanisms of CD4+ T-Cell Anergy ». *Nature Reviews. Immunology* 7 (août): 599-609. <https://doi.org/10.1038/nri2131>.
- Fearon, Douglas T. 2007. « The Expansion and Maintenance of Antigen-Selected CD8(+) T Cell Clones ». *Advances in Immunology* 96: 103-39. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(07\)96003-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(07)96003-4).
- Feng, Huichen, Masahiro Shuda, Yuan Chang, et Patrick S. Moore. 2008. « Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma ». *Science (New York, N.Y.)* 319 (5866): 1096-1100. <https://doi.org/10.1126/science.1152586>.
- Fishman, J. A. 2013. « Overview: Cytomegalovirus and the Herpesviruses in Transplantation ». *American Journal of Transplantation* 13 Suppl 3 (février): 1-8; quiz 8. <https://doi.org/10.1111/ajt.12002>.
- Fishman, JA. 2007. « Infection in Solid-Organ Transplant Recipients ». *The New England Journal of Medicine* 357: 2601-14. <https://doi.org/10.1056/NEJMra064928>.
- Ford, Tom, Claire Wenden, Alison Mbekeani, Len Dally, Josephine H. Cox, Merribeth Morin, Nicola Winstone, Adrian V. S. Hill, Jill Gilmour, et Katie J. Ewer. 2017. « Cryopreservation-Related Loss of Antigen-Specific IFN γ Producing CD4+ T-Cells Can Skew Immunogenicity Data in Vaccine Trials: Lessons from a Malaria Vaccine Trial Substudy ». *Vaccine* 35 (15): 1898-1906. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.02.038>.
- Fossiez, F., O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, J. J. Pin, et al. 1996. « T Cell Interleukin-17 Induces Stromal Cells to Produce Proinflammatory and Hematopoietic Cytokines ». *The Journal of Experimental Medicine* 183 (6): 2593-2603.

- Gabardi, Steven, Martha Pavlakis, Chen Tan, Jean Francis, Francesca Cardarelli, William Asch, Kenneth Bodziak, et al. 2018. «New England BK Consortium: Regional Survey of BK Screening and Management Protocols in Comparison to Published Consensus Guidelines ». *Transplant Infectious Disease*, septembre, e12985. <https://doi.org/10.1111/tid.12985>.
- Gaffen, S. L. 2001. « Signaling Domains of the Interleukin 2 Receptor ». *Cytokine* 14 (2): 63-77. <https://doi.org/10.1006/cyto.2001.0862>.
- Gallimore, A., A. Glithero, A. Godkin, A. C. Tissot, A. Plückthun, T. Elliott, H. Hengartner, et R. Zinkernagel. 1998. « Induction and Exhaustion of Lymphocytic Choriomeningitis Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Visualized Using Soluble Tetrameric Major Histocompatibility Complex Class I-Peptide Complexes ». *The Journal of Experimental Medicine* 187 (9): 1383-93.
- Gardner, S. D., A. M. Field, D. V. Coleman, et B. Hulme. 1971. « New Human Papovavirus (B.K.) Isolated from Urine after Renal Transplantation ». *Lancet (London, England)* 1 (7712): 1253-57.
- Garrod, Kym R., Hélène D. Moreau, Zacarias Garcia, Fabrice Lemaître, Isabelle Bouvier, Matthew L. Albert, et Philippe Bousso. 2012. « Dissecting T Cell Contraction in Vivo Using a Genetically Encoded Reporter of Apoptosis ». *Cell Reports* 2 (5): 1438-47. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.015>.
- Garvey, Lucy, Alan Winston, John Walsh, Frank Post, Kholoud Porter, Brian Gazzard, Martin Fisher, et al. 2011. « HIV-Associated Central Nervous System Diseases in the Recent Combination Antiretroviral Therapy Era ». *European Journal of Neurology* 18 (3): 527-34. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03291.x>.
- Gasnault, J., D. Costagliola, H. Hendel-Chavez, A. Dulioust, S. Pakianather, AA. Mazet, MG. de Goer de Herve, et al. 2011. « Improved Survival of HIV-1-Infected Patients with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Receiving Early 5-Drug Combination Antiretroviral Therapy ». *PloS One* 6: e20967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020967>.
- Gasnault, J., M. Kahraman, MG. de Goer de Herve, D. Durali, JF. Delfraissy, et Y. Taoufik. 2003. « Critical Role of JC Virus-Specific CD4 T-Cell Responses in Preventing Progressive Multifocal Leukoencephalopathy ». *AIDS* 17 (juillet): 1443-49. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000076268.76134.8e>.
- Gasnault, J, et Y Taoufik. 2006. « [New trends in progressive multifocal leukoencephalopathy] ». *Revue neurologique* 162 (janvier): 43-56.
- Gattinoni, Luca, Enrico Lugli, Yun Ji, Zoltan Pos, Chrystal M Paulos, Máire F Quigley, Jorge R Almeida, et al. 2011. « A Human Memory T Cell Subset with Stem Cell-like Properties ». *Nature Medicine* 17: 1290-97. <https://doi.org/10.1038/nm.2446>.
- Gebhardt, Thomas, Linda M. Wakim, Liv Eidsmo, Patrick C. Reading, William R. Heath, et Francis R. Carbone. 2009. « Memory T Cells in Nonlymphoid Tissue That Provide Enhanced Local Immunity during Infection with Herpes Simplex Virus ». *Nature Immunology* 10 (5): 524-30. <https://doi.org/10.1038/ni.1718>.
- Geginat, Jens, Antonio Lanzavecchia, et Federica Sallusto. 2003. « Proliferation and Differentiation Potential of Human CD8+ Memory T-Cell Subsets in Response to Antigen or Homeostatic Cytokines ». *Blood* 101 (11): 4260-66. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3577>.

- Gerdemann, Ulrike, Usha L. Katari, Anastasia Papadopoulou, Jacqueline M. Keirnan, John A. Craddock, Hao Liu, Caridad A. Martinez, et al. 2013. « Safety and Clinical Efficacy of Rapidly-Generated Trivirus-Directed T Cells as Treatment for Adenovirus, EBV, and CMV Infections after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant ». *Molecular Therapy* 21 (11): 2113-21. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.151>.
- Gerlach, Carmen, Jeroen W. J. van Heijst, Erwin Swart, Daoud Sie, Nicola Armstrong, Ron M. Kerkhoven, Dietmar Zehn, Michael J. Bevan, Koen Schepers, et Ton N. M. Schumacher. 2010. « One Naive T Cell, Multiple Fates in CD8+ T Cell Differentiation ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (6): 1235-46. <https://doi.org/10.1084/jem.20091175>.
- Gjoerup, Ole, et Yuan Chang. 2010. « Update on Human Polyomaviruses and Cancer ». *Advances in Cancer Research* 106: 1-51. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(10\)06001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(10)06001-X).
- Global Observatory On Donation And Transplantation. 2017. « Organ Donation and Transplantation Activities : 2015 Report ». GODT. 2017. <http://www.transplant-observatory.org/>.
- Godinho Pinto, Gabriel, José Poloni, Liane Rotta, Raymund R. Razonable, et Alessandro Pasqualotto. 2016. « Screening for BK virus nephropathy in kidney transplant recipients: comparison of diagnostic tests ». *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 38 (septembre). <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20160054>.
- Goër de Herve, M.G. de, Anne Cariou, Federico Simonetta, et Yassine Taoufik. 2008. « Heterospecific CD4 Help to Rescue CD8 T Cell Killers ». *Journal of Immunology* 181 (novembre): 5974-80.
- Goër de Herve, M.G. de, Bamory Dembele, Méliッサ Vallée, Florence Herr, Anne Cariou, et Yassine Taoufik. 2010. « Direct CD4 Help Provision Following Interaction of Memory CD4 and CD8 T Cells with Distinct Antigen-Presenting Dendritic Cells ». *Journal of Immunology* 185 (juillet). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904209>.
- Goër de Herve, M.G. de, S Jaafoura, M Vallée, et Y Taoufik. 2012. « FoxP3⁺ Regulatory CD4 T Cells Control the Generation of Functional CD8 Memory ». *Nature Communications* 3: 986. <https://doi.org/10.1038/ncomms1992>.
- Gosert, Rainer, Piotr Kardas, Eugene O. Major, et Hans H. Hirsch. 2010. « Rearranged JC Virus Noncoding Control Regions Found in Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Patient Samples Increase Virus Early Gene Expression and Replication Rate ». *Journal of Virology* 84 (20): 10448-56. <https://doi.org/10.1128/JVI.00614-10>.
- Gosert, Rainer, Christine H. Rinaldo, Georg A. Funk, Adrian Egli, Emilio Ramos, Cinthia B. Drachenberg, et Hans H. Hirsch. 2008. « Polyomavirus BK with Rearranged Noncoding Control Region Emerge in Vivo in Renal Transplant Patients and Increase Viral Replication and Cytopathology ». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (4): 841-52. <https://doi.org/10.1084/jem.20072097>.
- Gossai, Anala, Tim Waterboer, Heather H. Nelson, Angelika Michel, Martina Willhauck-Fleckenstein, Shohreh F. Farzan, Anne G. Hoen, et al. 2016. « Seroepidemiology of Human Polyomaviruses in a US Population ». *American Journal of Epidemiology* 183 (1): 61-69. <https://doi.org/10.1093/aje/kwv155>.
- Goudy, Kevin S., Mark C. Johnson, Alaina Garland, Chengwen Li, Richard J. Samulski, Bo Wang, et Roland Tisch. 2011. « Reduced IL-2 Expression in NOD Mice Leads to a Temporal

- Increase in CD62Llo FoxP3+ CD4+ T Cells with Limited Suppressor Activity ». *European Journal of Immunology* 41 (5): 1480-90. <https://doi.org/10.1002/eji.201040890>.
- Goulding, John, Georges Abboud, Vikas Tahiliani, Pritesh Desai, Tarun E. Hutchinson, et Shahram Salek-Ardakani. 2014. « CD8 T Cells Use IFN- γ to Protect against the Lethal Effects of a Respiratory Poxvirus Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (11): 5415-25. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400256>.
- Green, M., et M. G. Michaels. 2013. « Epstein-Barr Virus Infection and Posttransplant Lymphoproliferative Disorder ». *American Journal of Transplantation* 13 Suppl 3 (février): 41-54; quiz 54. <https://doi.org/10.1111/ajt.12004>.
- Groom, Joanna R., et Andrew D. Luster. 2011. « CXCR3 in T Cell Function ». *Experimental Cell Research* 317 (5): 620-31. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.12.017>.
- Gudmundsdottir, H., A. D. Wells, et L. A. Turka. 1999. « Dynamics and Requirements of T Cell Clonal Expansion in Vivo at the Single-Cell Level: Effector Function Is Linked to Proliferative Capacity ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162 (9): 5212-23.
- Gupta, Prakash K., Jernej Godec, David Wolski, Emily Adland, Kathleen Yates, Kristen E. Pauken, Cormac Cosgrove, et al. 2015. « CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8+ T Cells ». *PLoS Pathogens* 11 (10): e1005177. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005177>.
- Halle, Stephan, Olga Halle, et Reinhold Förster. 2017. « Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo ». *Trends in Immunology* 38 (6): 432-43. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.04.002>.
- Halloran, Philip F. 2004. « Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation ». *The New England Journal of Medicine* 351: 2715-29. <https://doi.org/10.1056/NEJMra033540>.
- Hammarlund, Erika, Matthew W. Lewis, Jon M. Hanifin, Motomi Mori, Caroline W. Koudelka, et Mark K. Slifka. 2010. « Antiviral Immunity Following Smallpox Virus Infection: A Case-Control Study ». *Journal of Virology* 84 (24): 12754-60. <https://doi.org/10.1128/JVI.01763-10>.
- Hammarlund, Erika, Matthew W. Lewis, Scott G. Hansen, Lisa I. Strelow, Jay A. Nelson, Gary J. Sexton, Jon M. Hanifin, et Mark K. Slifka. 2003. « Duration of Antiviral Immunity after Smallpox Vaccination ». *Nature Medicine* 9 (9): 1131-37. <https://doi.org/10.1038/nm917>.
- Han Lee, E D, C C Kembal, J Wang, Y Dong, D C Stapler Jr, K M Hamby, S Gangappa, et al. 2006. « A Mouse Model for Polyomavirus-Associated Nephropathy of Kidney Transplants ». *American Journal of Transplantation* 6 (mai): 913-22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01265.x>.
- Harari, Alexandre, Valérie Dutoit, Cristina Cellerai, Pierre-Alexandre Bart, Renaud A Du Pasquier, et Giuseppe Pantaleo. 2006. « Functional Signatures of Protective Antiviral T-Cell Immunity in Human Virus Infections ». *Immunological Reviews* 211 (juin): 236-54. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00395.x>.
- Harari, Alexandre, Florence Vallelian, Pascal R. Meylan, et Giuseppe Pantaleo. 2005. « Functional Heterogeneity of Memory CD4 T Cell Responses in Different Conditions of Antigen Exposure and Persistence ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (2): 1037-45.
- Harari, Alexandre, Simone C Zimmerli, et Giuseppe Pantaleo. 2004. « Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses ». *Human Immunology* 65 (mai): 500-506. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2004.02.012>.

- Harty, J. T., A. R. Tvinnereim, et D. W. White. 2000. « CD8+ T Cell Effector Mechanisms in Resistance to Infection ». *Annual Review of Immunology* 18: 275-308. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.275>.
- Harty, J.T., et V.P. Badovinac. 2008. « Shaping and Reshaping CD8+ T-Cell Memory ». *Nature Reviews. Immunology* 8 (2): 107-19. <https://doi.org/10.1038/nri2251>.
- Hässig, A., M. Roos, A. Etter, W. Bossart, N. Müller, M. Schiesser, R. P. Wüthrich, et T. Fehr. 2014. « Association of BK Viremia with Human Leukocyte Antigen Mismatches and Acute Rejection, but Not with Type of Calcineurin Inhibitor ». *Transplant Infectious Disease* 16 (1): 44-54. <https://doi.org/10.1111/tid.12153>.
- Hatzi, Katerina, J. Philip Nance, Mark A. Kroenke, Marcella Bothwell, Elias K. Haddad, Ari Melnick, et Shane Crotty. 2015. « BCL6 Orchestrates Tfh Cell Differentiation via Multiple Distinct Mechanisms ». *The Journal of Experimental Medicine* 212 (4): 539-53. <https://doi.org/10.1084/jem.20141380>.
- Haute Autorité de Santé (HAS). 2002. « Diagnostic de l'insuffisance rénale chronique chez l'adulte ». 2002. https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_272222/fr/diagnostic-de-l-insuffisance-renal-chronique-chez-l-adulte.
- Helanterä, I., T. Schachtner, C. Hinrichs, K. Salmela, L. Kyllönen, P. Koskinen, I. Lautenschlager, et P. Reinke. 2014. « Current Characteristics and Outcome of Cytomegalovirus Infections after Kidney Transplantation ». *Transplant Infectious Disease* 16 (4): 568-77. <https://doi.org/10.1111/tid.12247>.
- Helanterä, Ilkka, Kaija Salmela, Lauri Kyllönen, Anne Räisänen-Sokolowski, Eeva Auvinen, Laura Mannonen, Petri Koskinen, et Irmeli Lautenschlager. 2012. « BK Virus Viremia in a Well-HLA-Matched Kidney Transplant Population Mainly on Low-Dose Cyclosporine-Based Immunosuppression ». *Clinical Transplantation* 26 (6): E596-601. <https://doi.org/10.1111/ctr.12040>.
- Heller, Kevin N., Jenica Upshaw, Beza Seyoum, Henry Zebroski, et Christian Münz. 2007. « Distinct Memory CD4+ T-Cell Subsets Mediate Immune Recognition of Epstein Barr Virus Nuclear Antigen 1 in Healthy Virus Carriers ». *Blood* 109 (3): 1138-46. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-023663>.
- Herrera, Osquel Barroso, Dela Golshayan, Rebecca Tibbott, Francisco Salcido Ochoa, Martha J. James, Federica M. Marelli-Berg, et Robert I. Lechler. 2004. « A Novel Pathway of Alloantigen Presentation by Dendritic Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (8): 4828-37.
- Hess Michelini, Rodrigo, Andrew L. Doedens, Ananda W. Goldrath, et Stephen M. Hedrick. 2013. « Differentiation of CD8 Memory T Cells Depends on Foxo1 ». *The Journal of Experimental Medicine* 210 (6): 1189-1200. <https://doi.org/10.1084/jem.20130392>.
- Hildeman, David A., Yanan Zhu, Thomas C. Mitchell, John Kappler, et Philippa Marrack. 2002. « Molecular Mechanisms of Activated T Cell Death in Vivo ». *Current Opinion in Immunology* 14 (3): 354-59.
- Hirsch, HH., N. Babel, P. Comoli, V. Friman, F. Ginevri, A. Jardine, I. Lautenschlager, et al. 2014. « European Perspective on Human Polyomavirus Infection, Replication and Disease in Solid Organ Transplantation ». *Clinical Microbiology and Infection* 20: 74-88. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12538>.

- Hirsch, HH., Daniel C. Brennan, Cinthia B. Drachenberg, Fabrizio Ginevri, Jennifer Gordon, Ajit P. Limaye, Michael J. Mihatsch, et al. 2005. « Polyomavirus-Associated Nephropathy in Renal Transplantation: Interdisciplinary Analyses and Recommendations ». *Transplantation* 79 (10): 1277-86.
- Hirsch, HH., Wendy Knowles, Michael Dickenmann, Jakob Passweg, Thomas Klimkait, Michael J Mihatsch, et Jürg Steiger. 2002. « Prospective Study of Polyomavirus Type BK Replication and Nephropathy in Renal-Transplant Recipients ». *The New England Journal of Medicine* 347: 488-96. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020439>.
- Hirsch, HH., et Jürg Steiger. 2003. « Polyomavirus BK ». *The Lancet Infectious Diseases* 3: 611-23. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00770-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00770-9).
- Hirsch, HH., F Vincenti, S Friman, M Tuncer, F Citterio, A Wiecek, E H Scheuermann, et al. 2013. « Polyomavirus BK Replication in de Novo Kidney Transplant Patients Receiving Tacrolimus or Cyclosporine: A Prospective, Randomized, Multicenter Study ». *American Journal of Transplantation* 13: 136-45. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04320.x>.
- Hirsch, HH., K. Yakhontova, M. Lu, et J. Manzetti. 2016. « BK Polyomavirus Replication in Renal Tubular Epithelial Cells Is Inhibited by Sirolimus, but Activated by Tacrolimus Through a Pathway Involving FKBP-12 ». *American Journal of Transplantation* 16 (3): 821-32. <https://doi.org/10.1111/ajt.13541>.
- Hislop, Andrew D., Graham S. Taylor, Delphine Sauce, et Alan B. Rickinson. 2007. « Cellular Responses to Viral Infection in Humans: Lessons from Epstein-Barr Virus ». *Annual Review of Immunology* 25: 587-617. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141553>.
- Hodson, Elisabeth M., Maleeka Ladhani, Angela C. Webster, Giovanni F. M. Strippoli, et Jonathan C. Craig. 2013. « Antiviral Medications for Preventing Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients ». *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, n° 2 (février): CD003774. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003774.pub4>.
- Hogan, Patrick G., Lin Chen, Julie Nardone, et Anjana Rao. 2003. « Transcriptional Regulation by Calcium, Calcineurin, and NFAT ». *Genes & Development* 17 (18): 2205-32. <https://doi.org/10.1101/gad.1102703>.
- Honjo, Kazuhito, Xiao yan Xu, et R. Pat Bucy. 2004. « CD4+ T-Cell Receptor Transgenic T Cells Alone Can Reject Vascularized Heart Transplants through the Indirect Pathway of Alloantigen Recognition ». *Transplantation* 77 (3): 452-55. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000112937.12491.42>.
- Hornick, P. I., P. D. Mason, R. J. Baker, M. Hernandez-Fuentes, L. Frasca, G. Lombardi, K. Taylor, et al. 2000. « Significant Frequencies of T Cells with Indirect Anti-Donor Specificity in Heart Graft Recipients with Chronic Rejection ». *Circulation* 101 (20): 2405-10.
- Hsieh, Szu-Min, Sung-Ching Pan, Shey-Ying Chen, Pei-Fang Huang, et Shan-Chwen Chang. 2004. « Age Distribution for T Cell Reactivity to Vaccinia Virus in a Healthy Population ». *Clinical Infectious Diseases* 38 (1): 86-89. <https://doi.org/10.1086/380460>.
- Hwang, Il-Young, Chung Park, Kathleen Harrison, et John H. Kehrl. 2017. « Normal Thymocyte Egress, T Cell Trafficking, and CD4(+) T Cell Homeostasis Require Interactions between RGS Proteins and Gai2 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 198 (7): 2721-34. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601433>.

- Iborra, Salvador, María Martínez-López, Sofía C. Khouili, Michel Enamorado, Francisco J. Cueto, Ruth Conde-Garrosa, Carlos Del Fresno, et David Sancho. 2016. « Optimal Generation of Tissue-Resident but Not Circulating Memory T Cells during Viral Infection Requires Crosspriming by DNGR-1(+) Dendritic Cells ». *Immunity* 45 (4): 847-60. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.019>.
- Imlay, Hannah, Kathryn Whitaker, Cynthia E. Fisher, et Ajit P. Limaye. 2018. « Clinical Characteristics and Outcomes of Late-Onset BK Virus Nephropathy in Kidney and Kidney-Pancreas Transplant Recipients ». *Transplant Infectious Disease* 20 (4): e12928. <https://doi.org/10.1111/tid.12928>.
- Inghirami, G., F. Grignani, L. Sternas, L. Lombardi, D. M. Knowles, et R. Dalla-Favera. 1990. « Down-Regulation of LFA-1 Adhesion Receptors by C-Myc Oncogene in Human B Lymphoblastoid Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 250 (4981): 682-86.
- Irvine, Darrell J., Marco A. Purbhoo, Michelle Krogsgaard, et Mark M. Davis. 2002. « Direct Observation of Ligand Recognition by T Cells ». *Nature* 419 (6909): 845-49. <https://doi.org/10.1038/nature01076>.
- Ito, M., M. Watanabe, H. Kamiya, et M. Sakurai. 1995. « Changes of Adhesion Molecule (LFA-1, ICAM-1) Expression on Memory T Cells Activated with Cytomegalovirus Antigen ». *Cellular Immunology* 160 (1): 8-13.
- Iwai, Yoshiko, Seigo Terawaki, Masaya Ikegawa, Taku Okazaki, et Tasuku Honjo. 2003. « PD-1 Inhibits Antiviral Immunity at the Effector Phase in the Liver ». *The Journal of Experimental Medicine* 198 (1): 39-50. <https://doi.org/10.1084/jem.20022235>.
- Iwasaki, Akiko, et Ruslan Medzhitov. 2015. « Control of Adaptive Immunity by the Innate Immune System ». *Nature Immunology* 16 (4): 343-53. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>.
- Iwata, Makoto, Asami Hirakiyama, Yuko Eshima, Hiroyuki Kagechika, Chieko Kato, et Si-Young Song. 2004. « Retinoic Acid Imprints Gut-Homing Specificity on T Cells ». *Immunity* 21 (4): 527-38. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.08.011>.
- Jackson, Sarah E., George X. Sedikides, Gavin M. Mason, Georgina Okecha, et Mark R. Wills. 2017. « Human Cytomegalovirus (HCMV)-Specific CD4(+) T Cells Are Polyfunctional and Can Respond to HCMV-Infected Dendritic Cells In Vitro ». *Journal of Virology* 91 (6). <https://doi.org/10.1128/JVI.02128-16>.
- Janssen, Edith M., Nathalie M. Droin, Edward E. Lemmens, Michael J. Pinkoski, Steven J. Bensinger, Benjamin D. Ehst, Thomas S. Griffith, Douglas R. Green, et Stephen P. Schoenberger. 2005. « CD4+ T-Cell Help Controls CD8+ T-Cell Memory via TRAIL-Mediated Activation-Induced Cell Death ». *Nature* 434 (7029): 88-93. <https://doi.org/10.1038/nature03337>.
- Janssen, Edith M., Edward E. Lemmens, Tom Wolfe, Urs Christen, Matthias G. von Herrath, et Stephen P. Schoenberger. 2003. « CD4+ T Cells Are Required for Secondary Expansion and Memory in CD8+ T Lymphocytes ». *Nature* 421 (6925): 852-56. <https://doi.org/10.1038/nature01441>.
- Jeffers, Liesl K., Vicki Madden, et Jennifer Webster-Cyriaque. 2009. « BK Virus Has Tropism for Human Salivary Gland Cells in Vitro: Implications for Transmission ». *Virology* 394 (2): 183-93. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.022>.

- Jenkins, M. K., et R. H. Schwartz. 1987. « Antigen Presentation by Chemically Modified Splenocytes Induces Antigen-Specific T Cell Unresponsiveness in Vitro and in Vivo ». *The Journal of Experimental Medicine* 165 (2): 302-19.
- Jiang, S., O. Herrera, et R. Lechler. 2004. « New Spectrum of Alloreognition Pathways: Implications for Graft Rejection and Transplantation Tolerance ». *Current Opinion in Immunology* 16 (5): 550-57. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.07.011>.
- Jiang, Xiaodong, Rachael A. Clark, Luzheng Liu, Amy J. Wagers, Robert C. Fuhlbrigge, et Thomas S. Kupper. 2012. « Skin Infection Generates Non-Migratory Memory CD8+ T(RM) Cells Providing Global Skin Immunity ». *Nature* 483 (7388): 227-31. <https://doi.org/10.1038/nature10851>.
- Johnson, Edward M., Margaret J. Wortman, Ayuna V. Dagdanova, Patric S. Lundberg, et Dianne C. Daniel. 2013. « Polyomavirus JC in the Context of Immunosuppression: A Series of Adaptive, DNA Replication-Driven Recombination Events in the Development of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy ». *Clinical & Developmental Immunology* 2013: 197807. <https://doi.org/10.1155/2013/197807>.
- Johnston, Olwyn, Dharmvir Jaswal, John S. Gill, Steve Doucette, Dean A. Fergusson, et Greg A. Knoll. 2010. « Treatment of Polyomavirus Infection in Kidney Transplant Recipients: A Systematic Review ». *Transplantation* 89 (9): 1057-70. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181d0e15e>.
- Josefowicz, Steven Z., Li-Fan Lu, et Alexander Y. Rudensky. 2012. « Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function ». *Annual Review of Immunology* 30: 531-64. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>.
- Joshi, Nikhil S., Weiguo Cui, Anmol Chandele, Heung Kyu Lee, David R. Urso, James Hagan, Laurent Gapin, et Susan M. Kaech. 2007. « Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8(+) T Cell Fates via the Graded Expression of T-Bet Transcription Factor ». *Immunity* 27 (2): 281-95. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.010>.
- Jouve, Thomas, Lionel Rostaing, et Paolo Malvezzi. 2016. « Place of MTOR Inhibitors in Management of BKV Infection after Kidney Transplantation ». *Journal of Nephropathology* 5 (1): 1-7. <https://doi.org/10.15171/jnp.2016.01>.
- Kaech, Susan M., et Rafi Ahmed. 2003. « Immunology. CD8 T Cells Remember with a Little Help ». *Science (New York, N.Y.)* 300 (5617): 263-65. <https://doi.org/10.1126/science.1084511>.
- Kaech, Susan M., et Weiguo Cui. 2012. « Transcriptional Control of Effector and Memory CD8+ T Cell Differentiation ». *Nature Reviews. Immunology* 12 (11): 749-61. <https://doi.org/10.1038/nri3307>.
- Kaech, Susan M., Joyce T. Tan, E. John Wherry, Bogumila T. Konieczny, Charles D. Surh, et Rafi Ahmed. 2003. « Selective Expression of the Interleukin 7 Receptor Identifies Effector CD8 T Cells That Give Rise to Long-Lived Memory Cells ». *Nature Immunology* 4 (12): 1191-98. <https://doi.org/10.1038/ni1009>.
- Kaech, Susan M., et E John Wherry. 2007. « Heterogeneity and Cell-Fate Decisions in Effector and Memory CD8+ T Cell Differentiation during Viral Infection ». *Immunity* 27 (septembre): 393-405. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.007>.

- Kaech, Susan M., E. John Wherry, et Rafi Ahmed. 2002. « Effector and Memory T-Cell Differentiation: Implications for Vaccine Development ». *Nature Reviews. Immunology* 2 (4): 251-62. <https://doi.org/10.1038/nri778>.
- Kalia, Vandana, Surojit Sarkar, Shruti Subramaniam, W. Nicholas Haining, Kendall A. Smith, et Rafi Ahmed. 2010. « Prolonged Interleukin-2 α Expression on Virus-Specific CD8+ T Cells Favors Terminal-Effector Differentiation in Vivo ». *Immunity* 32 (1): 91-103. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.010>.
- Kallies, Axel. 2008. « Distinct Regulation of Effector and Memory T-Cell Differentiation ». *Immunology and Cell Biology* 86 (4): 325-32. <https://doi.org/10.1038/icb.2008.16>.
- Kallies, Axel, Annie Xin, Gabrielle T. Belz, et Stephen L. Nutt. 2009. « Blimp-1 Transcription Factor Is Required for the Differentiation of Effector CD8(+) T Cells and Memory Responses ». *Immunity* 31 (2): 283-95. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.021>.
- Kapsenberg, Martien L. 2003. « Dendritic-Cell Control of Pathogen-Driven T-Cell Polarization ». *Nature Reviews. Immunology* 3 (12): 984-93. <https://doi.org/10.1038/nri1246>.
- Kastenmüller, Wolfgang, Marlene Brandes, Ze Wang, Jasmin Herz, Jackson G. Egen, et Ronald N. Germain. 2013. « Peripheral Prepositioning and Local CXCL9 Chemokine-Mediated Guidance Orchestrate Rapid Memory CD8+ T Cell Responses in the Lymph Node ». *Immunity* 38 (3): 502-13. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.012>.
- Kazem, Siamaque, Els van der Meijden, Sander Kooijman, Arlene S. Rosenberg, Lauren C. Hughey, John C. Browning, Genevieve Sadler, et al. 2012. « Trichodysplasia Spinulosa Is Characterized by Active Polyomavirus Infection ». *Journal of Clinical Virology* 53 (3): 225-30. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.11.007>.
- Kennedy, M. K., M. Glaccum, S. N. Brown, E. A. Butz, J. L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, et al. 2000. « Reversible Defects in Natural Killer and Memory CD8 T Cell Lineages in Interleukin 15-Deficient Mice ». *The Journal of Experimental Medicine* 191 (5): 771-80.
- Kersh, Ellen N., Susan M. Kaech, Thandi M. Onami, Miriana Moran, E. John Wherry, M. Carrie Miceli, et Rafi Ahmed. 2003. « TCR Signal Transduction in Antigen-Specific Memory CD8 T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170 (11): 5455-63.
- Khan, Naeem, Andrew Hislop, Nancy Gudgeon, Mark Cobbold, Rajiv Khanna, Laxman Nayak, Alan B. Rickinson, et Paul A. H. Moss. 2004. « Herpesvirus-Specific CD8 T Cell Immunity in Old Age: Cytomegalovirus Impairs the Response to a Coresident EBV Infection ». *Journal of Immunology* 173 (décembre): 7481-89.
- Khanna, Nina, Luigia Elzi, Nicolas J. Mueller, Christian Garzoni, Matthias Cavassini, Christoph A. Fux, Pietro Vernazza, et al. 2009. « Incidence and Outcome of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy over 20 Years of the Swiss HIV Cohort Study ». *Clinical Infectious Diseases* 48 (10): 1459-66. <https://doi.org/10.1086/598335>.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. 2009. « KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients ». *American Journal of Transplantation* 9: S1-155. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02834.x>.
- Kim, E. J., J. Kwun, A. C. Gibby, J. J. Hong, A. B. Farris, N. N. Iwakoshi, F. Villinger, A. D. Kirk, et S. J. Knechtle. 2014. « Costimulation Blockade Alters Germinal Center Responses and Prevents Antibody-Mediated Rejection ». *American Journal of Transplantation* 14 (1): 59-69. <https://doi.org/10.1111/ajt.12526>.

- Kim, S. C., W. Wakwe, L. B. Higginbotham, D. V. Mathews, C. P. Breeden, A. C. Stephenson, J. Jenkins, et al. 2017. « Fc-Silent Anti-CD154 Domain Antibody Effectively Prevents Nonhuman Primate Renal Allograft Rejection ». *American Journal of Transplantation* 17 (5): 1182-92. <https://doi.org/10.1111/ajt.14197>.
- Klein, Ludger, Bruno Kyewski, Paul M. Allen, et Kristin A. Hogquist. 2014. « Positive and Negative Selection of the T Cell Repertoire: What Thymocytes See (and Don't See) ». *Nature Reviews. Immunology* 14 (6): 377-91. <https://doi.org/10.1038/nri3667>.
- Kolumam, Ganesh A., Sunil Thomas, Lucas J. Thompson, Jonathan Sprent, et Kaja Murali-Krishna. 2005. « Type I Interferons Act Directly on CD8 T Cells to Allow Clonal Expansion and Memory Formation in Response to Viral Infection ». *The Journal of Experimental Medicine* 202 (5): 637-50. <https://doi.org/10.1084/jem.20050821>.
- Kooten, C. van, et J. Banchereau. 2000. « CD40-CD40 Ligand ». *Journal of Leukocyte Biology* 67 (1): 2-17.
- Koralnik, I. J., R. A. Du Pasquier, et N. L. Letvin. 2001. « JC Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Individuals with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy ». *Journal of Virology* 75 (7): 3483-87. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.7.3483-3487.2001>.
- Korb, L. C., S. Mirshahidi, K. Ramyar, A. A. Sadighi Akha, et S. Sadegh-Nasseri. 1999. « Induction of T Cell Anergy by Low Numbers of Agonist Ligands ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162 (11): 6401-9.
- Korth, Johannes, Olympia E. Anastasiou, Jens Verheyen, Julia Dickow, Helene Sertznig, Nicola Frericks, Barbara Bleekmann, et al. 2018. « Impact of Immune Suppressive Agents on the BK-Polyomavirus Non Coding Control Region ». *Antiviral Research* 159 (novembre): 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.09.013>.
- Kotton, Camille N, et Jay A Fishman. 2005. « Viral infection in the renal transplant recipient ». *Journal of the American Society of Nephrology* 16: 1758-74. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004121113>.
- Kotton, Camille N., Deepali Kumar, Angela M. Caliendo, Anders Asberg, Sunwen Chou, Lara Danziger-Isakov, Atul Humar, et Transplantation Society International CMV Consensus Group. 2013. « Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-Organ Transplantation ». *Transplantation* 96: 333-60. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31829df29d>.
- Kotton, Camille N., Deepali Kumar, Angela M. Caliendo, Shirish Huprikar, Sunwen Chou, Lara Danziger-Isakov, Atul Humar, et The Transplantation Society International CMV Consensus Group. 2018. « The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-Organ Transplantation ». *Transplantation* 102 (6): 900-931. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002191>.
- Krammer, Peter H., Rüdiger Arnold, et Inna N. Lavrik. 2007. « Life and Death in Peripheral T Cells ». *Nature Reviews. Immunology* 7 (7): 532-42. <https://doi.org/10.1038/nri2115>.
- Krummel, Matthew F., Frederic Bartumeus, et Audrey Gérard. 2016. « T Cell Migration, Search Strategies and Mechanisms ». *Nature Reviews. Immunology* 16 (3): 193-201. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.16>.

- Kunitake, T., T. Kitamura, J. Guo, F. Taguchi, K. Kawabe, et Y. Yogo. 1995. « Parent-to-Child Transmission Is Relatively Common in the Spread of the Human Polyomavirus JC Virus ». *Journal of Clinical Microbiology* 33 (6): 1448-51.
- Küppers, Ralf. 2003. « B Cells under Influence: Transformation of B Cells by Epstein-Barr Virus ». *Nature Reviews. Immunology* 3 (10): 801-12. <https://doi.org/10.1038/nri1201>.
- Lachmann, Raskit, Martha Bajwa, Serena Vita, Helen Smith, Elizabeth Cheek, Arne Akbar, et Florian Kern. 2012. « Polyfunctional T Cells Accumulate in Large Human Cytomegalovirus-Specific T Cell Responses ». *Journal of Virology* 86 (2): 1001-9. <https://doi.org/10.1128/JVI.00873-11>.
- Laidlaw, Brian J., Joseph E. Craft, et Susan M. Kaech. 2016. « The Multifaceted Role of CD4(+) T Cells in CD8(+) T Cell Memory ». *Nature Reviews. Immunology* 16 (2): 102-11. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.10>.
- Lang, Karl S., Mike Recher, Alexander A. Navarini, Nicola L. Harris, Max Löhning, Tobias Junt, Hans Christian Probst, Hans Hengartner, et Rolf M. Zinkernagel. 2005. « Inverse Correlation between IL-7 Receptor Expression and CD8 T Cell Exhaustion during Persistent Antigen Stimulation ». *European Journal of Immunology* 35 (3): 738-45. <https://doi.org/10.1002/eji.200425828>.
- Larsen, C. P., TC. Pearson, AB. Adams, P. Tso, N. Shirasugi, E. Strobert, D. Anderson, et al. 2005. « Rational Development of LEA29Y (Belatacept), a High-Affinity Variant of CTLA4-Ig with Potent Immunosuppressive Properties ». *American Journal of Transplantation* 5 (mars): 443-53. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00749.x>.
- Laupacis, A., P. Keown, N. Pus, H. Krueger, B. Ferguson, C. Wong, et N. Muirhead. 1996. « A Study of the Quality of Life and Cost-Utility of Renal Transplantation ». *Kidney International* 50 (1): 235-42.
- Laurent, Camille, Nicolas Fazilleau, et Pierre Brousset. 2010. « A Novel Subset of T-Helper Cells: Follicular T-Helper Cells and Their Markers ». *Haematologica* 95 (3): 356-58. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.019133>.
- Lebranchu, Yvon, Frank Bridoux, Matthias Büchler, Yannick Le Meur, Isabelle Etienne, Olivier Toupance, Bruno Hurault de Ligny, et al. 2002. « Immunoprophylaxis with Basiliximab Compared with Antithymocyte Globulin in Renal Transplant Patients Receiving MMF-Containing Triple Therapy ». *American Journal of Transplantation* 2 (1): 48-56.
- Lee, R. S., K. Yamada, S. L. Houser, K. L. Womer, M. E. Maloney, H. S. Rose, M. H. Sayegh, et J. C. Madsen. 2001. « Indirect Recognition of Allopeptides Promotes the Development of Cardiac Allograft Vasculopathy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (6): 3276-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.051584498>.
- Leeuwen, Ester M. van, Laila E. Gamadia, Paul A. Baars, Ester B. Remmerswaal, Ineke J. ten Berge, et René A. van Lier. 2002. « Proliferation Requirements of Cytomegalovirus-Specific, Effector-Type Human CD8+ T Cells ». *Journal of Immunology* 169 (novembre): 5838-43.
- Legat, Amandine, Daniel E. Speiser, Hanspeter Pircher, Dietmar Zehn, et Silvia A. Fuertes Marraco. 2013. « Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than “Exhaustion” of Human CD8 T Cells ». *Frontiers in Immunology* 4: 455. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00455>.

- Legendre, Christophe, Alexandre Loupy, Marion Rabant, Olivier Aubert, Clémentine Rabaté, Marianne Delville, Claire Tinel, et al. 2014. « [Current aspects of acute humoral rejection] ». *Nephrologie & Thérapeutique* 10 (6): 479-83. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2014.09.001>.
- Levey, Andrew S., Kai-Uwe Eckardt, Yusuke Tsukamoto, Adeera Levin, Josef Coresh, Jerome Rossert, Dick De Zeeuw, Thomas H. Hostetter, Norbert Lameire, et Garabed Eknoyan. 2005. « Definition and Classification of Chronic Kidney Disease: A Position Statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) ». *Kidney International* 67 (6): 2089-2100. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00365.x>.
- L'Honneur, Anne-Sophie, Hervé Leh, Fanny Laurent-Tchenio, Uriel Hazan, Flore Rozenberg, et Stéphanie Bury-Moné. 2018. « Exploring the Role of NCCR Variation on JC Polyomavirus Expression from Dual Reporter Minicircles ». *PloS One* 13 (6): e0199171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199171>.
- Linares, L, G Sanclemente, C Cervera, I Hoyo, F Cofán, M J Ricart, F Pérez-Villa, et al. 2011. « Influence of cytomegalovirus disease in outcome of solid organ transplant patients ». *Transplantation Proceedings* 43 (août): 2145-48. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.05.007>.
- Lindahl, K. F., et D. B. Wilson. 1977. « Histocompatibility Antigen-Activated Cytotoxic T Lymphocytes. I. Estimates of the Absolute Frequency of Killer Cells Generated in Vitro ». *The Journal of Experimental Medicine* 145 (3): 500-507.
- Liston, Adrian, et Daniel H. D. Gray. 2014. « Homeostatic Control of Regulatory T Cell Diversity ». *Nature Reviews. Immunology* 14 (3): 154-65. <https://doi.org/10.1038/nri3605>.
- Litjens, Nicolle H R, Corné J van Druningen, et Michiel G H Betjes. 2006. « Progressive loss of renal function is associated with activation and depletion of naive T lymphocytes ». *Clinical Immunology* 118: 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.09.007>.
- Littman, Dan R., et Alexander Y. Rudensky. 2010. « Th17 and Regulatory T Cells in Mediating and Restraining Inflammation ». *Cell* 140 (6): 845-58. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.021>.
- London, C. A., M. P. Lodge, et A. K. Abbas. 2000. « Functional Responses and Costimulator Dependence of Memory CD4+ T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (1): 265-72.
- Lopez, Jamie A., Olivia Susanto, Misty R. Jenkins, Natalya Lukoyanova, Vivien R. Sutton, Ruby H. P. Law, Angus Johnston, et al. 2013. « Perforin Forms Transient Pores on the Target Cell Plasma Membrane to Facilitate Rapid Access of Granzymes during Killer Cell Attack ». *Blood* 121 (14): 2659-68. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-446146>.
- Lopo, S, E Vinagre, P Palminha, M T Paixao, P Nogueira, et M G Freitas. 2011. « Seroprevalence to cytomegalovirus in the Portuguese population, 2002-2003 ». *Euro Surveillance* 16.
- Lugli, Enrico, Maria H Dominguez, Luca Gattinoni, Pratip K Chattopadhyay, Diane L Bolton, Kaimei Song, Nichole R Klatt, et al. 2013. « Superior T Memory Stem Cell Persistence Supports Long-Lived T Cell Memory ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (février): 594-99. <https://doi.org/10.1172/JCI66327>.
- Lund, Jennifer M., Lianne Hsing, Thuy T. Pham, et Alexander Y. Rudensky. 2008. « Coordination of Early Protective Immunity to Viral Infection by Regulatory T Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 320 (5880): 1220-24. <https://doi.org/10.1126/science.1155209>.

- Maas, Roderick P. P. W. M., Annemarie H. G. Muller-Hansma, Rianne A. J. Esselink, Jean-Luc Murk, Clemens Warnke, Joep Killestein, et Mike P. Wattjes. 2016. « Drug-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: A Clinical, Radiological, and Cerebrospinal Fluid Analysis of 326 Cases ». *Journal of Neurology* 263 (10): 2004-21. <https://doi.org/10.1007/s00415-016-8217-x>.
- Macdonald, Whitney A., Zhenjun Chen, Stephanie Gras, Julia K. Archbold, Fleur E. Tynan, Craig S. Clements, Mandvi Bharadwaj, et al. 2009. « T Cell Allorecognition via Molecular Mimicry ». *Immunity* 31 (6): 897-908. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.025>.
- Macián, Fernando, Francisco García-Cózar, Sin-Hyeog Im, Heidi F. Horton, Michael C. Byrne, et Anjana Rao. 2002. « Transcriptional Mechanisms Underlying Lymphocyte Tolerance ». *Cell* 109 (6): 719-31.
- Mackay, Laura K., Azad Rahimpour, Joel Z. Ma, Nicholas Collins, Angus T. Stock, Ming-Li Hafon, Javier Vega-Ramos, et al. 2013. « The Developmental Pathway for CD103(+)CD8+ Tissue-Resident Memory T Cells of Skin ». *Nature Immunology* 14 (12): 1294-1301. <https://doi.org/10.1038/ni.2744>.
- Major, Eugene O. 2010. « Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Patients on Immunomodulatory Therapies ». *Annual Review of Medicine* 61: 35-47. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.080708.082655>.
- Maris, Charles H., Joseph D. Miller, John D. Altman, et Joshy Jacob. 2003. « A Transgenic Mouse Model Genetically Tags All Activated CD8 T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (5): 2393-2401.
- Markwick, Lee J. L., Antonio Riva, Jennifer M. Ryan, Helen Cooksley, Elena Palma, Tom H. Tranah, Godhev K. Manakkat Vijay, et al. 2015. « Blockade of PD1 and TIM3 Restores Innate and Adaptive Immunity in Patients with Acute Alcoholic Hepatitis ». *Gastroenterology* 148 (3): 590-602.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.11.041>.
- Martinez, Olivia M., et Sheri M. Krams. 2017. « The Immune Response to Epstein Barr Virus and Implications for Posttransplant Lymphoproliferative Disorder ». *Transplantation* 101 (9): 2009-16. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001767>.
- Marzo, Amanda L., Hideo Yagita, et Leo Lefrançois. 2007. « Cutting Edge: Migration to Nonlymphoid Tissues Results in Functional Conversion of Central to Effector Memory CD8 T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (1): 36-40.
- Masopust, David, et Jason M. Schenkel. 2013. « The Integration of T Cell Migration, Differentiation and Function ». *Nature Reviews. Immunology* 13 (5): 309-20. <https://doi.org/10.1038/nri3442>.
- Mateen, Farrah J., RajaNandini Muralidharan, Marco Carone, Diederik van de Beek, Daniel M. Harrison, Allen J. Aksamit, Mary S. Gould, David B. Clifford, et Avindra Nath. 2011. « Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Transplant Recipients ». *Annals of Neurology* 70 (août): 305-22. <https://doi.org/10.1002/ana.22408>.
- Matloubian, M., R. J. Concepcion, et R. Ahmed. 1994. « CD4+ T Cells Are Required to Sustain CD8+ Cytotoxic T-Cell Responses during Chronic Viral Infection ». *Journal of Virology* 68 (12): 8056-63.
- Mattei, F., G. Schiavoni, F. Belardelli, et D. F. Tough. 2001. « IL-15 Is Expressed by Dendritic Cells in Response to Type I IFN, Double-Stranded RNA, or Lipopolysaccharide and Promotes Dendritic Cell Activation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167 (3): 1179-87.

- McNeil, A. C., W. L. Shupert, C. A. Iyasere, C. W. Hallahan, J. A. Mican, R. T. Davey, et M. Connors. 2001. « High-Level HIV-1 Viremia Suppresses Viral Antigen-Specific CD4(+) T Cell Proliferation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (24): 13878-83. <https://doi.org/10.1073/pnas.251539598>.
- McQuaig, Shannon M., Troy M. Scott, Valerie J. Harwood, Samuel R. Farrah, et Jerzy O. Lukasik. 2006. « Detection of Human-Derived Fecal Pollution in Environmental Waters by Use of a PCR-Based Human Polyomavirus Assay ». *Applied and Environmental Microbiology* 72 (12): 7567-74. <https://doi.org/10.1128/AEM.01317-06>.
- Merrill, J. P., J. E. Murray, J. H. Harrison, et W. R. Guild. 1956. « Successful Homotransplantation of the Human Kidney between Identical Twins ». *Journal of the American Medical Association* 160 (4): 277-82.
- Mirshahidi, S., C. T. Huang, et S. Sadegh-Nasseri. 2001. « Anergy in Peripheral Memory CD4(+) T Cells Induced by Low Avidity Engagement of T Cell Receptor ». *The Journal of Experimental Medicine* 194 (6): 719-31.
- Misbah, S. A. 2017. « Progressive Multi-Focal Leucoencephalopathy - Driven from Rarity to Clinical Mainstream by Iatrogenic Immunodeficiency ». *Clinical and Experimental Immunology* 188: 342-52. <https://doi.org/10.1111/cei.12948>.
- Mitchell, Diana M., et Matthew A. Williams. 2010. « An Activation Marker Finds a Function ». *Immunity* 32 (1): 9-11. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.01.003>.
- Miyama, Takahiko, Takakazu Kawase, Kazutaka Kitaura, Ren Chishaki, Masashi Shibata, Kumi Oshima, Hiroshi Hamana, et al. 2017. « Highly Functional T-Cell Receptor Repertoires Are Abundant in Stem Memory T Cells and Highly Shared among Individuals ». *Scientific Reports* 7 (1): 3663. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03855-x>.
- Mockus, Taryn E., null Shwetank, Matthew D. Lauver, Heather M. Ren, Colleen S. Netherby, Tarik Salameh, Yuka Imamura Kawasawa, Feng Yue, James R. Broach, et Aron E. Lukacher. 2018. « CD4 T Cells Control Development and Maintenance of Brain-Resident CD8 T Cells during Polyomavirus Infection ». *PLoS Pathogens* 14 (10): e1007365. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007365>.
- Moens, U., N. Subramaniam, B. Johansen, T. Johansen, et T. Traavik. 1994. « A Steroid Hormone Response Unit in the Late Leader of the Noncoding Control Region of the Human Polyomavirus BK Confers Enhanced Host Cell Permissivity ». *Journal of Virology* 68 (4): 2398-2408.
- Moens, Ugo, Andi Krumbholz, Bernhard Ehlers, Roland Zell, Reimar Johne, Sébastien Calvignac-Spencer, et Chris Lauber. 2017. « Biology, Evolution, and Medical Importance of Polyomaviruses: An Update ». *Infection, Genetics and Evolution* 54 (juin): 18-38. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.011>.
- Montgomery, Robert A., Emanuele Cozzi, Lori J. West, et Daniel S. Warren. 2011. « Humoral Immunity and Antibody-Mediated Rejection in Solid Organ Transplantation ». *Seminars in Immunology* 23 (4): 224-34. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2011.08.021>.
- Morris, Peter J. 2004. « Transplantation - a Medical Miracle of the 20th Century ». *The New England Journal of Medicine* 351 (26): 2678-80. <https://doi.org/10.1056/NEJMp048256>.
- Mourad, Georges, Lionel Rostaing, Christophe Legendre, Valérie Garrigue, Eric Thervet, et Dominique Durand. 2004. « Sequential Protocols Using Basiliximab versus Antithymocyte

- Globulins in Renal-Transplant Patients Receiving Mycophenolate Mofetil and Steroids ». *Transplantation* 78 (4): 584-90.
- Mueller, Karin, Thomas Schachtner, Arne Sattler, Sarah Meier, Peter Friedrich, Hanna Trydzenskaya, Carl Hinrichs, et al. 2011. « BK-VP3 as a New Target of Cellular Immunity in BK Virus Infection ». *Transplantation* 91 (janvier): 100-107.
- Mueller, Scott N., Thomas Gebhardt, Francis R. Carbone, et William R. Heath. 2013. « Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence ». *Annual Review of Immunology* 31: 137-61. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095954>.
- Mueller, Scott N., et Laura K. Mackay. 2016. « Tissue-Resident Memory T Cells: Local Specialists in Immune Defence ». *Nature Reviews. Immunology* 16 (2): 79-89. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.3>.
- Muftuoglu, Muharrem, Amanda Olson, David Marin, Sairah Ahmed, Victor Mulanovich, Sudhakar Tummala, T. Linda Chi, et al. 2018. « Allogeneic BK Virus-Specific T Cells for Progressive Multifocal Leukoencephalopathy ». *The New England Journal of Medicine* 379 (15): 1443-51. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal801540>.
- Murphy, Kenneth, et Casey Weaver. 2017. *Janeway's Immunobiology, 9th Edition*. Garland Science.
- Mutlu, Esvet, Sadi Köksoy, Derya Mutlu, Vural T. Yılmaz, Hüseyin Koçak, Ayhan Dinçkan, Gültekin Süleymanlar, et Meral Gültekin. 2015. « Quantitative Analysis of BKV-Specific CD4+ T Cells before and after Kidney Transplantation ». *Transplant Immunology* 33 (1): 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2015.05.005>.
- Myhre, Hans-Arne, Dagny Haug Dorenberg, Knut Ivan Kristiansen, Halvor Rollag, Torbjørn Leivestad, Anders Asberg, et Anders Hartmann. 2011. « Incidence and Outcomes of Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Infections in 1244 Kidney Transplant Recipients ». *Transplantation* 92 (2): 217-23. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31821fad25>.
- Nakamichi, Kazuo, Shuji Kishida, Kozue Tanaka, Akihiko Suganuma, Yasuteru Sano, Hironori Sano, Takashi Kanda, et al. 2013. « Sequential Changes in the Non-Coding Control Region Sequences of JC Polyomaviruses from the Cerebrospinal Fluid of Patients with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy ». *Archives of Virology* 158 (3): 639-50. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1532-3>.
- Nakamichi, Kazuo, Shigeru Tajima, Chang-Kweng Lim, et Masayuki Saijo. 2014. « High-Resolution Melting Analysis for Mutation Scanning in the Non-Coding Control Region of JC Polyomavirus from Patients with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy ». *Archives of Virology* 159 (7): 1687-96. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-1988-4>.
- Nguyen, Linh T., et Pamela S. Ohashi. 2015. « Clinical Blockade of PD1 and LAG3--Potential Mechanisms of Action ». *Nature Reviews. Immunology* 15 (1): 45-56. <https://doi.org/10.1038/nri3790>.
- Nickeleit, Volker, Harsharan K. Singh, Parmjeet Randhawa, Cinthia B. Drachenberg, Ramneesh Bhatnagar, Erika Bracamonte, Anthony Chang, et al. 2017. « The Banff Working Group Classification of Definitive Polyomavirus Nephropathy: Morphologic Definitions and Clinical Correlations ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, décembre. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017050477>.
- Noël, Christian, Daniel Abramowicz, Dominique Durand, Georges Mourad, Philippe Lang, Michèle Kessler, Bernard Charpentier, et al. 2009. « Daclizumab versus Antithymocyte Globulin in

- High-Immunological-Risk Renal Transplant Recipients ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 20 (6): 1385-92. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008101037>.
- Oberbauer, Rainer, Giuseppe Segoloni, Josep M. Campistol, Henri Kreis, Alfredo Mota, Joseph Lawen, Graeme Russ, et al. 2005. « Early Cyclosporine Withdrawal from a Sirolimus-Based Regimen Results in Better Renal Allograft Survival and Renal Function at 48 Months after Transplantation ». *Transplant International* 18 (1): 22-28. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2004.00052.x>.
- Oh, Sangkon, Liyanage P. Perera, Masaki Terabe, Ling Ni, Thomas A. Waldmann, et Jay A. Berzofsky. 2008. « IL-15 as a Mediator of CD4+ Help for CD8+ T Cell Longevity and Avoidance of TRAIL-Mediated Apoptosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (13): 5201-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801003105>.
- Ohga, S., E. Kubo, A. Nomura, H. Takada, N. Suga, E. Ishii, A. Suminoe, et al. 2001. « Quantitative Monitoring of Circulating Epstein-Barr Virus DNA for Predicting the Development of Posttransplantation Lymphoproliferative Disease ». *International Journal of Hematology* 73 (3): 323-26.
- Okazaki, Taku, Shunsuke Chikuma, Yoshiko Iwai, Sidonia Fagarasan, et Tasuku Honjo. 2013. « A Rheostat for Immune Responses: The Unique Properties of PD-1 and Their Advantages for Clinical Application ». *Nature Immunology* 14 (12): 1212-18. <https://doi.org/10.1038/ni.2762>.
- Olesin, Elizabeth, Ribhu Nayar, Priya Saikumar-Lakshmi, et Leslie J. Berg. 2018. « The Transcription Factor Runx2 Is Required for Long-Term Persistence of Antiviral CD8+ Memory T Cells ». *ImmunoHorizons* 2 (7): 251-61. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1800046>.
- Olsen, Gunn-Hege, Hans H. Hirsch, et Christine Hanssen Rinaldo. 2009. « Functional Analysis of Polyomavirus BK Non-Coding Control Region Quasispecies from Kidney Transplant Recipients ». *Journal of Medical Virology* 81 (11): 1959-67. <https://doi.org/10.1002/jmv.21605>.
- Onder, Lucas, Priyanka Narang, Elke Scandella, Qian Chai, Maria Iolyeva, Kerim Hoorweg, Cornelia Halin, et al. 2012. « IL-7-Producing Stromal Cells Are Critical for Lymph Node Remodeling ». *Blood* 120 (24): 4675-83. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-416859>.
- Onishi, Yasushi, Zoltan Fehervari, Tomoyuki Yamaguchi, et Shimon Sakaguchi. 2008. « Foxp3+ Natural Regulatory T Cells Preferentially Form Aggregates on Dendritic Cells in Vitro and Actively Inhibit Their Maturation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (29): 10113-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711106105>.
- Opelz, Gerhard, et Bernd Döhler. 2004. « Lymphomas after Solid Organ Transplantation: A Collaborative Transplant Study Report ». *American Journal of Transplantation* 4 (2): 222-30.
- Oth, Tammy, Melanie C. A. Schnijderberg, Birgit L. M. G. Senden-Gijsbers, Wilfred T. V. Germeraad, Gerard M. J. Bos, et Joris Vanderlocht. 2014. « Monitoring the Initiation and Kinetics of Human Dendritic Cell-Induced Polarization of Autologous Naive CD4+ T Cells ». *PloS One* 9 (8): e103725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103725>.
- Pace, Luigia, Andy Tempez, Catharina Arnold-Schrauf, Fabrice Lemaitre, Philippe Bousso, Luc Fetler, Tim Sparwasser, et Sebastian Amigorena. 2012. « Regulatory T Cells Increase the

- Avidity of Primary CD8+ T Cell Responses and Promote Memory ». *Science (New York, N.Y.)* 338 (6106): 532-36. <https://doi.org/10.1126/science.1227049>.
- Padgett, B. L., D. L. Walker, G. M. ZuRhein, R. J. Eckroade, et B. H. Dessel. 1971. « Cultivation of Papova-like Virus from Human Brain with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy ». *Lancet (London, England)* 1 (7712): 1257-60.
- Paley, Michael A., Daniela C. Kroy, Pamela M. Odorizzi, Jonathan B. Johnnidis, Douglas V. Dolfi, Burton E. Barnett, Elizabeth K. Bikoff, et al. 2012. « Progenitor and Terminal Subsets of CD8+ T Cells Cooperate to Contain Chronic Viral Infection ». *Science (New York, N.Y.)* 338 (6111): 1220-25. <https://doi.org/10.1126/science.1229620>.
- Palomar, R., M. López-Hoyos, J. M. Pastor, G. Fernández-Fresnedo, E. Rodrigo, J. C. Ruiz, J. G. Cotorruelo, et al. 2005. « Impact of HLA Antibodies on Transplant Glomerulopathy ». *Transplantation Proceedings* 37 (9): 3830-32. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2005.10.077>.
- Pantaleo, Giuseppe, et Alexandre Harari. 2006. « Functional Signatures in Antiviral T-Cell Immunity for Monitoring Virus-Associated Diseases ». *Nature Reviews. Immunology* 6: 417-23. <https://doi.org/10.1038/nri1840>.
- Pardoll, Drew M. 2012. « The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy ». *Nature Reviews. Cancer* 12 (4): 252-64. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>.
- Park, Chang Ook, et Thomas S. Kupper. 2015. « The Emerging Role of Resident Memory T Cells in Protective Immunity and Inflammatory Disease ». *Nature Medicine* 21 (7): 688-97. <https://doi.org/10.1038/nm.3883>.
- Pascual, Julio, Ana Royuela, Ana M. Fernández, Ignacio Herrero, Juan F. Delgado, Amparo Solé, Lluís Guirado, et al. 2016. « Role of MTOR Inhibitors for the Control of Viral Infection in Solid Organ Transplant Recipients ». *Transplant Infectious Disease* 18 (6): 819-31. <https://doi.org/10.1111/tid.12601>.
- Pavlovic, Dejan, Andriani C. Patera, Fredrik Nyberg, Marianne Gerber, Maggie Liu, et Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Consortium. 2015. « Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: Current Treatment Options and Future Perspectives ». *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 8 (6): 255-73. <https://doi.org/10.1177/1756285615602832>.
- Pepper, Marion, Antonio J. Pagán, Botond Z. Igyártó, Justin J. Taylor, et Marc K. Jenkins. 2011. « Opposing Signals from the Bcl6 Transcription Factor and the Interleukin-2 Receptor Generate T Helper 1 Central and Effector Memory Cells ». *Immunity* 35 (4): 583-95. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.009>.
- Pipkin, Matthew E., Jilian A. Sacks, Fernando Cruz-Guilloty, Mathias G. Lichtenheld, Michael J. Bevan, et Anjana Rao. 2010. « Interleukin-2 and Inflammation Induce Distinct Transcriptional Programs That Promote the Differentiation of Effector Cytolytic T Cells ». *Immunity* 32 (1): 79-90. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.012>.
- Polo, C., J. L. Pérez, A. Mielnichuck, C. G. Fedele, J. Niubò, et A. Tenorio. 2004. « Prevalence and Patterns of Polyomavirus Urinary Excretion in Immunocompetent Adults and Children ». *Clinical Microbiology and Infection* 10 (7): 640-44. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00882.x>.

- Préville, X., M. Flacher, B. LeMauff, S. Beauchard, P. Davelu, J. Tiollier, et J. P. Revillard. 2001. « Mechanisms Involved in Antithymocyte Globulin Immunosuppressive Activity in a Nonhuman Primate Model ». *Transplantation* 71 (3): 460-68.
- Pribila, Jonathan T., Angie C. Quale, Kristen L. Mueller, et Yoji Shimizu. 2004. « Integrins and T Cell-Mediated Immunity ». *Annual Review of Immunology* 22: 157-80. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104649>.
- Quigley, Michael, Florencia Pereyra, Björn Nilsson, Filippas Porichis, Catia Fonseca, Quentin Eichbaum, Boris Julg, et al. 2010. « Transcriptional Analysis of HIV-Specific CD8+ T Cells Shows That PD-1 Inhibits T Cell Function by Upregulating BATF ». *Nature Medicine* 16 (10): 1147-51. <https://doi.org/10.1038/nm.2232>.
- Quinlan, Scott C., Ruth M. Pfeiffer, Lindsay M. Morton, et Eric A. Engels. 2011. « Risk Factors for Early-Onset and Late-Onset Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder in Kidney Recipients in the United States ». *American Journal of Hematology* 86 (2): 206-9. <https://doi.org/10.1002/ajh.21911>.
- Ramaswami, Bala, Iulia Popescu, Camila Macedo, Chunqing Luo, Ron Shapiro, Diana Metes, Geetha Chalasani, et Parmjeet S. Randhawa. 2011. « The Polyomavirus BK Large T-Antigen-Derived Peptide Elicits an HLA-DR Promiscuous and Polyfunctional CD4+ T-Cell Response ». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 18 (5): 815-24. <https://doi.org/10.1128/CVI.00487-10>.
- Ramos, Emilio, Cinthia B Drachenberg, John C Papadimitriou, Omar Hamze, Jeffrey C Fink, David K Klassen, Rene C Drachenberg, et al. 2002. « Clinical Course of Polyoma Virus Nephropathy in 67 Renal Transplant Patients ». *Journal of the American Society of Nephrology* 13 (août): 2145-51.
- Randhawa, Parmjeet S., Iulia Popescu, Camila Macedo, Adriana Zeevi, Ron Shapiro, Abhay N. Vats, et Diana Metes. 2006. « Detection of CD8+ T Cells Sensitized to BK Virus Large T Antigen in Healthy Volunteers and Kidney Transplant Recipients ». *Human Immunology* 67 (4-5): 298-302. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.02.031>.
- Rao, Rajesh R., Qingsheng Li, Melanie R. Gubbels Bupp, et Protul A. Shrikant. 2012. « Transcription Factor Foxo1 Represses T-Bet-Mediated Effector Functions and Promotes Memory CD8(+) T Cell Differentiation ». *Immunity* 36 (3): 374-87. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.015>.
- Rao, Rajesh R., Qingsheng Li, Kunle Odunsi, et Protul A. Shrikant. 2010. « The MTOR Kinase Determines Effector versus Memory CD8+ T Cell Fate by Regulating the Expression of Transcription Factors T-Bet and Eomesodermin ». *Immunity* 32 (1): 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.10.010>.
- Rawal, B. B., S. Shadrou, F. Abubacker, et N. Ghahramani. 2012. « A Systematic Review and Meta-Analysis of Prophylactic versus Pre-Emptive Strategies for Preventing Cytomegalovirus Infection in Renal Transplant Recipients ». *International Journal of Organ Transplantation Medicine* 3 (1): 10-17.
- Ren, Lili, Richard Gonzalez, Zhengde Xie, Jing Zhang, Chunyan Liu, Jianguo Li, Yongjun Li, et al. 2008. « WU and KI Polyomavirus Present in the Respiratory Tract of Children, but Not in Immunocompetent Adults ». *Journal of Clinical Virology* 43 (3): 330-33. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.08.003>.

- Restifo, Nicholas P., et Luca Gattinoni. 2013. « Lineage Relationship of Effector and Memory T Cells ». *Current Opinion in Immunology* 25 (5): 556-63. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.09.003>.
- Rhen, Turk, et John A. Cidlowski. 2005. « Antiinflammatory Action of Glucocorticoids--New Mechanisms for Old Drugs ». *The New England Journal of Medicine* 353 (16): 1711-23. <https://doi.org/10.1056/NEJMra050541>.
- Riou, Catherine, Florette Treurnicht, Melissa-Rose Abrahams, Koleka Mlisana, Michael K P Liu, Nilu Goonetilleke, Richard Koup, et al. 2012. « Increased Memory Differentiation Is Associated with Decreased Polyfunctionality for HIV but Not for Cytomegalovirus-Specific CD8+ T Cells ». *Journal of Immunology* 189: 3838-47. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201488>.
- Rochman, Yrina, Masashi Yukawa, Andrey V. Kartashov, et Artem Barski. 2015. « Functional Characterization of Human T Cell Hyporesponsiveness Induced by CTLA4-Ig ». *PLoS One* 10: e0122198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122198>.
- Roddie, Claire, et Karl S. Peggs. 2017. « Immunotherapy for Transplantation-Associated Viral Infections ». *The Journal of Clinical Investigation* 127 (7): 2513-22. <https://doi.org/10.1172/JCI90599>.
- Rogers, P. R., C. Dubey, et S. L. Swain. 2000. « Qualitative Changes Accompany Memory T Cell Generation: Faster, More Effective Responses at Lower Doses of Antigen ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (5): 2338-46.
- Roizmann, B., R. C. Desrosiers, B. Fleckenstein, C. Lopez, A. C. Minson, et M. J. Studdert. 1992. « The Family Herpesviridae: An Update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses ». *Archives of Virology* 123 (3-4): 425-49.
- Rosenberg, E. S., J. M. Billingsley, A. M. Caliendo, S. L. Boswell, P. E. Sax, S. A. Kalams, et B. D. Walker. 1997. « Vigorous HIV-1-Specific CD4+ T Cell Responses Associated with Control of Viremia ». *Science (New York, N.Y.)* 278 (5342): 1447-50.
- Rouse, Barry T., Pranita P. Sarangi, et Susmit Suvas. 2006. « Regulatory T Cells in Virus Infections ». *Immunological Reviews* 212 (août): 272-86. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00412.x>.
- Rutishauser, Rachel L., Gislaine A. Martins, Sergey Kalachikov, Anmol Chandele, Ian A. Parish, Eric Meffre, Joshy Jacob, Kathryn Calame, et Susan M. Kaech. 2009. « Blimp-1 Promotes Terminal Differentiation of Virus-Specific CD8 T Cells and Represses the Acquisition of Central Memory T Cell Properties ». *Immunity* 31 (2): 296. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.014>.
- Sadegh-Nasseri, Scheherazade, Sarat K. Dalai, Laura C. Korb Ferris, et Saied Mirshahidi. 2010. « Suboptimal Engagement of the T-Cell Receptor by a Variety of Peptide-MHC Ligands Triggers T-Cell Anergy ». *Immunology* 129 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03206.x>.
- Sage, Peter T., Alison M. Paterson, Scott B. Lovitch, et Arlene H. Sharpe. 2014. « The Coinhibitory Receptor CTLA-4 Controls B Cell Responses by Modulating T Follicular Helper, T Follicular Regulatory, and T Regulatory Cells ». *Immunity* 41 (6): 1026-39. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.005>.

- Sallusto, F., J. Geginat, et A. Lanzavecchia. 2004. « Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance ». *Annual Review of Immunology* 22: 745-63. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, et A. Lanzavecchia. 1999. « Two Subsets of Memory T Lymphocytes with Distinct Homing Potentials and Effector Functions ». *Nature* 401 (6754): 708-12. <https://doi.org/10.1038/44385>.
- Sarkar, Surojit, Vandana Kalia, W. Nicholas Haining, Bogumila T. Konieczny, Shruti Subramaniam, et Rafi Ahmed. 2008. « Functional and Genomic Profiling of Effector CD8 T Cell Subsets with Distinct Memory Fates ». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (3): 625-40. <https://doi.org/10.1084/jem.20071641>.
- Sastre-Garau, Xavier, Martine Peter, Marie-Françoise Avril, Hélène Laude, Jérôme Couturier, Flore Rozenberg, Anna Almeida, et al. 2009. « Merkel Cell Carcinoma of the Skin: Pathological and Molecular Evidence for a Causative Role of MCV in Oncogenesis ». *The Journal of Pathology* 218 (1): 48-56. <https://doi.org/10.1002/path.2532>.
- Sayegh, Mohamed H., et Charles B. Carpenter. 2004. « Transplantation 50 Years Later--Progress, Challenges, and Promises ». *The New England Journal of Medicine* 351 (26): 2761-66. <https://doi.org/10.1056/NEJMon043418>.
- Scadden, Jacob Rw, Adnan Sharif, Kassi Skordilis, et Richard Borrow. 2017. « Polyoma Virus Nephropathy in Kidney Transplantation ». *World Journal of Transplantation* 7 (6): 329-38. <https://doi.org/10.5500/wjt.v7.i6.329>.
- Schachtner, T., M. Stein, N. Babel, et P. Reinke. 2015. « The Loss of BKV-Specific Immunity From Pretransplantation to Posttransplantation Identifies Kidney Transplant Recipients at Increased Risk of BKV Replication ». *American Journal of Transplantation* 15 (8): 2159-69. <https://doi.org/10.1111/ajt.13252>.
- Schaenman, Joanna M., Yael Korin, Tiffany Sidwell, Fadi Kandarian, Nicholas Harre, David Gjertson, Erik L. Lum, et al. 2016. « Increased Frequency of BK Virus-Specific Polyfunctional CD8+ T Cells Predict Successful Control of BK Viremia After Kidney Transplantation ». *Transplantation*, juillet. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001314>.
- Schietinger, Andrea, Jeffrey J. Delrow, Ryan S. Basom, Joseph N. Blattman, et Philip D. Greenberg. 2012. « Rescued Tolerant CD8 T Cells Are Preprogrammed to Reestablish the Tolerant State ». *Science (New York, N.Y.)* 335 (6069): 723-27. <https://doi.org/10.1126/science.1214277>.
- Schietinger, Andrea, et Philip D. Greenberg. 2014. « Tolerance and Exhaustion: Defining Mechanisms of T Cell Dysfunction ». *Trends in Immunology* 35 (2): 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.10.001>.
- Schluns, K. S., W. C. Kieper, S. C. Jameson, et L. Lefrançois. 2000. « Interleukin-7 Mediates the Homeostasis of Naïve and Memory CD8 T Cells in Vivo ». *Nature Immunology* 1 (5): 426-32. <https://doi.org/10.1038/80868>.
- Schluns, K. S., et L. Lefrançois. 2003. « Cytokine Control of Memory T-Cell Development and Survival ». *Nature Reviews. Immunology* 3 (4): 269-79. <https://doi.org/10.1038/nri1052>.
- Schmidt, T., C. Adam, H. H. Hirsch, M. W. W. Janssen, M. Wolf, J. Dirks, P. Kardas, et al. 2014. « BK Polyomavirus-Specific Cellular Immune Responses Are Age-Dependent and Strongly

- Correlate with Phases of Virus Replication ». *American Journal of Transplantation* 14 (6): 1334-45. <https://doi.org/10.1111/ajt.12689>.
- Schmitz, J. E., M. J. Kuroda, S. Santra, V. G. Sasseville, M. A. Simon, M. A. Lifton, P. Racz, et al. 1999. «Control of Viremia in Simian Immunodeficiency Virus Infection by CD8+ Lymphocytes ». *Science (New York, N.Y.)* 283 (5403): 857-60.
- Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa, et C. J. Melief. 1998. « T-Cell Help for Cytotoxic T Lymphocytes Is Mediated by CD40-CD40L Interactions ». *Nature* 393 (6684): 480-83. <https://doi.org/10.1038/31002>.
- Schold, Jesse D., Shezhad Rehman, Liise K. Kayle, Liise K. Kayler, Joseph Magliocca, Titte R. Srinivas, et Herwig-Ulf Meier-Kriesche. 2009. « Treatment for BK Virus: Incidence, Risk Factors and Outcomes for Kidney Transplant Recipients in the United States ». *Transplant International* 22 (6): 626-34. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2009.00842.x>.
- Schwartz, Ronald H. 2003. « T Cell Anergy ». *Annual Review of Immunology* 21: 305-34. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141110>.
- Seddon, Benedict, Peter Tomlinson, et Rose Zamoyka. 2003. « Interleukin 7 and T Cell Receptor Signals Regulate Homeostasis of CD4 Memory Cells ». *Nature Immunology* 4 (7): 680-86. <https://doi.org/10.1038/ni946>.
- Seder, Robert A., Patricia A. Darrah, et Mario Roederer. 2008. « T-Cell Quality in Memory and Protection: Implications for Vaccine Design ». *Nature Reviews. Immunology* 8 (4): 247-58. <https://doi.org/10.1038/nri2274>.
- Sehgal, S. N. 1998. « Rapamune (RAPA, Rapamycin, Sirolimus): Mechanism of Action Immunosuppressive Effect Results from Blockade of Signal Transduction and Inhibition of Cell Cycle Progression ». *Clinical Biochemistry* 31 (5): 335-40.
- Sester, M., C. Leboeuf, T. Schmidt, et H. H. Hirsch. 2016. « The “ABC” of Virus-Specific T Cell Immunity in Solid Organ Transplantation ». *American Journal of Transplantation* 16 (juin): 1697-1706. <https://doi.org/10.1111/ajt.13684>.
- Sharma, Preety M., Gaurav Gupta, Abhay Vats, Ron Shapiro, et Parmjeet Randhawa. 2006. « Phylogenetic Analysis of Polyomavirus BK Sequences ». *Journal of Virology* 80 (18): 8869-79. <https://doi.org/10.1128/JVI.00510-06>.
- Sharma, Preety M., Gaurav Gupta, Abhay Vats, Ron Shapiro, et Parmjeet S. Randhawa. 2007. « Polyomavirus BK Non-Coding Control Region Rearrangements in Health and Disease ». *Journal of Medical Virology* 79 (8): 1199-1207. <https://doi.org/10.1002/jmv.20909>.
- Sharma, Rajeev, Stephanie Tzetzto, Sunil Patel, Mareena Zachariah, Sonakshi Sharma, et Thomas Melendy. 2016. « BK Virus in Kidney Transplant: Current Concepts, Recent Advances, and Future Directions ». *Experimental and Clinical Transplantation* 14 (4): 377-84. <https://doi.org/10.6002/ect.2016.0030>.
- Sherman, L. A., et S. Chattopadhyay. 1993. « The Molecular Basis of Allorecognition ». *Annual Review of Immunology* 11: 385-402. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.002125>.
- Shin, Haina, Shawn D. Blackburn, Joseph N. Blattman, et E. John Wherry. 2007. « Viral Antigen and Extensive Division Maintain Virus-Specific CD8 T Cells during Chronic Infection ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (4): 941-49. <https://doi.org/10.1084/jem.20061937>.
- Shin, Haina, Shawn D. Blackburn, Andrew M. Intlekofer, Charly Kao, Jill M. Angelosanto, Steven L. Reiner, et E. John Wherry. 2009. « A Role for the Transcriptional Repressor Blimp-1 in

- CD8(+) T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection ». *Immunity* 31 (2): 309-20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.019>.
- Shitara, Soichiro, Takahiro Hara, Bingfei Liang, Keisuke Wagatsuma, Saulius Zuklys, Georg A. Holländer, Hiroshi Nakase, Tsutomu Chiba, Shizue Tani-ichi, et Koichi Ikuta. 2013. « IL-7 Produced by Thymic Epithelial Cells Plays a Major Role in the Development of Thymocytes and TCR $\gamma\delta$ + Intraepithelial Lymphocytes ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 190 (12): 6173-79. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202573>.
- Shmarov, Vyacheslav A., Vladimir V. Malashchenko, Maksim E. Meniailo, Natalia D. Gazatova, Natalia M. Todosenko, Olga B. Melashchenko, Andrei G. Goncharov, et Victor I. Seledtsov. 2016. « Direct Effects of Interleukin-7 on the Function of Human T Cells in Vitro ». *European Cytokine Network* 27 (4): 102-7. <https://doi.org/10.1684/ecn.2016.0385>.
- Siegel, Richard M. 2006. « Caspases at the Crossroads of Immune-Cell Life and Death ». *Nature Reviews. Immunology* 6 (4): 308-17. <https://doi.org/10.1038/nri1809>.
- Skon, Cara N., June-Yong Lee, Kristin G. Anderson, David Masopust, Kristin A. Hogquist, et Stephen C. Jameson. 2013. « Transcriptional Downregulation of S1pr1 Is Required for the Establishment of Resident Memory CD8+ T Cells ». *Nature Immunology* 14 (12): 1285-93. <https://doi.org/10.1038/ni.2745>.
- Smyth, L.A., Osquel Barroso Herrera, Dela Golshayan, Giovanna Lombardi, et Robert I. Lechler. 2006. « A Novel Pathway of Antigen Presentation by Dendritic and Endothelial Cells: Implications for Allorecognition and Infectious Diseases ». *Transplantation* 82 (1 Suppl): S15-18. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000231347.06149.ca>.
- Solez, Kim, et Lorraine C. Racusen. 2013. « The Banff Classification Revisited ». *Kidney International* 83 (2): 201-6. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.395>.
- Solis, Morgane, Aurélie Velay, Raphaël Porcher, Pilar Domingo-Calap, Eric Soulier, Mélanie Joly, Mariam Meddeb, et al. 2018. « Neutralizing Antibody-Mediated Response and Risk of BK Virus-Associated Nephropathy ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 29 (1): 326-34. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017050532>.
- Staron, Matthew M., Simon M. Gray, Heather D. Marshall, Ian A. Parish, Jonathan H. Chen, Curtis J. Perry, Guoliang Cui, Ming O. Li, et Susan M. Kaech. 2014. « The Transcription Factor FoxO1 Sustains Expression of the Inhibitory Receptor PD-1 and Survival of Antiviral CD8(+) T Cells during Chronic Infection ». *Immunity* 41 (5): 802-14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.013>.
- Stemberger, Christian, Katharina M. Huster, Martina Koffler, Florian Anderl, Matthias Schiemann, Hermann Wagner, et Dirk H. Busch. 2007. « A Single Naive CD8+ T Cell Precursor Can Develop into Diverse Effector and Memory Subsets ». *Immunity* 27 (6): 985-97. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.10.012>.
- Stolt, Annika, Kestutis Sasnauskas, Pentti Koskela, Matti Lehtinen, et Joakim Dillner. 2003. « Seroepidemiology of the Human Polyomaviruses ». *The Journal of General Virology* 84 (Pt 6): 1499-1504. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18842-0>.
- Strutt, Tara M., K. Kai McKinstry, Yi Kuang, Linda M. Bradley, et Susan L. Swain. 2012. « Memory CD4+ T-Cell-Mediated Protection Depends on Secondary Effectors That Are Distinct from and Superior to Primary Effectors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (38): E2551-2560. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205894109>.

- Swain, Susan L, K Kai McKinstry, et Tara M Strutt. 2012. « Expanding Roles for CD4⁺ T Cells in Immunity to Viruses ». *Nature Reviews. Immunology* 12 (février): 136-48. <https://doi.org/10.1038/nri3152>.
- Sylwester, Andrew W, Bridget L Mitchell, John B Edgar, Cara Taormina, Christian Pelte, Franziska Ruchti, Paul R Sleath, et al. 2005. « Broadly Targeted Human Cytomegalovirus-Specific CD4⁺ and CD8⁺ T Cells Dominate the Memory Compartments of Exposed Subjects ». *The Journal of Experimental Medicine* 202 (septembre): 673-85. <https://doi.org/10.1084/jem.20050882>.
- Takemoto, Naofumi, Andrew M. Intlekofer, John T. Northrup, E. John Wherry, et Steven L. Reiner. 2006. « Cutting Edge: IL-12 Inversely Regulates T-Bet and Eomesodermin Expression during Pathogen-Induced CD8⁺ T Cell Differentiation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (11): 7515-19.
- Tan, Chen Sabrina, Evelyn Bord, Thomas A Broge Jr, Brett Glotzbecker, Heidi Mills, Sarah Gheuens, Jacalyn Rosenblatt, David Avigan, et Igor J Koralnik. 2012. « Increased Program Cell Death-1 Expression on T Lymphocytes of Patients with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy ». *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 60: 244-48. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31825a313c>.
- Tan, CS., et IJ. Koralnik. 2010. « Progressive Multifocal Leukoencephalopathy and Other Disorders Caused by JC Virus: Clinical Features and Pathogenesis ». *The Lancet. Neurology* 9: 425-37. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70040-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70040-5).
- Tan, J. T., E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K. I. Weinberg, et C. D. Surh. 2001. « IL-7 Is Critical for Homeostatic Proliferation and Survival of Naive T Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (15): 8732-37. <https://doi.org/10.1073/pnas.161126098>.
- Taoufik, Yassine, et Marie-Ghislaine de Goër de Herve. 2017. « Editorial: Immune Control of JC Virus Infection and Immune Failure during Progressive Multifocal Leukoencephalopathy ». *Frontiers in Immunology* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01646>.
- Taylor, Rebecca C., Sean P. Cullen, et Seamus J. Martin. 2008. « Apoptosis: Controlled Demolition at the Cellular Level ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (3): 231-41. <https://doi.org/10.1038/nrm2312>.
- Teijaro, John R., Damian Turner, Quynh Pham, E. John Wherry, Leo Lefrançois, et Donna L. Farber. 2011. « Cutting Edge: Tissue-Retentive Lung Memory CD4 T Cells Mediate Optimal Protection to Respiratory Virus Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187 (11): 5510-14. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102243>.
- Teixeiro, Emma, Mark A. Daniels, Sara E. Hamilton, Adam G. Schrum, Rafael Bragado, Stephen C. Jameson, et Ed Palmer. 2009. « Different T Cell Receptor Signals Determine CD8⁺ Memory versus Effector Development ». *Science (New York, N.Y.)* 323 (5913): 502-5. <https://doi.org/10.1126/science.1163612>.
- Tejera, Melba Marie, Eui Ho Kim, Jeremy A. Sullivan, Erin H. Plisch, et M. Suresh. 2013. « FoxO1 Controls Effector-to-Memory Transition and Maintenance of Functional CD8 T Cell Memory ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191 (1): 187-99. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300331>.

- Thangaraju, Sobhana, Jagbir Gill, Allissa Wright, Jianghu Dong, Caren Rose, et John Gill. 2016. « Risk Factors for BK Polyoma Virus Treatment and Association of Treatment With Kidney Transplant Failure: Insights From a Paired Kidney Analysis ». *Transplantation* 100 (4): 854-61. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000890>.
- Thatte, Jayant, Vrushali Dabak, Mark B. Williams, Thomas J. Braciale, et Klaus Ley. 2003. « LFA-1 Is Required for Retention of Effector CD8 T Cells in Mouse Lungs ». *Blood* 101 (12): 4916-22. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3159>.
- Tonelli, M., N. Wiebe, G. Knoll, A. Bello, S. Browne, D. Jadhav, S. Klarenbach, et J. Gill. 2011. « Systematic Review: Kidney Transplantation Compared with Dialysis in Clinically Relevant Outcomes ». *American Journal of Transplantation* 11: 2093-2109. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03686.x>.
- Trydzenskaya, Hanna, Arne Sattler, Karin Müller, Thomas Schachtner, Chantip Dang-Heine, Peter Friedrich, Peter Nickel, et al. 2011. « Novel Approach for Improved Assessment of Phenotypic and Functional Characteristics of BKV-Specific T-Cell Immunity ». *Transplantation* 92: 1269-77. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318234e0e5>.
- Turner, Damian L., Claire L. Gordon, et Donna L. Farber. 2014. « Tissue-Resident T Cells, in Situ Immunity and Transplantation ». *Immunological Reviews* 258 (1): 150-66. <https://doi.org/10.1111/imr.12149>.
- Valdor, Rut, et Fernando Macian. 2013. « Induction and Stability of the Anergic Phenotype in T Cells ». *Seminars in Immunology* 25 (novembre): 313-20. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.010>.
- Vanchiere, John A., Suhaib Abudayyeh, Christina M. Copeland, Lee B. Lu, David Y. Graham, et Janet S. Butel. 2009. « Polyomavirus Shedding in the Stool of Healthy Adults ». *Journal of Clinical Microbiology* 47 (8): 2388-91. <https://doi.org/10.1128/JCM.02472-08>.
- Vella, J. P., M. Spadafora-Ferreira, B. Murphy, S. I. Alexander, W. Harmon, C. B. Carpenter, et M. H. Sayegh. 1997. « Indirect Allorecognition of Major Histocompatibility Complex Allopeptides in Human Renal Transplant Recipients with Chronic Graft Dysfunction ». *Transplantation* 64 (6): 795-800.
- Verma, Kriti, Justyna Ogonek, Pavankumar Reddy Varanasi, Susanne Luther, Ivonne Bünting, Katrin Thomay, Yvonne Lisa Behrens, Eva Mischak-Weissinger, et Lothar Hambach. 2017. « Human CD8+ CD57- TEMRA Cells: Too Young to Be Called “Old” ». *PloS One* 12 (5): e0177405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177405>.
- Vignali, Dario A. A., Lauren W. Collison, et Creg J. Workman. 2008. « How Regulatory T Cells Work ». *Nature Reviews. Immunology* 8 (7): 523-32. <https://doi.org/10.1038/nri2343>.
- Villacres, Maria C, Jeff Longmate, Catherine Auge, et Don J Diamond. 2004. « Predominant type 1 CMV-specific memory T-helper response in humans: evidence for gender differences in cytokine secretion ». *Human Immunology* 65 (mai): 476-85. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2004.02.021>.
- Vincenti, F., B. Charpentier, Y. Vanrenterghem, L. Rostaing, B. Bresnahan, P. Darji, P. Massari, et al. 2010. « A Phase III Study of Belatacept-Based Immunosuppression Regimens versus Cyclosporine in Renal Transplant Recipients (BENEFIT Study) ». *American Journal of Transplantation* 10 (3): 535-46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.03005.x>.

- Vincenti, F., L. Rostaing, J. Grinyo, K. Rice, S. Steinberg, L. Gaité, MC. Moal, et al. 2016. « Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation ». *The New England Journal of Medicine* 374 (janvier): 333-43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506027>.
- Viret, C., F. S. Wong, et C. A. Janeway. 1999. « Designing and Maintaining the Mature TCR Repertoire: The Continuum of Self-Peptide:Self-MHC Complex Recognition ». *Immunity* 10 (5): 559-68.
- Viswesh, Velliyur, Sarah E. Yost, et Bruce Kaplan. 2015. « The Prevalence and Implications of BK Virus Replication in Non-Renal Solid Organ Transplant Recipients: A Systematic Review ». *Transplantation Reviews (Orlando, Fla.)* 29 (3): 175-80. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2015.02.004>.
- Vogl, Bastian A., Ursula Fagin, Linda Nerbas, Peter Schlenke, Peter Lamprecht, et Wolfram J. Jabs. 2012. « Longitudinal Analysis of Frequency and Reactivity of Epstein-Barr Virus-Specific T Lymphocytes and Their Association with Intermittent Viral Reactivation ». *Journal of Medical Virology* 84 (1): 119-31. <https://doi.org/10.1002/jmv.22258>.
- Wan, Yisong Y. 2010. « Multi-Tasking of Helper T Cells ». *Immunology* 130 (2): 166-71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03289.x>.
- Wang, C., Kent B. Thudium, Minhua Han, Xi-Tao Wang, Haichun Huang, Diane Feingersh, Candy Garcia, et al. 2014. « In Vitro Characterization of the Anti-PD-1 Antibody Nivolumab, BMS-936558, and in Vivo Toxicology in Non-Human Primates ». *Cancer Immunology Research* 2 (9): 846-56. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0040>.
- Wekerle, Thomas, et Josep M. Grinyó. 2012. « Belatacept: From Rational Design to Clinical Application ». *Transplant International* 25 (2): 139-50. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2011.01386.x>.
- Wells, A. D., M. C. Walsh, J. A. Bluestone, et L. A. Turka. 2001. « Signaling through CD28 and CTLA-4 Controls Two Distinct Forms of T Cell Anergy ». *The Journal of Clinical Investigation* 108 (6): 895-903. <https://doi.org/10.1172/JCI13220>.
- Wen, X., M. J. Casey, A. H. Santos, A. Hartzema, et K. L. Womer. 2016. « Comparison of Utilization and Clinical Outcomes for Belatacept- and Tacrolimus-Based Immunosuppression in Renal Transplant Recipients ». *American Journal of Transplantation* 16 (novembre): 3202-11. <https://doi.org/10.1111/ajt.13853>.
- Wherry, E. John, et Rafi Ahmed. 2004. « Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection ». *Journal of Virology* 78 (11): 5535. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.11.5535-5545.2004>.
- Wherry, E. John, Daniel L. Barber, Susan M. Kaech, Joseph N. Blattman, et Rafi Ahmed. 2004. « Antigen-Independent Memory CD8 T Cells Do Not Develop during Chronic Viral Infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (45): 16004-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407192101>.
- Wherry, E. John, Joseph N. Blattman, Kaja Murali-Krishna, Robbert van der Most, et Rafi Ahmed. 2003. « Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment ». *Journal of Virology* 77 (8): 4911-27.
- Wherry, E. John, Sang-Jun Ha, Susan M. Kaech, W. Nicholas Haining, Surojit Sarkar, Vandana Kalia, Shruti Subramaniam, Joseph N. Blattman, Daniel L. Barber, et Rafi Ahmed. 2007.

- « Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection ». *Immunity* 27 (4): 670-84. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.006>.
- Wherry, E. John, et Makoto Kurachi. 2015. « Molecular and Cellular Insights into T Cell Exhaustion ». *Nature Reviews. Immunology* 15 (8): 486-99. <https://doi.org/10.1038/nri3862>.
- Wherry, E. John, Volker Teichgräber, Todd C. Becker, David Masopust, Susan M. Kaech, Rustom Antia, Ulrich H. von Andrian, et Rafi Ahmed. 2003. « Lineage Relationship and Protective Immunity of Memory CD8 T Cell Subsets ». *Nature Immunology* 4 (3): 225-34. <https://doi.org/10.1038/ni889>.
- Whitelegg, Alison M. E., Liesbeth E. M. Oosten, Susan Jordan, Michel Kester, Astrid G. S. van Halteren, J. Alejandro Madrigal, Els Goulmy, et Linda D. Barber. 2005. « Investigation of Peptide Involvement in T Cell Allorecognition Using Recombinant HLA Class I Multimers ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (3): 1706-14.
- Williams, Matthew A., et Michael J. Bevan. 2007. « Effector and Memory CTL Differentiation ». *Annual Review of Immunology* 25: 171-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141548>.
- Williams, Matthew A., Aaron J. Tzysnik, et Michael J. Bevan. 2006. « Interleukin-2 Signals during Priming Are Required for Secondary Expansion of CD8+ Memory T Cells ». *Nature* 441 (7095): 890-93. <https://doi.org/10.1038/nature04790>.
- Witzke, Oliver, Ingeborg A Hauser, Michael Bartels, Gunter Wolf, Heiner Wolters, et Martin Nitschke. 2012. « Valganciclovir Prophylaxis Versus Preemptive Therapy in Cytomegalovirus-Positive Renal Allograft Recipients: 1-Year Results of a Randomized Clinical Trial ». *Transplantation* 93 (janvier): 61-68. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318238dab3>.
- Wolkers, Monika C., Carmen Gerlach, Ramon Arens, Edith M. Janssen, Patrick Fitzgerald, Ton N. Schumacher, Jan Paul Medema, Douglas R. Green, et Stephen P. Schoenberger. 2012. « Nab2 Regulates Secondary CD8+ T-Cell Responses through Control of TRAIL Expression ». *Blood* 119 (3): 798-804. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-373910>.
- Wullschleger, Stephan, Robbie Loewith, et Michael N. Hall. 2006. « TOR Signaling in Growth and Metabolism ». *Cell* 124 (3): 471-84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016>.
- Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, K. L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, et al. 2001. « Requirement of Interleukin 17 Receptor Signaling for Lung CXC Chemokine and Granulocyte Colony-Stimulating Factor Expression, Neutrophil Recruitment, and Host Defense ». *The Journal of Experimental Medicine* 194 (4): 519-27.
- Young, J. S., J. Chen, M. L. Miller, V. Vu, C. Tian, J. J. Moon, M.-L. Alegre, R. Sciammas, et A. S. Chong. 2016. « Delayed Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Protein 4-Immunoglobulin Treatment Reverses Ongoing Alloantibody Responses and Rescues Allografts From Acute Rejection ». *American Journal of Transplantation* 16 (8): 2312-23. <https://doi.org/10.1111/ajt.13761>.
- Yu, Di, Marcel Batten, Charles R. Mackay, et Cecile King. 2009. « Lineage Specification and Heterogeneity of T Follicular Helper Cells ». *Current Opinion in Immunology* 21 (6): 619-25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.09.013>.
- Zeng, Rong, Rosanne Spolski, Steven E. Finkelstein, SangKon Oh, Panu E. Kovanen, Christian S. Hinrichs, Cynthia A. Pise-Masison, et al. 2005. « Synergy of IL-21 and IL-15 in Regulating

- CD8+ T Cell Expansion and Function ». *The Journal of Experimental Medicine* 201 (1): 139-48. <https://doi.org/10.1084/jem.20041057>.
- Zhong, Shan, Huai-Ying Zheng, Motofumi Suzuki, Qin Chen, Hiroshi Ikegaya, Naoto Aoki, Shuzo Usuku, et al. 2007. « Age-Related Urinary Excretion of BK Polyomavirus by Nonimmunocompromised Individuals ». *Journal of Clinical Microbiology* 45 (1): 193-98. <https://doi.org/10.1128/JCM.01645-06>.
- Zhou, Liang, Mark M. W. Chong, et Dan R. Littman. 2009. « Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation ». *Immunity* 30 (5): 646-55. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.001>.
- Zhou, X.Y., Y. Yashiro-Ohtani, M. Nakahira, W.R. Park, R. Abe, T. Hamaoka, M. Naramura, H. Gu, et H. Fujiwara. 2002. « Molecular Mechanisms Underlying Differential Contribution of CD28 versus Non-CD28 Costimulatory Molecules to IL-2 Promoter Activation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (8): 3847-54.
- Zhu, Chen, Ana C. Anderson, Anna Schubart, Huabao Xiong, Jaime Imitola, Samia J. Khoury, Xin Xiao Zheng, Terry B. Strom, et Vijay K. Kuchroo. 2005. « The Tim-3 Ligand Galectin-9 Negatively Regulates T Helper Type 1 Immunity ». *Nature Immunology* 6 (12): 1245-52. <https://doi.org/10.1038/ni1271>.
- Zhu, Jinfang, Hidehiro Yamane, et William E. Paul. 2010. « Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations ». *Annual Review of Immunology* 28: 445-89. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>.
- Zimmerli, Simone C., Alexandre Harari, Cristina Cellerai, Florence Vallelian, Pierre-Alexandre Bart, et Giuseppe Pantaleo. 2005. « HIV-1-Specific IFN-Gamma/IL-2-Secreting CD8 T Cells Support CD4-Independent Proliferation of HIV-1-Specific CD8 T Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (20): 7239-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502393102>.

Titre : Anomalies de la mémoire lymphocytaire T antivirale et infections virales en transplantation rénale

Mots clés : Infections virales, Transplantation, Lymphocytes T spécifiques des Polyomavirus

Résumé : Les réactivations à *Polyomavirus*, BK-virus (BKv) et JC-virus (JCv), sont des complications majeures en transplantation rénale, responsables de néphropathie à BKv (Nx BKv) et de leuco-encéphalopathie multifocale progressive (LEMP). Sans thérapeutique antivirale spécifique, ces infections virales mènent à la perte du rein transplanté ou au décès du patient.

Notre groupe a conduit une étude observationnelle incluant 100 patients transplantés rénaux avec différents niveaux de réactivation BKv (Etude MelTyK). Nous avons mis en évidence une altération progressive de la fonctionnalité des lymphocytes T spécifiques du BKv, associée à une corrélation inverse entre la polyfonctionnalité lymphocytaire ou le nombre d'incompatibilités HLA et la charge virale BKv plasmatique. Cette altération de la fonctionnalité suggérerait un état d'épuisement des lymphocytes T spécifiques du BKv en fonction du niveau de réactivation BKv.

Ces données nous ont conduit à élaborer une méthode biologique non-invasive d'évaluation du risque individuel de Nx BKv (brevet FR1855342). Cette méthode a pour objectif d'aider au diagnostic de Nx BKv sans avoir recours à la biopsie du greffon rénal et de stratifier le risque de développer cette complication. Par ailleurs, nous avons décrit un cas fatal de LEMP associé à un état d'anergie des lymphocytes T spécifiques du JCv.

L'étude de la fonctionnalité des lymphocytes T spécifiques des *Polyomavirus* pourrait ouvrir de futures pistes diagnostiques et/ou thérapeutiques. Elle pourrait permettre de dépister les patients à risques de Nx BKv et pourrait contribuer au développement d'immunothérapies innovantes. La restauration de la fonctionnalité des lymphocytes T spécifiques des *Polyomavirus* pourrait ainsi fournir une piste thérapeutique prometteuse afin de contrôler ces réactivations virales sans majorer le risque de rejet allogénique.

Title : Impairment of anti-viral T cell memory and viral infectious diseases in kidney transplantation

Keywords : Viral infectious diseases, Transplantation, Polyomavirus-specific T cells

Abstract : Polyomavirus reactivations, BK-virus (BKv) and JC-virus (JCv), are major complications in kidney transplantation, responsible of BKv associated nephropathy (BKvAN) and progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). Without antiviral treatment, these viral reactivations lead to kidney transplant loss or patient death.

Our group has headed an observational study including 100 kidney transplant recipients with different BKv reactivation levels (the MelTyK study). We were able to highlight a gradual loss of functional BKv-specific T cells, associated with an inverse correlation between lymphocyte functionality or HLA mismatches and plasmatic BKv viral load. This functional impairment suggested an exhaustion of BKv-specific T cells according to BKv reactivation levels.

These data have led us to develop a non-invasive biological method to assess the individual BKvAN risk (patent FR1855342). This method is intended to help the BKvAN diagnosis, without renal graft biopsy and to stratify the risk to develop this complication. Moreover, we have described a fatal case of PML associated with a anergy state of the JCv-specific T cells.

Functional assessment of Polyomavirus-specific T cells could help to propose new diagnostic assays and immunotherapy approaches. Functional restoration of Polyomavirus-specific T cells could provide a promising therapeutic approach to control viral reactivations without increase of allogenic rejection risk.