

Université de Poitiers

Faculté de Médecine et Pharmacie

ANNEE 2018

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE (décret du 16 janvier 2004)

Présentée et soutenue publiquement

Le 08 mars 2018 à Poitiers

par Léa DUFOUR-NOURIGAT

Étude de populations lymphocytaires T immunorégulatrices chez des patients
transplantés rénaux sous immunosuppression minimisée

COMPOSITION DU JURY

Président : Monsieur le Professeur Guy Touchard

Membres : Monsieur le Professeur Frank Bridoux
Monsieur le Professeur Jean-Marc Gombert

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Antoine Thierry



Le Doyen,

Année universitaire 2017 - 2018

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie (surnombre jusqu'en 08/2018)
- ALLAL Joseph, thérapeutique
- BATAILLE Benoît, neurochirurgie
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCCO Christophe, bactériologie – virologie
- CARRETIER Michel, chirurgie générale
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie – réanimation
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DROUOT Xavier, physiologie
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRASCA Denis, anesthésiologie-réanimation
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOJJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HADJADJ Samy, endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- HOUETO Jean-Luc, neurologie
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique t cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, oncologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et de réadaptation (en détachement)
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques (surnombre jusqu'en 12/2017)
- MACCHI Laurent, hématologie
- MARECHAUD Richard, médecine interne (émérite à/c du 25/11/2017)
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire (surnombre jusqu'en 08/2018)
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MIGEOT Virginie, santé publique
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, anesthésiologie – réanimation
- NEAU Jean-Philippe, neurologie
- ORIOT Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie
- PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
- PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie
- ROBERT René, réanimation
- ROBLOT Françoise, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SAULNIER Pierre-Jean, thérapeutique
- SILVAIN Christine, hépato-gastro-entérologie
- SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie
- THILLE Arnaud, réanimation
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- TOURANI Jean-Marc, oncologie
- WAGER Michel, neurochirurgie

Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
- BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie – virologie
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail (en détachement)
- BILAN Frédéric, génétique
- BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
- CASTEL Olivier, bactériologie - virologie – hygiène
- COUDROY Rémy, réanimation
- CREMNITER Julie, bactériologie – virologie
- DIAZ Véronique, physiologie
- FEJGERLOVA Eva, endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
- FROUIN Eric, anatomie et cytologie pathologiques
- GARCIA Magali, bactériologie-virologie
- LAFAY Claire, pharmacologie clinique
- PERRAUD Estelle, parasitologie et mycologie
- RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
- SAPANET Michel, médecine légale
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités de médecine générale

- BINDER Philippe
- GOMES DA CUNHA José

Maître de conférences des universités de médecine générale

- BOUSSAGEON Rémy (disponibilité d'octobre à janvier)

Professeurs associés de médecine générale

- BIRAULT François
- PARTHENAY Pascal
- VALETTE Thierry

Maîtres de Conférences associés de médecine générale

- AUDIER Pascal
- ARCHAMBAULT Pierrick
- BRABANT Yann
- FRECHE Bernard
- MIGNOT Stéphanie
- VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

- DEBAIL Didier, professeur certifié
- LOVELL Brenda Lee, maître de langue étrangère

Professeurs émérites

- EUGENE Michel, physiologie (08/2019)
- GIL Roger, neurologie (08/2020)
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion (08/2020)
- HERPIN Daniel, cardiologie (08/2020)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire (16/02/2019)
- MARECHAUD Richard, médecine interne (émérite à/c du 25/11/2017 – jusque 11/2020)
- POURRAT Olivier, médecine interne (08/2018)
- RICOCCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire (08/2018)
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (08/2020)
- TOUCHARD Guy, néphrologie (08/2018)

Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires

- ALCALAY Michel, rhumatologie
- ARIES Jacques, anesthésiologie-réanimation
- BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
- BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
- BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
- BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
- BECCO-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
- BEGON François, biophysique, médecine nucléaire
- BOINOT Catherine, hématologie – transfusion
- BONTOUX Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
- BURIN Pierre, histologie
- CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
- CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
- CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
- CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
- DABAN Alain, oncologie radiothérapie (ex-émérite)
- DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
- DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
- DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
- DORE Bertrand, urologie (ex-émérite)
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
- FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
- GRIGNON Bernadette, bactériologie
- GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
- GUILLET Gérard, dermatologie
- JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
- KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
- KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
- LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
- LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
- MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (ex-émérite)
- MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
- MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (ex-émérite)
- MARILLAUD Albert, physiologie
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (ex-émérite)
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
- MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
- PAQUEREAU Joël, physiologie
- POINTREAU Philippe, biochimie
- REISS Daniel, biochimie
- RIDEAU Yves, anatomie
- SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
- TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
- TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
- VANDERMARCO Guy, radiologie et imagerie médicale

Table des matières

Remerciements	1
Liste des abréviations	5
Introduction	6
Matériel et Méthodes	11
1. Cohorte de patients et de donneurs sains	11
2. Extraction et congélation des cellules mononucléées	11
3. Décongélation des cellules mononucléées	12
4. Analyse des cellules mononucléées <i>in vitro</i> par immunomarquage	12
5. Analyse par cytométrie en flux	12
6. Stratégie d'analyse des données de cytométrie en flux	13
7. Analyses statistiques	14
Résultats	15
1. Description de la cohorte	15
1.1 Caractéristiques néphrologiques	15
1.2. Immunosuppression et immunisation pré et post-transplantation.....	18
1.3. Néoplasies observées et prise en charge	21
2. Caractérisation phénotypique des lymphocytes Treg circulants	23
2.1. Variation de la fréquence de Treg selon la survenue de cancer(s) et le traitement immunosuppresseur.....	23
2.2. Variation de la stabilité du phénotype Treg selon la survenue de cancer(s) et le traitement immunosuppresseur.....	25
2.3. Variation de la proportion de Treg effecteurs mémoires et de Treg naïfs selon la survenue de cancer(s) et le traitement immunosuppresseur	26
2.4. Variation de l'expression du marqueur de costimulation négative CTLA4 selon la survenue de cancer(s) et le traitement immunosuppresseur utilisé	28
2.5. Synthèse de l'analyse des Treg	29
3. Caractérisation phénotypique des lymphocytes T DP8α	29
3.1. Enrichissement en T DP8 α selon le traitement immunosuppresseur et la survenue de complication(s) néoplasique(s)	29
3.2. Profil d'expression des T DP8 α chez les patients et les donneurs sains.....	31
Discussion	32
Références bibliographiques	38
Résumé	41
SERMENT	42

Remerciements

A Monsieur le Professeur Guy Touchard

Merci de me faire l'honneur d'être le président de mon jury de thèse et de m'avoir beaucoup appris durant les nombreux staffs auxquels j'ai assisté durant mon internat.

A Monsieur le Professeur Frank Bridoux

Merci de me faire l'honneur d'être membre de mon jury de thèse. Merci de m'avoir enseigné la rigueur indispensable à tout médecin et merci pour votre exigence qui me permet de toujours progresser.

A Monsieur le Professeur Jean-Marc Gombert

Merci de me faire l'honneur d'être membre de mon jury de thèse. Merci pour votre enseignement durant les mois passés avec vous en master 2.

A Monsieur le Professeur Antoine Thierry

Merci de me faire l'honneur d'être mon directeur de thèse, de m'avoir accompagnée durant ce travail et durant le reste de mon internat.

Aux médecins du service de Néphrologie, Dialyse et Transplantation du CHU de Poitiers

Merci à Vincent Javaugue, mon Chef de Clinique durant les mois passés en hospitalisation, pour ton enseignement et tes expressions cultes.

Merci à Estelle Desport et Laure Ecotière pour votre enseignement en HDJ et votre soutien féminin dans le service.

Merci à Iseline Bouteau anciennement co-interne et nouvellement chef pour ta disponibilité et tes recettes de légumes.

Merci à Marc Bauwens et Simo Belmouaz, mes chefs de dialyse, pour votre enseignement toujours dans la bonne humeur et votre attention particulière envers votre interne enceinte.

Merci à Camille Domenger pour nos astreintes communes bien sympathiques.

Aux médecins du service de Néphrologie et Dialyse du CH de Niort

Merci à Anne Sechet, Cathy Verove et Eric Moumas pour m'avoir beaucoup appris durant mon 1^{er} semestre, avec patience et gentillesse.

Merci à vous 3 ainsi qu'à Delphine Labatut et à Laura Porcene de bien vouloir m'accueillir pour mon dernier semestre en tant qu'interne (malgré les imprévus) puis en post-internat.

A l'équipe soignante du service de Néphrologie, Hémodialyse et Transplantation du CHU de Poitiers

Merci à toutes les infirmières, infirmières coordinatrices, cadres, aides-soignantes et ASH du service d'hospitalisation, de dialyse et de la consultation pour votre bonne humeur et votre aide toujours offerte (et rarement monnayée...).

Merci à Sylvie Chevalier pour m'avoir appris énormément, encouragée constamment et consolée les jours difficiles...

Merci à Nathalie Chargé pour son travail (titanesque parfois) et sa disponibilité constante.

Merci aux secrétaires du service pour leur travail indispensable.

A tous mes co-internes

A Aliénor ma première co-interne, merci pour nos fous rires et nos instants de lamentation, comme tu es partie loin !!

A Antoine et Thomas mes co-internes d'hémato, merci de m'avoir appris les myélogrammes, les BOM et les ponctions lombaires (je ne le répéterai pas deux fois !!), merci pour nos soirées initialement sans puis maintenant avec beaucoup de marmailles !!

A Mathilde, Audrey, Victor, Pierre, Guillaume, Maider, Florent avec qui j'ai partagé mes semestres de néphrologie, les biopsies, les cathéters et la confection quotidienne du café bien sûr !

A Clémence, Rayan, Thibault et Alex, mes co-internes de Rea avec qui j'ai passé un super semestre à La Rochelle, notre chambre de garde me manquerait presque...

A l'équipe IRATI

A toute l'équipe du labo pour m'avoir si bien accueillie pendant les 9 mois passés « extraite » de l'hôpital, merci pour la bonne humeur, les gâteaux, le journal du matin, la cueillette des mûres....

Merci en particulier à Aurélie pour m'avoir coachée en M1 puis en M2, un pilier c'est indispensable !!

Merci à Lauren, mon binôme de manip, j'ai hâte de te voir devenir Docteur !

A ma fille

Tu n'es pas encore née et tu illumines déjà ma vie. Tu passeras toujours avant tout le reste.

A mon mari Rémi

Merci pour ton soutien permanent, tes conseils avisés et pour m'avoir toujours poussée à être meilleure tout en m'empêchant (souvent...) de perdre le sens des priorités.

A mes parents

Merci de m'avoir toujours encouragée à faire de mon mieux et de m'avoir toujours soutenue dans mes choix. Merci de m'avoir donné la possibilité d'arriver jusque ici aujourd'hui.

A mon frère Jean

Merci de m'avoir appris à faire des pauses. Merci de me rappeler souvent qu'il existe un autre monde en dehors de l'hôpital...

A mes grands-parents

Merci d'avoir toujours suivi mon parcours avec attention et de m'avoir encouragée dans la voie que j'ai choisie.

A Totof et Fabienne

Merci d'être toujours présents lors des moments importants et de vous être toujours intéressés à mes études comme au reste de ma vie.

A Noémie et Arthur

Combien de fois ai-je entendu que je devais être un exemple... Merci de réussir chacun dans votre domaine sans que je n'aie rien eu à faire du tout !

A mes beaux-parents

Merci de m'avoir accueillie dans votre famille avec tellement de gentillesse, vous contribuez aujourd'hui à mon bonheur comme à celui de Rémi et de votre future petite-fille.

A mes deux beaux-frères

Avec vous ma fratrie s'est agrandie d'un coup ! Merci à vous deux pour votre bonne humeur et vos coups de main travaux/montage de meubles !

A mes grands-parents par alliance

Merci à vous de me gâter comme l'une de vos petites-filles.

A Véronique, Jérôme, Catherine, Sacha et à tous les membres de la tribu Nourigat/Mornay

Merci d'être devenus ma famille et de m'avoir tous accueillie chez vous comme l'une des vôtres.

A tous les copains

Merci à la fine équipe toujours fidèle au poste Anne, Lucile, Charlotte, Karlotta, Adrien, Yann, Romain, Franky... les filles pour les fous rires à la BU et au RU, les gars pour vos pitreries en tous genre...

Merci à Nico, Sophie et Laura : même si la fin des études nous a éloignés je n'oublie pas les nombreuses pauses, les moments au ski, et les imitations d'escalator derrière les fenêtres de la BU.

Merci à Chloé, Solène, Alex et Julien pour les soirées bien remplies, les gueuletons du ski et les conseils de dressage d'enfant.

Merci à tous ceux que je n'ai pas cité et qui me supportent depuis des années....

Liste des abréviations

Ac : Anticorps
Acm : Anticorps monoclonal
ADK: Adénocarcinome
APC : AlloPhycoCyanine
ATP : Adénosine TriPhosphate
Aza : azathioprine
CBC : Carcinome basocellulaire
CD : Cluster de Différenciation
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMN : Cellules MonoNucléées
CNI : *Calcineurine inhibitor*
CsA : ciclosporine A
CSC : Carcinome spinocellulaire
CTLA4 : *Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*
DFGe : Débit de Filtration Glomérulaire estimé
DMSO : DiMéthylSulfOxyde
DP : dialyse péritonéale
DS : donneurs sains
DSA : *Donor Specific Antibody*
EER : épuration extra-rénale
EFS : Établissement Français du Sang
F. prausnitzii : *Faecalibacterium prausnitzii*
Foxp3 : *Forkhead box p3*
FSC : *Forward Scatter*
HD: hémodialyse
Hi : *High*
HLA : *Human Leucocyte Antigen*
IFN- γ : Interféron gamma
IL : InterLeukine
iNKT: *invariant natural killer T lymphocytes*
MDRD : *Modification of the Diet in Renal Disease*
MFI : *Mean Fluorescence Intensity*
MMF: mycophénolate mofétil
mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*
NK: *natural killer cells*
NS : non significatif
P : patients
PBS : *Phosphate Buffered Saline*
PMT : Photomultiplicateurs
RC : Réponse complète
RCH : Recto-Colite Hémorragique
RPMIc : RPMI complet
SEM : *Standard error of the mean*
SSC : *Side Scatter*
SVF : Sérum de Veau Foetal
T DP8 α : Lymphocytes T immunorégulateurs CD4 (+) CD8 $\alpha\alpha$ (+)
TCR : *T Cell Receptor*
TGF- β : *Transforming Growth Factor Beta*
Treg : Lymphocytes T régulateurs

Introduction

En France entre 2010 et 2015, 62028 nouveaux patients ont débuté un traitement de suppléance de l'insuffisance rénale terminale. Parmi ces patients, 2223 (3,6%) ont bénéficié d'une greffe préemptive et 7399 (12,4%) d'une transplantation rénale dans les suites d'une prise en charge en dialyse au 31/12/2015 (Source : Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie, rapport annuel 2015). La transplantation rénale, quand elle est possible, reste le meilleur traitement de l'insuffisance rénale terminale (Source : HAS, Maladie Rénale Chronique de l'Adulte, février 2012). Elle permet notamment une amélioration de la qualité de vie, un allongement de la durée de vie des patients et représente un coût moindre de prise en charge par rapport à l'hémodialyse ou à la dialyse péritonéale (Source : HAS, Evaluation médico-économique des stratégies de prise en charge de l'insuffisance rénale chronique terminale en France, octobre 2014). La transplantation rénale représente à elle seule la majorité des transplantations d'organes solides soit 3615 (61%) des 5891 transplantations réalisées en 2016 (Source : Agence de la Biomédecine, Activité de greffe d'organes en France en 2016 « Les objectifs du Plan Greffe 2012 - 2016 ont été dépassés », 20 mars 2017).

L'une des principales complications à long terme de la transplantation rénale (et d'organes solides) est l'apparition de néoplasies, liées en partie au traitement immunosuppresseur, à sa durée et son intensité ^{1,2}. La transplantation rénale constitue un facteur de risque majeur de survenue de cancers viro-induits (HPV, EBV, HHV8, HTLV1, HBV, HCV) et de néoplasies cutanées, un patient transplanté rénal présentant 25 à 60 fois plus de risque de développer un carcinome cutané (non mélanome) qu'un individu non transplanté ³. Des modèles expérimentaux ont permis d'élaborer des théories successives quant au mécanisme d'apparition de ces tumeurs, dont celle du *cancer immunoediting* développée par R. Schreiber dans les années 2000. Chez l'Homme, les données observationnelles sont en accord avec ce principe d'un contrôle du système immunitaire sur les tumeurs (théorie de l'immunosurveillance) mais aussi des tumeurs sur le système immunitaire (théorie de l'immunosubversion).

Dans ce contexte, la minimisation des thérapies immunosuppressives est un enjeu chez les patients transplantés rénaux. Ainsi nous avons développé en particulier 2 stratégies de minimisation au CHU de Poitiers.

La première consiste, chez les patients transplantés avant les années 1980 (début d'utilisation de la ciclosporine A, CsA), ne présentant pas de signe de rejet, à maintenir le traitement historique dit « conventionnel » par azathioprine (Aza) + stéroïdes à faible dose.

La seconde consiste, après un an de greffe, à stopper le traitement par antimétabolite et stéroïdes chez les patients présentant un faible risque immunologique ⁴ poursuivant une monothérapie par anticalcineurine (CNI, *Calcineurine inhibitor*) (CsA ou tacrolimus). Cette dernière stratégie a été initiée dans le cadre d'une étude multicentrique comparant 3 stratégies immunosuppressives chez des patients présentant un faible risque immunologique : le maintien d'une bithérapie CNI-Aza ou CNI-mycophenolate mofétil (MMF) ou l'initiation d'une monothérapie CNI. Les données 10 ans post randomisation de ce travail montrent une survie rénale comparable entre les différents groupes, mettant en avant l'intérêt de la monothérapie CNI chez les patients présentant un faible risque immunologique.

Parmi les patients transplantés ayant bénéficié de ces stratégies de minimisation (CNI monothérapie ou Aza + stéroïdes), nombreux sont ceux qui présentent une fonction rénale stable, sans aucun signe clinico-biologique de rejet, posant la question des mécanismes immunologiques sous-jacents. L'une des principales hypothèses avancées est la mise en jeu de populations lymphocytaires immunorégulatrices telle que les lymphocytes T régulateurs (Treg).

Les Treg CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) ont été décrits chez la souris dans les années 1990 par l'équipe de S. Sakaguchi ⁵, puis chez l'Homme au début des années 2000 ⁶. Ils représentent 5 à 10% des lymphocytes T CD4(+) circulants chez l'Homme. Leurs fonctions sont multiples : modulation de la réponse immunitaire et de la réaction inflammatoire, génération de signaux de réparation tissulaire et de facteurs de croissance, contrôle de la tolérance aux antigènes du soi, tolérance du fœtus au cours de la grossesse...*etc.* Ils sont caractérisés d'un point de vue phénotypique par l'expression de plusieurs marqueurs pouvant jouer un rôle dans leurs fonctions (**Figure 1**). C'est le cas du facteur de transcription Foxp3 qui contrôle la différenciation des Treg, de la sous-unité alpha du récepteur à l'IL-2 (Interleukine 2, CD25) qui prive les lymphocytes T conventionnels d'IL-2, de l'ecto-enzyme CD39 qui dégrade l'ATP (Adénosine TriPhosphate) ou de la molécule de costimulation négative CTLA4 (*Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*). Les fonctions immunorégulatrices des Treg mettent aussi en jeu la production de cytokines telles que l'IL-10, l'IL-35 ou le TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*). Plusieurs critères sont associés

à une stabilité du phénotype immunorégulateur : un niveau élevé par cellule d'expression de Foxp3, l'expression du facteur de transcription Helios et l'absence d'expression de CD45RA 7-9.

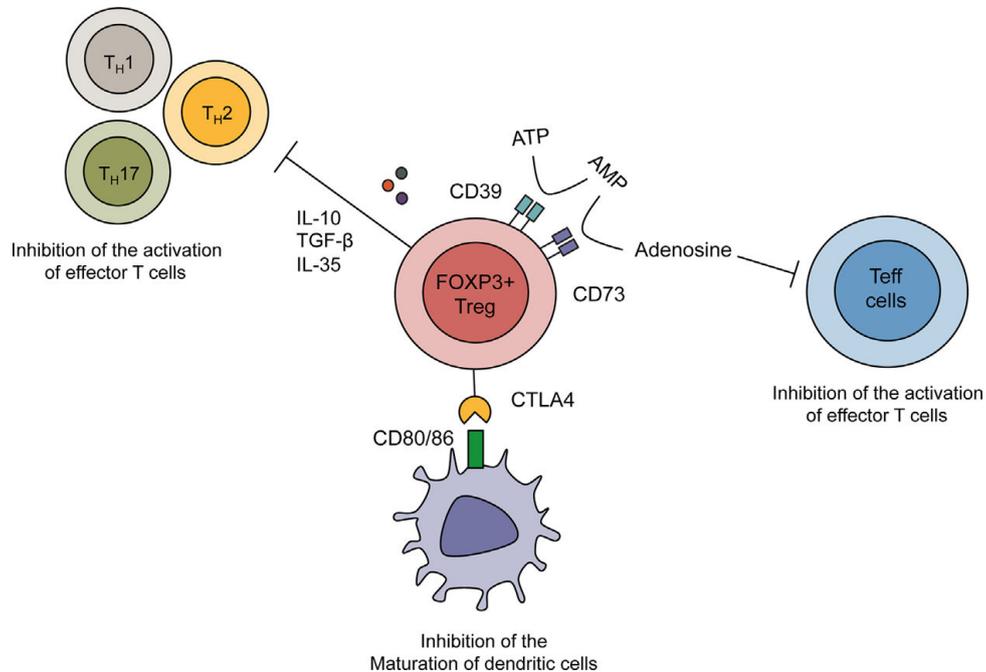


Figure 1. Illustration des fonctions immunosuppressives des Treg chez l'Homme (D'après Braza et al. Am J Transplant 2015 ¹⁰):

Inhibition de la réponse immunitaire pro-inflammatoire via la sécrétion de cytokines immunosuppressives, la transformation d'ATP en adénosine et l'expression de molécules de costimulation négative.

Le rôle des Treg dans la tolérance de greffe d'organe est exploré par plusieurs équipes. Plusieurs modèles expérimentaux ont montré chez la souris que les Treg sont susceptibles d'intervenir dans le contrôle de la tolérance de greffe d'organe ¹¹. Des travaux chez l'Homme ont montré que les immunosuppresseurs sont susceptibles, directement et/ou indirectement, de moduler le statut fonctionnel des Treg ¹². Il a aussi été suggéré que la population de Treg mémoires CD45RA(-) Foxp3(Hi) était associée à la tolérance opérationnelle chez les patients transplantés rénaux ⁸. Ce concept de tolérance opérationnelle est issu de l'observation de patients transplantés rénaux dont le greffon est cliniquement et biologiquement fonctionnel en l'absence de tout traitement immunosuppresseur ¹³. L'équipe de S. Brouard a cherché à mieux définir ce concept en y incluant une dimension histologique ¹⁴. Si l'existence de cet état de tolérance opérationnelle, en transplantation rénale comme hépatique, est à présent admise par

les équipes de transplantation, il n'existe pas à ce jour de moyen de prédire sa survenue chez les patients transplantés ¹⁵. Par ailleurs, de multiples pistes sont explorées par les équipes d'immunologie afin d'expliquer la survenue de cet état de tolérance. Les Treg semblent jouer un rôle dans sa survenue, notamment *via* une capacité immunosuppressive accrue liée à la déméthylation du locus du gène codant pour Foxp3 ¹⁶.

Hormis les Treg, d'autres cellules pourraient jouer un rôle dans le développement d'un état de tolérance. Il a par exemple été montré que les lymphocytes B issus de patients tolérants étaient capables de produire des signaux immunosuppresseurs, développant ainsi le concept de lymphocytes B régulateurs ^{17,18}.

Dans un autre contexte, celui d'une maladie auto-inflammatoire, la rectocolite hémorragique (RCH), une autre population de lymphocytes T immunorégulateurs a été décrite chez l'Homme : les lymphocytes T double positifs CD4(+) CD8 α (+) (T DP8 α) ¹⁹. Cette population a été décrite dans la lamina propria colique où elle représente, chez les sujets sains, 5 à 15 % des lymphocytes T contre 1,5 % des lymphocytes T circulants. Il a été montré qu'elle était déficiente chez les patients atteints d'une RCH. Les T DP8 α n'expriment pas Foxp3, mais exprime CD25 et CD127, récepteur à l'IL-7 absent chez les Treg. Cette population reconnaît des antigènes présentés par les molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II. Sur le plan fonctionnel, les T DP8 α bloquent l'état d'activation des lymphocytes T conventionnels, en particulier par leur production d'IL-10 ¹⁹.

Enfin, les Treg sont impliqués dans la perte de l'immunosurveillance antitumorale ²⁰. Plusieurs travaux ont montré que l'environnement tumoral au cours du processus d'immuno-édition est enrichi en facteurs induisant la différenciation des Treg *in situ*, lesquels bloquent progressivement la réponse immunitaire antitumorale chez l'Homme ²¹. Cette population Treg associée à la perte de l'immunosurveillance des cancers est aussi caractérisée par un niveau élevé d'expression de Foxp3 par cellule, un phénotype mémoire CD45RA(-) et l'expression du facteur de transcription Helios ²².

Les Treg et les T DP8 α constituent donc deux populations lymphocytaires immunorégulatrices d'intérêt chez les patients transplantés rénaux présentant une fonction rénale stable et qui, malgré la minimisation des thérapies immunosuppressives, développent des complications néoplasiques ⁴.

Notre hypothèse est que les cellules impliquées dans la tolérance/le non rejet de greffe sont celles qui jouent également un rôle dans la perte de l'immunosurveillance des cancers.

L'objectif principal de ce travail est de décrire, chez des patients transplantés rénaux tolérants sous immunosuppression minimisée, les lymphocytes Treg et T DP8 α . Nous étudierons les variations phénotypiques de ces populations lymphocytaires régulatrices induites par les traitements immunosuppresseurs et la survenue de cancer(s).

Matériel et Méthodes

1. Cohorte de patients et de donneurs sains

La cohorte de patients transplantés rénaux tolérants sous immunosuppression minimisée a été constituée au sein du service de Néphrologie, Dialyse et Transplantation Rénale du CHU de Poitiers. Les critères d'inclusion étaient les suivants : transplantation rénale il y a plus de 10 ans, fonction rénale stable (variation du taux de créatininémie de moins de 20%), bénéficiant d'une immunosuppression minimisée correspondant soit à : 1) un traitement dit « conventionnel » par Aza et stéroïdes à faible dose, ou 2) un traitement par monothérapie CNI (CsA ou tacrolimus).

Les caractéristiques cliniques des patients ont été recueillies de manière rétrospective, après signature d'un formulaire de consentement, *via* une plateforme de recueil informatisée.

Les échantillons sanguins des donneurs sains proviennent de volontaires adultes prélevés à l'Établissement Français du Sang de Poitiers.

2. Extraction et congélation des cellules mononucléées

Les cellules mononucléées (CMN) ont été obtenues après centrifugation en gradient de densité afin d'éliminer les hématies et les cellules de la lignée granuleuse. Le sang périphérique (densité : 1,056 kg/dm³) a été déposé sur coussin de Ficoll (densité : 1,077 kg/dm³) afin de former deux phases puis les tubes ont été centrifugés 30 minutes à 500 g sans frein afin d'éviter le mélange des phases. Au cours de la centrifugation, les érythrocytes et les granuleux sédimentent au fond du tube, les CMN (lymphocytes et monocytes) forment un anneau à l'interface plasma - solution de Ficoll. L'anneau de CMN a ensuite été prélevé, puis les cellules lavées deux fois en présence de PBS et centrifugées 10 minutes à 300 g afin d'éliminer le surnageant. Les cellules ont ensuite été suspendues dans du PBS et comptées en bleu de Trypan (Sigma) (évaluation de la viabilité cellulaire) à l'aide d'un compteur automatisé de cellules (Countess II FL, ThermoFisher Scientific). Elles ont ensuite été congelées et stockées à -80°C en SVF 50%, RPMIc 40%, diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma) 10 %, cryoprotecteur pour la congélation cellulaire.

3. Décongélation des cellules mononucléées

Les CMN ont été décongelées au bain-marie à 37°C puis lavées immédiatement avec 10 mL de RPMIc à 37°C (élimination du DMSO) et de nouveau comptées à l'aide du compteur automatisé de cellules. Elles ont ensuite été suspendues dans du tampon de marquage à une concentration de 1 million de cellules par puits dans une plaque 96 puits à fond rond (Greiner Bio-one) pour réalisation d'un immunomarquage.

4. Analyse des cellules mononucléées *in vitro* par immunomarquage

L'analyse phénotypique des populations lymphocytaires circulantes d'intérêt a été réalisée par immunomarquage avec des anticorps membranaires et intracellulaires spécifiques. Après décongélation, les CMN ont été suspendues en tampon de marquage, puis incubées 30 minutes à 4°C avec le marqueur de viabilité cellulaire *Live/Dead Fixable Near IR Dead Cell Stain Kit* (L10119, Invitrogen) (Near IR). Ce fluorochrome réagit avec les amines libres membranaires et intracellulaires, il pénètre uniquement à l'intérieur des cellules mortes. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois en tampon de marquage et incubées 30 minutes à 4°C en présence des anticorps monoclonaux membranaires (Acm) puis à nouveau lavées en tampon de marquage. Les cellules ont ensuite été perméabilisées 20 minutes à température ambiante (kit eBioscience) et lavées dans la solution *PermWash* du kit. Pour le marquage intracytoplasmique, elles ont été incubées 30 minutes à 4°C avec les Acm dilués dans la solution *PermWash* puis lavées à nouveau. Enfin, les cellules ont été conservées à 4°C en solution de fixation.

5. Analyse par cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de déterminer pour chaque cellule la taille (FSC, *forward scatter*), la granulosité (SSC, *side scatter*) et l'intensité de fluorescence des différents fluorochromes utilisés. L'acquisition des cellules a été réalisée dans la fenêtre correspondant aux lymphocytes (définie à partir des paramètres FSC et SSC) puis dans une fenêtre excluant les cellules mortes marquées par le Near IR. Les voltages des PMT (photomultiplicateurs) du cytomètre ont été préalablement réglés à l'aide d'un échantillon cellulaire non marqué. L'utilisation simultanée de plusieurs fluorochromes pouvant entraîner un chevauchement des spectres d'émission, un réglage préalable des compensations a été réalisé, c'est à dire la soustraction de la fluorescence parasite à la fluorescence mesurée en utilisant des cellules

monomarquées. Les marquages cellulaires effectués avec des anticorps de même isotype (et de même espèce), couplés au même fluorochrome spécifique d'un antigène non exprimé dans l'espèce étudiée (contrôles isotypiques) ont permis d'évaluer la fluorescence non spécifique lors de l'analyse des marquages d'intérêt et de déterminer le seuil de positivité spécifique. Les cellules ont été analysées avec le cytomètre en flux FACSCVerse™ (BD Biosciences) de la plateforme ImageUp du site. Les données de l'analyse ont été enregistrées par le logiciel FACS Suite™ (BD Biosciences) et analysées avec le logiciel FlowJo (Tree Star, Ashland, Oregon).

6. Stratégie d'analyse des données de cytométrie en flux

La fenêtre correspondant aux lymphocytes a été définie à partir des paramètres FSC et SSC. Les cellules mortes ont été exclues à l'aide du marqueur de viabilité Near IR. Ont ensuite été sélectionnés les lymphocytes T CD3(+), puis les lymphocytes T CD3(+) CD4(+) CD8(-). Les Treg ont été définis parmi les lymphocytes T CD3(+) CD4(+) CD8(-) par leur coexpression de CD25 et Foxp3 (**Figure 2**). Nous avons défini la population de T DP8 α par l'expression concomitante de CD4 et de CD8 à un niveau intermédiaire au sein des lymphocytes T CD3(+) (**Figure 2**).

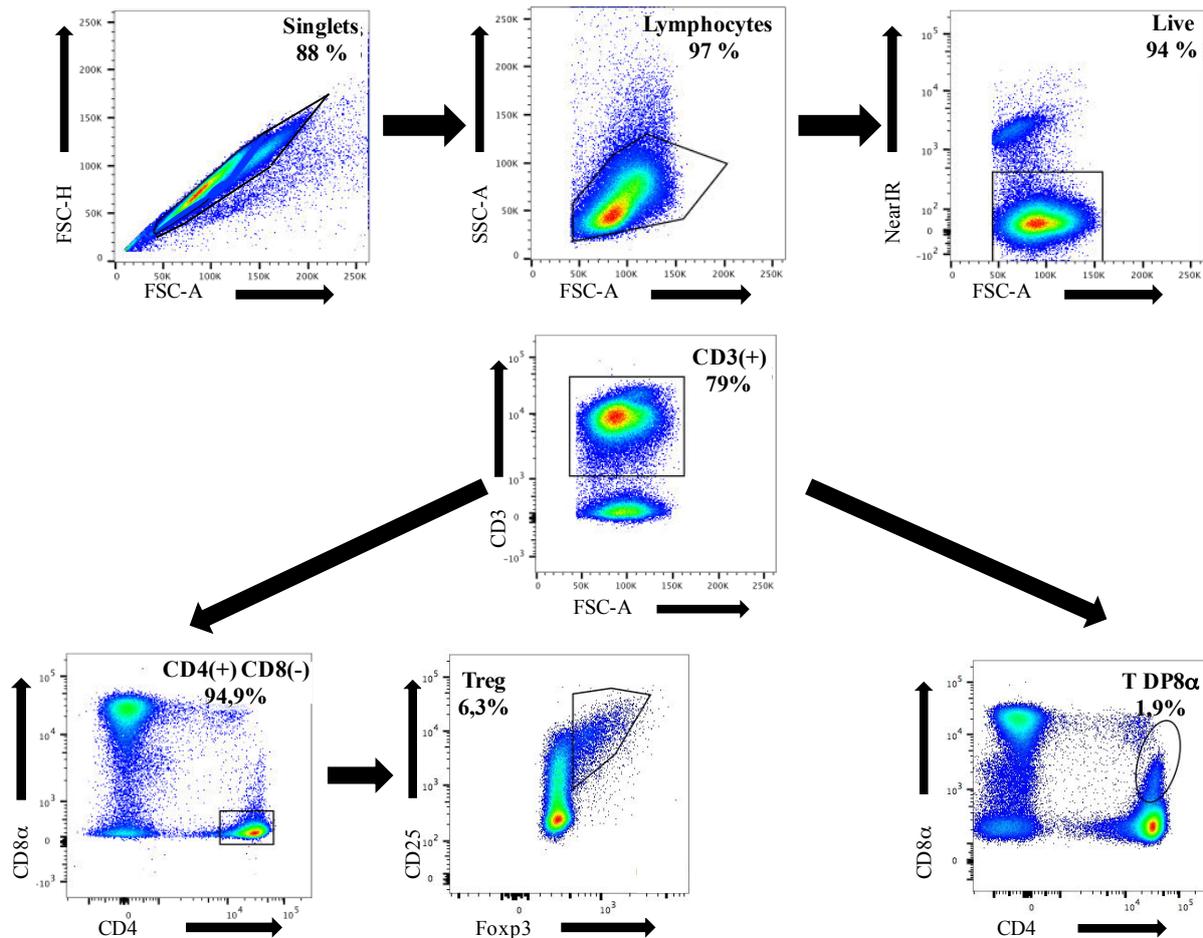


Figure 2. Stratégie d'analyse en cytométrie en flux et définition des populations Treg et T DP8 α

Exclusions des débris cellulaires et des doublets (fenêtre FSC-H/ FSC-A), puis définition successive des populations lymphocytaires (fenêtre SSC-A/ FSC-A), de cellules vivantes (fenêtre Near IR/ FSA-A), de lymphocytes T CD3(+) (fenêtre CD3/ FSC-A), de lymphocytes T CD3(+) CD4(+) CD8 α (-) (fenêtre CD4/CD8 α) puis des Treg CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) (fenêtre CD25/ Foxp3) et de lymphocytes T DP8 α (fenêtre CD4/CD8 α).

7. Analyses statistiques

Les résultats expérimentaux sont exprimés en moyenne \pm SEM (*standard error of the mean*). Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism® en utilisant le test non paramétrique Mann-Whitney. Une valeur de p inférieure à 0,05 % ($p < 0,05$) est considérée comme significative, l'abréviation NS correspond à des valeurs de p non significatives.

Résultats

1. Description de la cohorte

1.1 Caractéristiques néphrologiques

Cinquante-huit patients ont été inclus, dont 18 femmes et 40 hommes (**Tableau 1**). Il s'agissait d'une première transplantation rénale chez 54 patients, tous les greffons étaient issus de donneur décédés. L'âge moyen des patients à l'inclusion était de $62,8 \pm 12,2$ ans et l'âge moyen le jour de la transplantation était de $43,8 \pm 12,8$ ans. La néphropathie initiale était une néphropathie glomérulaire dans 35.3% des cas (n=23), une polykystose rénale autosomique dominante dans 25.8% des cas (n=15), une uropathie malformative dans 10.7% des cas (n=7), une néphropathie vasculaire dans 3% des cas (n=2) ou une autre cause dans 4.6% des cas (n=3). Quarante-huit patients (82.7%) ont nécessité le recours à une technique d'épuration extra-rénale avant la transplantation (hémodialyse ou dialyse péritonéale) et 10 patients ont bénéficié d'une greffe préemptive. Le nadir de créatininémie post transplantation des patients était de $94,3 \pm 23$ $\mu\text{mol/l}$. Le jour de l'inclusion, la créatininémie était de $120 \pm 38,3$ $\mu\text{mol/l}$, soit un DFGe (Débit de filtration glomérulaire estimé) (MDRD) de $53,5 \pm 19,9$ ml/min/1,73m², et le rapport protéinurie/créatininurie de $25,3 \pm 42,6$ mg/mmol. Le délai moyen entre la date de transplantation et la date d'inclusion dans l'étude était de $18,4 \pm 6,8$ ans.

Tableau 1. Caractéristiques néphrologiques des patients

N° patient	Age ^a	Sexe	Néphropathie initiale	EER avant transplantation	Délai depuis la transplantation (ans)	Nadir de créatinémie ^a (µmol/l)	Créatinémie ^b (µmol/l)	DFGe ^b (MDRD)	Protéinurie/ créatinurie ^b (mg/mmol)
1	75	Homme	Polykystose Rénale	HD	19	97	115	53,6	3,8
2	61	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	DP	23	149	76	90	1,9
3	67	Femme	Néphropathie glomérulaire chronique	DP/HD	20	56	89	54	6,8
4	45	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	DP	17	110	133	50	5,2
5	59	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	HD	17	99	115	56	2,9
6	55	Homme	Néphropathie interstitielle chronique	Non	10	127	127	51	2,3
7	84	Homme	Néphropathie interstitielle chronique	HD	19	103	203	30	12,9
8	61	Femme	Uropathie malformative	HD	22	81	77	66	3,9
9	78	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	HD	15	96	108	52	17,5
10	60	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	HD	26	95	176	34	25,8
11	77	Femme	Polykystose Rénale	HD	12	61	81	59	3,8
12	67	Homme	Uropathie malformative	HD	23	93	87	80	8,5
13	62	Femme	Polykystose Rénale	Non	12	82	108	44	3,5
14	62	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	HD	18	99	106	61	8,4
15	44	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	Non	13	120	124	54	1,5
16	60	Homme	Polykystose Rénale	HD	14	126	127	50	6,3
17	65	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	HD	28	152	122	51	83,1
18	65	Homme	Néphropathie interstitielle chronique	Non	16	98	117	54	2,7
19	63	Femme	Polykystose Rénale	HD	25	40	81	61	4,4
20	70	Homme	Polykystose Rénale	HD	17	96	153	39	138,1
21	61	Homme	Polykystose Rénale	HD	22	110	136	46	8,2
22	62	Homme	Polykystose Rénale	HD	14	89	67	104	6,7
23	72	Homme	Uropathie malformative	HD	26	60	92	60	36,5
24	60	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	HD	27	86	116	52	11,6
25	75	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	HD	27	132	150	32	107,8
26	56	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	DP	9	97	133	48	4,0
27	47	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	HD	17	90	148	44	30,3
28	57	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	HD	13	90	76	91	0
29	65	Femme	Uropathie malformative	HD	20	73	227	18	55
30	77	Homme	Polykystose Rénale	HD	25	88	100	52	10,7
31	82	Femme	Néphropathie interstitielle chronique	HD	25	129	85	52	18,1
32	50	Homme	Néphropathie vasculaire	HD	14	96	67	108	7,4
33	64	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	HD	12	104	186	31	7,4
34	76	Homme	Néphropathie vasculaire	HD	23	82	119	51	142,8
35	67	Femme	Polykystose Rénale	Non	10	109	110	42	9,8
36	14	Femme	Uropathie malformative	HD	14	-	139	33	17,1
37	62	Femme	Néphropathie glomérulaire chronique	Non	12	90	119	39	22,7
38	66	Femme	Néphropathie interstitielle chronique	Non	18	105	167	30	29,6
39	53	Homme	Polykystose Rénale	DP	12	110	133	48	4,4
40	62	Homme	Inconnue	DP	11	94	90	74	4,1
41	56	Femme	Néphropathie glomérulaire chronique	DP	11	97	143	32	13,4
42	65	Homme	Autre	HD	21	72	85	78	28,8
43	63	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	Non	11	118	166	40	9,8
44	81	Homme	Polykystose Rénale	HD	16	73	70	93	12,6

45	52	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	HD	15	74	200	30	3,4
46	76	Homme	Sclérose tubéreuse de Bourneville	DP	19	105	121	50	10,6
47	56	Femme	Polykystose Rénale	Non	18	54	141	33	14,8
48	56	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	HD	9	100	105	63	2,8
49	73	Homme	Polykystose Rénale	Non	12	91	128	51	12,2
50	54	Femme	Néphropathie glomérulaire chronique	DP	14	49	81	63	4,2
51	73	Homme	Polykystose Rénale	DP	16	77	97	65	2,9
52	65	Homme	Uropathie malformative	HD	37	102	163	36	36,6
53	67	Femme	Uropathie malformative	HD	37	-	69	73	6,6
54	45	Homme	Néphropathie glomérulaire chronique	DP	30	79	80	90	1,8
55	80	Homme	Polykystose Rénale	HD	25	89	114	45	78,2
56	81	Femme	Uropathie malformative	HD	13	125	214	19	220,3
57	37	Femme	Néphropathie glomérulaire chronique	DP	15	71	118	44	123,3
58	56	Femme	Uropathie malformative	HD	35	-	89	56	5,3
Moyenne ± écart type	62,8 ± 12,2				18,4 ± 6,8	94,3 ± 23	120,1 ± 38,3	53,5 ± 19,9	25,3 ± 42,6

^a Post transplantation ; ^b Le jour de l'inclusion

Abréviations : EER, épuration extra-rénale ; DFGe, Débit de filtration glomérulaire estimé ; MDRD, *Modification of diet in renal disease* ; HD, Hémodialyse ; DP, Dialyse péritonéale ; -, donnée manquante

1.2. Immunosuppression et immunisation pré et post-transplantation

Le traitement d'induction a comporté de la méthylprednisolone dans 100% des cas, du sérum anti-lymphocytaire dans 82.7% des cas (n=48) et du basiliximab (anticorps anti récepteur de l'IL-2) dans 17.3% des cas (n=10) (**Tableau 2**). L'immunosuppression d'entretien le jour de l'inclusion comportait de l'Aza + stéroïdes chez 7 patients et une monothérapie CNI chez 51 patients (CsA n=49, tacrolimus n=2). Les doses moyennes de CsA utilisée étaient de 152 ± 43 mg/j avec des taux résiduels moyens de $91 \pm 18,6$ ng/ml le jour de l'inclusion. Les doses moyennes d'Aza utilisées étaient de $78,5 \pm 22,5$ mg/j. Le jour de la transplantation, 3 patients présentaient des anticorps anti-HLA (*Human leucocyte Antigen*), aucun ne présentait d'anticorps spécifique du donneur (DSA, *Donor Specific Antibody*). A l'inclusion, 38% des patients (n=22) présentaient des anticorps anti-HLA dont 45,5% (n=10) des DSA avec une MFI (*Mean fluorescence intensity*) médiane à 2074 (800-8000).

Seize patients ont bénéficié d'au moins une biopsie de greffon, réalisée suite à la survenue d'un événement clinique dans 82.6% des cas ou pour suivi dans 13% des cas. Parmi ces patients, 4 ont présenté un épisode de rejet aigu cellulaire, tous traités par bolus de stéroïdes. Un patient présentait des lésions de rejet humoral chronique. Parmi les patients ayant bénéficié d'une ponction biopsie de greffon, 7 présentaient des lésions liées à la toxicité des CNI et 1 une récurrence de sa néphropathie initiale (hyalinose segmentaire et focale primitive, patient n°25).

Tableau 2. Caractéristiques immunologiques et traitements immunosuppresseurs

N° Patient	Traitement d'induction	Traitement d'entretien ^a	Dose CNF ^a (mg/j)	Taux résiduel CsA ^a (ng/ml)	Dose Aza (mg/j)	Ac anti HLA avant transplantation	Ac anti HLA à l'inclusion	Rejet ^b	Toxicité CNI ^b	Récidive néphropathie initiale ^b
1	SAL + stéroïdes	CsA	80	70		Non	Classe I			
2	SAL + stéroïdes	CsA	175	74		Non	Non			
3	SAL + stéroïdes	CsA	125	94		Non	Classes I et II, DSA			
4	SAL + stéroïdes	CsA	250	83		Non	Non		oui	
5	SAL + stéroïdes	Tacrolimus	8	6		Non	Non			
6	Basiliximab + stéroïdes	CsA	175	127		Non	Non			
7	SAL + stéroïdes	CsA	110	72		Non	Classe I, DSA			
8	SAL + stéroïdes	CsA	60	84		Non	Non			
9	SAL + stéroïdes	CsA	125	77		Non	Non			
10	SAL + stéroïdes	CsA	200	115		Non	Classes I et II, DSA			
11	Basiliximab + stéroïdes	CsA	70	119		Non	Non			
12	SAL + stéroïdes	CsA	70	89		Classe I	Classes I et II, DSA			
13	Basiliximab + stéroïdes	CsA	150	68		Non	Non			
14	SAL + stéroïdes	CsA	125	84		Non	Classe I			
15	Basiliximab + stéroïdes	CsA	200	111		Non	Non			
16	SAL + stéroïdes	CsA	150	93		Non	Non			
17	SAL + stéroïdes	CsA	150	82		Non	Classe I			
18	SAL + stéroïdes	CsA	175	96		Classes I et II	Classe I			
19	SAL + stéroïdes	CsA	150	95		Non	Classe II, DSA			
20	SAL + stéroïdes	CsA	150	81		Non	Classe II		oui	
21	SAL + stéroïdes	CsA	125	89		Non	Non			
22	SAL + stéroïdes	CsA	175	77		Non	Non			
23	SAL + stéroïdes	CsA	100	80		Non	Non			
24	SAL + stéroïdes	CsA	175	67		Non	Non			
25	SAL + stéroïdes	CsA	175	129		Non	Non	Rejet aigu cellulaire IA		oui
26	SAL + stéroïdes	Tacrolimus	4	6		Non	Non			
27	SAL + stéroïdes	CsA	225	79		Non	Classe II			
28	SAL + stéroïdes	CsA	150	97		Non	Non	Rejet aigu cellulaire IA		
29	SAL + stéroïdes	CsA	120	118		Non	Non			
30	SAL + stéroïdes	CsA	200	67		Classe I	Classes I et II			
31	SAL + stéroïdes	CsA	80	77		Non	Non			
32	SAL + stéroïdes	CsA	150	91		Non	Non			
33	SAL + stéroïdes	CsA	170	129		Non	Non		oui	
34	SAL + stéroïdes	CsA	125	81		-	Non			
35	Basiliximab + stéroïdes	CsA	110	92		Non	Non			
36	SAL + stéroïdes	CsA	150	107		Non	Classe II			
37	SAL + stéroïdes	CsA	200	125		Non	Non			
38	SAL + stéroïdes	CsA	175	91		Non	Classe II, DSA			
39	Basiliximab + stéroïdes	CsA	225	78		Non	Non			
40	Basiliximab + stéroïdes	CsA	175	125		Non	Classe II, DSA			

41	SAL + stéroïdes	CsA	150	92	Non	Non		
42	SAL + stéroïdes	CsA	150	116	Non	Non		
43	SAL + stéroïdes	CsA	200	66	Non	Classe I		oui
44	Basiliximab + stéroïdes	CsA	120	101	Non	Non		
45	SAL + stéroïdes	CsA	200	130	Non	Non		oui
46	SAL + stéroïdes	CsA	150	104	Non	Non		
47	SAL + stéroïdes	CsA	135	97	Non	Non		
48	Basiliximab + stéroïdes	CsA	200	112	Non	Classes I et II	Rejet aigu cellulaire IA	
49	SAL + stéroïdes	CsA	200	96	Non	Classe I		
50	SAL + stéroïdes	CsA	120	87	Non	Non		
51	SAL + stéroïdes	CsA	150	103	Non	Non		
52	SAL + stéroïdes	Azathioprine + stéroïdes			50	-	Classe II	
53	SAL + stéroïdes	Azathioprine + stéroïdes			75	-	Non	
54	SAL + stéroïdes	Azathioprine + stéroïdes			100	Non	Classe I, DSA	
55	SAL + stéroïdes	Azathioprine + stéroïdes			100	Non	Classe II, DSA	
56	Basiliximab + stéroïdes	Azathioprine + stéroïdes			75	Non	Non	Rejet aigu cellulaire IA Rejet cellulaire chronique Rejet humoral chronique
								oui
57	SAL + stéroïdes	Azathioprine + stéroïdes			100	Non	Non	
58	SAL + stéroïdes	Azathioprine + stéroïdes			50	Non	Classe II	

^a Le jour de l'inclusion ; ^b Prouvé par biopsie

Abréviations : CNI, *Calcineurine inhibitor*; CsA, ciclosporine A ; Aza, azathioprine; Ac, anticorps ; HLA, *Human Leucocyte Antigen*; ; DSA, *Donor specific Antibody*

1.3. Néoplasies observées et prise en charge

Dix-neuf patients (32,7%) ont présenté au moins un cancer, dont 4 patients traités par Aza + stéroïdes (**Tableau 3**), représentant 41 événements néoplasiques au total. Il s'agit de cancers cutanés dans 83% des cas, (carcinomes basocellulaires dans 53% des cas et spinocellulaires dans 47% des cas), aucun patient n'a présenté de mélanome malin. Le nombre moyen de carcinomes cutanés chez ces patients est de 2 carcinomes par patient. Tous les carcinomes cutanés ont été traités par chirurgie.

Quatre patients ont présenté au moins un cancer solide : 2 patients (n°46, n°52) ont présenté un adénocarcinome de prostate traité par curiethérapie, un patient (n°1) a présenté un adénocarcinome rénal traité par chirurgie et le patient n°25 a présenté un adénocarcinome de prostate traité par radiothérapie puis plus récemment un adénocarcinome gastrique métastatique traité par chimiothérapie sans réponse au traitement et ayant provoqué le décès du patient. Deux patients ont présenté une hémopathie maligne et ont été traités par chimiothérapie : le patient n°24 a présenté un lymphome folliculaire et le patient n°42 un lymphome plasmoblastique, actuellement en rémission (non EBV induits).

Le délai moyen entre la transplantation et la survenue du premier cancer était de $14,5 \pm 9$ ans. La survenue de ces cancers a conduit à une diminution de la posologie des thérapies immunosuppressives chez 4 patients et à l'arrêt de l'Aza chez 1 patient (n°12, initialement sous bithérapie Aza-CNI, arrêt de l'Aza et poursuite d'une monothérapie CNI).

Le patient n°52 a présenté de multiples carcinomes baso et spinocellulaires. Il s'agit d'un patient traité depuis la transplantation par Aza + stéroïdes, transplanté depuis 37 ans. Le premier carcinome est apparu à 28 ans post-transplantation. La survenue de ces carcinomes a conduit à réduire la posologie de l'Aza, puis à un changement de thérapie immunosuppressive pour un inhibiteur de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*, everolimus) qui a été stoppé en raison d'une mauvaise tolérance hématologique en 2015. Par la suite la bithérapie Aza-stéroïdes a été reprise.

Tableau 3. Caractéristiques et prise en charge thérapeutique des néoplasies post transplantation observées chez 19 patients

N° Patient	Type de cancer	Délai apparition post greffe (ans)	Traitement	Réponse au traitement	Diminution dose immunosuppresseur	Arrêt traitement immunosuppresseur
1	ADK rénal	14	Chirurgie	RC	Non	Non
1	CSC	16	Chirurgie	RC	Non	Non
1	CSC	19	Chirurgie	RC	Oui, CsA	Non
7	CBC	3	Chirurgie	RC	Non	Non
7	CBC	13	Chirurgie	RC	Non	Non
7	CSC	15	Chirurgie	RC	Non	Non
9	CBC	15	Chirurgie	RC	Non	Non
13	CBC	6	Chirurgie	RC	Non	Non
13	CSC	9	Chirurgie	RC	Non	Non
13	CSC	11	Chirurgie	RC	Non	Non
13	CSC	12	Chirurgie	RC	Oui, CsA	Non
13	CSC	18	Chirurgie	RC	Non	Oui, Aza
13	CSC	21	Chirurgie	RC	Non	Non
13	CSC	21	Chirurgie	RC	Non	Non
20	CBC	1	Chirurgie	RC	Non	Non
20	CBC	8	Chirurgie	RC	Non	Non
23	CSC	13	Chirurgie	RC	Non	Non
24	Lymphome Folliculaire	19	Chimiothérapie	RC	Oui, CsA	Non
25	ADK prostate	26	Curiethérapie, Hormonothérapie	RC	Non	Non
25	ADK gastrique	28	Chirurgie	Décès	Non	Non
30	CBC	13	Chirurgie	RC	Non	Non
31	CBC	24	Chirurgie	RC	Non	Non
36	CBC	6	Chirurgie	RC	Non	Non
36	CSC	9	Chirurgie	RC	Non	Non
42	Lymphome plasmoblastique	14	Chimiothérapie, Radiothérapie	RC	Non	Non
46	CSC	6	Chirurgie	RC	Non	Non
46	ADK prostate	9	Curiethérapie	RC	Non	Non
46	CSC	10	Chirurgie	RC	Non	Non
47	CBC	13	Chirurgie	RC	Non	Non
51	CBC	4	Chirurgie	RC	Non	Non
51	CBC	12	Chirurgie	RC	Non	Non
52	CBC	27	Chirurgie	RC	Non	Non
52	CBC	27	Chirurgie	RC	Non	Non
52	ADK prostate	27	Curiethérapie	RC	Non	Non
52	CBC	29	Chirurgie	RC	Non	Non
52	CSC	30	Chirurgie	RC	Oui, Aza	Non
52	CSC	35	Chirurgie	RC	Oui, Aza	Non
52	CBC	36	Chirurgie	RC	Non	Non
53	CSC	34	Chirurgie	RC	Non	Non
55	CBC	8	Chirurgie	RC	Non	Non
56	CBC	10	Chirurgie	RC	Non	Non

Abréviations : CBC, Carcinome basocellulaire ; CSC, Carcinome spinocellulaire ; ADK, Adénocarcinome ; RC, Réponse complète ; Aza, azathioprine ; CsA, Ciclosporine A

2. Caractérisation phénotypique des lymphocytes Treg circulants

2.1. Variation de la fréquence de Treg selon la survenue de cancer(s) et le traitement immunosuppresseur

Nous avons défini la population Treg par l'analyse de l'expression concomitante du marqueur membranaire CD25 et du facteur de transcription Foxp3 parmi les lymphocytes T CD4(+) CD8(-) (**Figure 3**).

Chez les donneurs sains (n=15) la fréquence moyenne de Treg parmi les lymphocytes T CD4(+) CD8(-) est de $6,3 \pm 0,4\%$ (**Tableau 4**). Chez les patients, la fréquence moyenne des Treg parmi les lymphocytes T CD4(+) CD8(-) est de $5,1 \pm 0,3\%$. Chez les patients n'ayant jamais présenté de complication néoplasique, la fréquence de Treg est significativement abaissée par rapport aux donneurs sains ($4,5 \pm 0,4\%$, $p=0,02$). En revanche, il n'y a pas de différence significative entre les donneurs sains et les patients ayant déjà présenté une complication néoplasique ($6,3 \pm 0,6\%$).

La fréquence de Treg varie aussi selon le traitement immunosuppresseur d'entretien (**Tableau 4**). Les patients CNI présentent une diminution non significative de la fréquence de Treg ($4,8 \pm 0,5\%$) par rapport aux donneurs sains. Chez les patients Aza on retrouve une augmentation de la fréquence de Treg ($7,8 \pm 1\%$) par rapport aux donneurs sains ($p=0,07$) et aux patients CNI ($p=0,01$) (**Figure 3**).

Tableau 4. Fréquence moyenne de Treg parmi les lymphocytes T CD4(+) chez les donneurs sains et les patients selon la survenue ou non de cancer(s) et le traitement immunosuppresseur

	Donneurs sains n=15	Patients			
		Sans cancer n=34	Avec cancer(s) n=19	CNI n=47	Aza n=6
% Treg (moyenne \pm écart type)	$6,3 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,4$	$6,3 \pm 0,6$	$4,8 \pm 0,5$	$7,8 \pm 1$

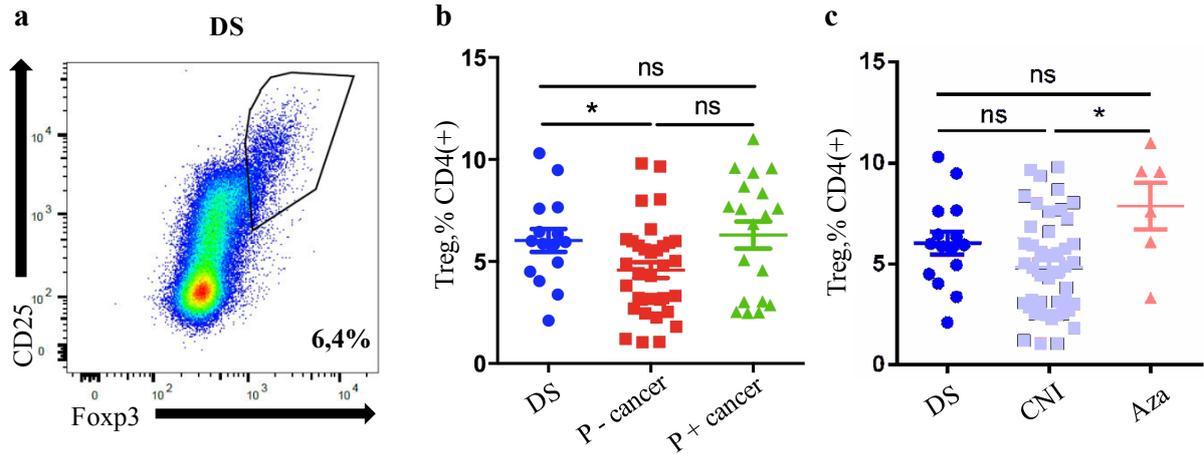


Figure 3. Analyse de la proportion de lymphocytes Treg au sein des lymphocytes T CD4(+) CD8(-)

- a) Exemple d'analyse par cytométrie en flux de la population Treg chez un donneur sain
- b) Comparaison de la fréquence de Treg au sein des lymphocytes T CD4(+) CD8(-) entre les donneurs sains (n=15), les patients sans cancer (n=34) et les patients avec cancer (n=19) (Mann-Whitney test ; DS vs P - cancer p=0,02, P - cancer vs P + cancer p=0,06, DS vs P + cancer p=0,68)
- c) Comparaison de la fréquence de Treg au sein des lymphocytes T CD4(+) CD8(-) entre les donneurs sains (n=15), les patients CNI (n=47) et les patients Aza (n=6) (Mann-Whitney test ; DS vs CNI p=0,07, CNI vs Aza p=0,01, DS vs Aza p=0,13)

2.2. Variation de la stabilité du phénotype Treg selon la survenue de cancer(s) et le traitement immunosuppresseur

Nous avons ensuite étudié de manière concomitante l'expression des facteurs de transcription Foxp3 et Helios parmi les lymphocytes T CD4(+) CD8(-), afin d'identifier les lymphocytes Treg au phénotype immunorégulateur stable (**Figure 4**).

Chez les donneurs sains la fréquence moyenne de lymphocytes T Foxp3(+) Helios(+) est de $6,5 \pm 0,7\%$.

Nous constatons une diminution significative de la fréquence de lymphocytes T Foxp3(+) Helios(+) chez les patients n'ayant pas présenté de cancer par rapport aux donneurs sains ($4,1 \pm 0,3\%$, $p < 0,01$). Là encore, il n'y a pas de différence significative entre les patients ayant déjà présenté une complication néoplasique ($5,2 \pm 0,5\%$) et les donneurs sains.

La fréquence de ces Treg au phénotype stable est abaissée chez les patients traités par CNI ($4,2 \pm 0,3\%$) par rapport aux donneurs sains ($p < 0,01$) et aux patients traités par Aza ($6,7 \pm 0,9\%$, $p = 0,02$) (**Figure 4**).

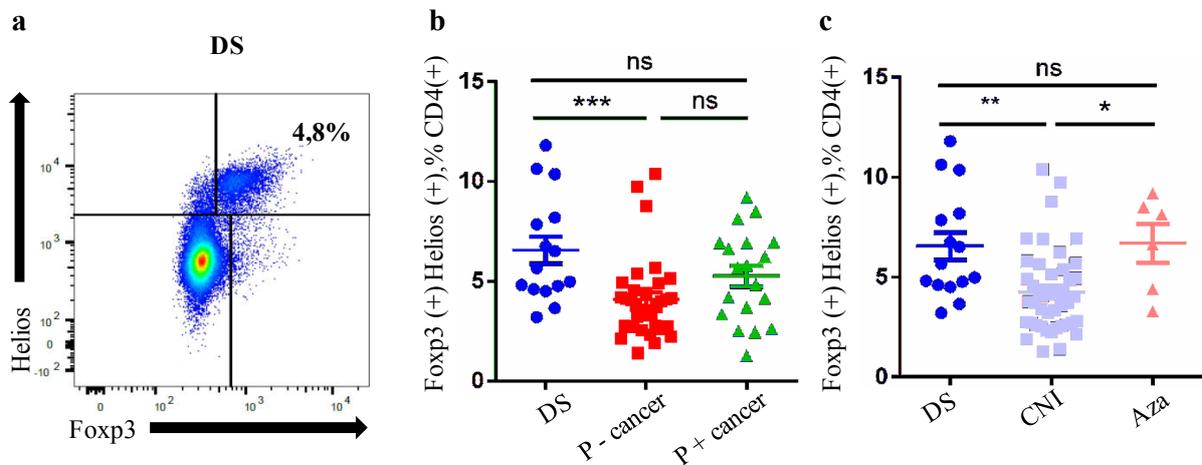


Figure 4. Analyse de la proportion de lymphocytes T Foxp3(+) Helios(+) au sein des lymphocytes T CD4(+) CD8(-)

- Exemple d'analyse par cytométrie en flux de la population de lymphocytes Foxp3(+) Helios(+) chez un donneur sain
- Comparaison de la fréquence des lymphocytes Foxp3(+) Helios(+) au sein des lymphocytes T CD4(+) CD8(-) entre les donneurs sains ($n=15$), les patients sans cancer ($n=34$) et les patients avec cancer ($n=19$) (Mann-Whitney test ; DS vs P - cancer $p=0,0006$, P - cancer vs P + cancer $p=0,05$, DS vs P + cancer $p=0,28$)
- Comparaison de la fréquence des lymphocytes Foxp3(+) Helios(+) au sein des lymphocytes T CD4(+) CD8(-) entre les donneurs sains ($n=15$), les patients CNI ($n=47$) et les patients Aza ($n=6$) (Mann-Whitney test ; DS vs CNI $p=0,001$, CNI vs Aza $p=0,02$, DS vs Aza $p=0,90$)

2.3. Variation de la proportion de Treg effecteurs mémoires et de Treg naïfs selon la survenue de cancer(s) et le traitement immunosuppresseur

Afin de discriminer les Treg naïfs des Treg effecteurs mémoires nous avons analysé dans une même fenêtre l'expression du facteur de transcription Foxp3 et celle de l'isoforme de haut poids moléculaire du marqueur CD45, CD45RA. Cette analyse nous a permis d'identifier plusieurs sous populations, dont les fractions Treg effectrice mémoire CD45RA(-) Foxp3(Hi) et Treg naïve CD45RA(+) Foxp3(int) (**Figure 5**).

Chez les donneurs sains, la fréquence de Treg effecteurs mémoires est de $2,3 \pm 0,3\%$ et de Treg naïfs de $2,2 \pm 0,1\%$.

Il existe une augmentation, bien que non significative, de la fréquence de Treg effecteurs mémoire chez les patients tolérants ayant présenté un cancer ($2,9 \pm 0,4\%$) par rapport à ceux n'ayant pas présenté de cancer ($2,4 \pm 0,3\%$) ainsi qu'aux donneurs sains (**Figure 5**). Par rapport aux donneurs sains, nous constatons une diminution de la fréquence de Treg naïfs chez les patients sans cancer ($2,0 \pm 0,3\%$, $p=0,05$) ainsi que chez les patients avec cancer ($1,5 \pm 0,2\%$, $p=0,03$) (**Figure 5**).

Les patients traités par CNI présentent une diminution non significative de la fréquence de Treg effecteurs mémoire ($2,4 \pm 0,2\%$) par rapport aux donneurs sains et aux patients Aza ($2,7 \pm 0,4\%$) et une diminution significative de la fréquence de Treg naïfs ($1,8 \pm 0,2\%$) par rapport aux donneurs sains ($p=0,01$) (**Figure 5**).

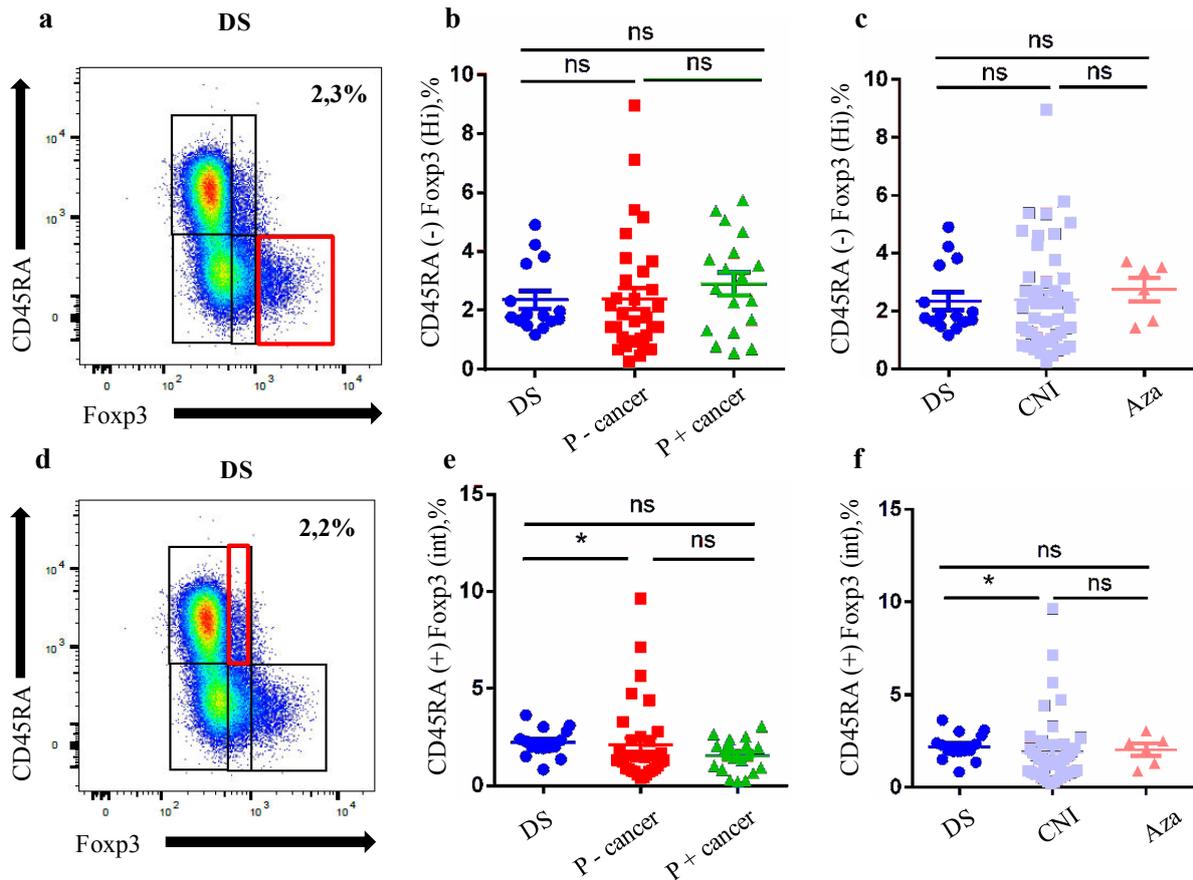


Figure 5. Analyse de la proportion de lymphocytes T CD45RA(-) Foxp3(Hi) et T CD45RA(+) Foxp3(int) au sein des lymphocytes T CD4(+) CD8(-)

- a) Exemple d'analyse par cytométrie en flux de la population de lymphocytes CD45RA(-) Foxp3(Hi) chez un donneur sain
- b) Comparaison de la fréquence des lymphocytes CD45RA(-) Foxp3(Hi) au sein des lymphocytes T CD4(+) CD8(-) entre les donneurs sains (n=15), les patients sans cancer (n=34) et les patients avec cancer (n=19) (Mann-Whitney test ; DS vs P - cancer p=0,45, P - cancer vs P + cancer p=0,24, DS vs P + cancer p=0,45)
- c) Comparaison de la fréquence des lymphocytes CD45RA(-) Foxp3(Hi) au sein des lymphocytes T CD4(+) CD8(-) entre les donneurs sains (n=15), les patients CNI (n=47) et les patients Aza (n=6) (Mann-Whitney test ; DS vs CNI p=0,53, CNI vs Aza p=0,22, DS vs Aza p=0,62)
- d) Exemple d'analyse par cytométrie en flux de la population de lymphocytes CD45RA(+) Foxp3(int) chez un donneur sain
- e) Comparaison de la fréquence des lymphocytes CD45RA(+) Foxp3(int) au sein des lymphocytes T CD4(+) CD8(-) entre les donneurs sains (n=15), les patients sans cancer (n=34) et les patients avec cancer (n=19) (Mann-Whitney test ; DS vs P - cancer p=0,03, P - cancer vs P + cancer p=0,92, DS vs P + cancer p=0,05)
- f) Comparaison de la fréquence des lymphocytes CD45RA(+) Foxp3(int) au sein des lymphocytes T CD4(+) CD8(-) entre les donneurs sains (n=15), les patients CNI (n=47) et les patients Aza (n=6) (Mann-Whitney test ; DS vs CNI p=0,01, CNI vs Aza p=0,20, DS vs Aza p=0,98)

2.4. Variation de l'expression du marqueur de costimulation négative CTLA4 selon la survenue de cancer(s) et le traitement immunosuppresseur utilisé

Afin d'évaluer le phénotype fonctionnel des Treg, nous avons analysé l'expression de la molécule de costimulation négative CTLA4 au sein des Treg (**Figure 6**).

Chez les donneurs sains, la fréquence de Treg CTLA4(+) parmi les Treg est de $49,9 \pm 5,1\%$.

Il existe une augmentation significative de la fréquence de Treg CTLA4(+) chez l'ensemble des patients ($61,3 \pm 2,9 \%$) par rapport aux donneurs sains ($p= 0,03$). Cette augmentation est d'autant plus prononcée chez les patients ayant présenté au moins un cancer ($59,8 \pm 3,8 \%$, $p= 0,02$), ainsi que chez les patients traités par Aza ($67,5 \pm 6,5 \%$, $p=0,06$) (**Figure 6**).

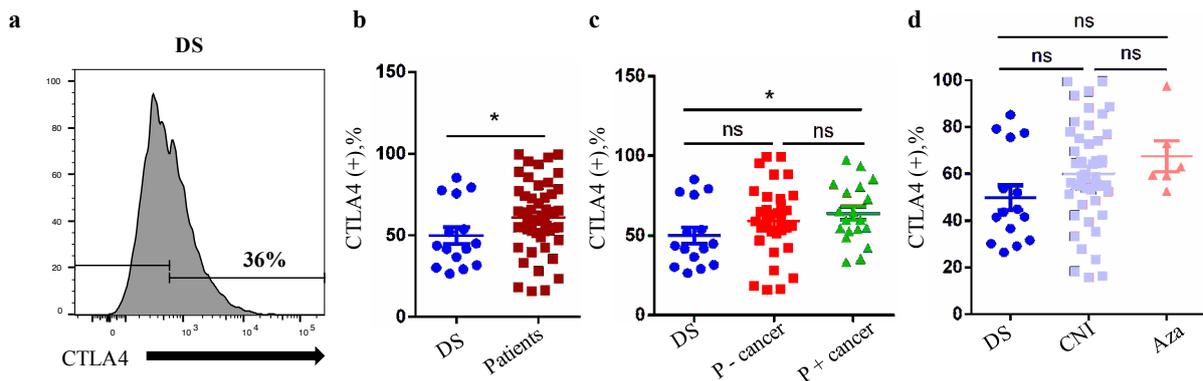


Figure 6. Analyse de la proportion de Treg CTLA4(+) au sein des lymphocytes Treg

- Exemple d'analyse par cytométrie en flux de la population de lymphocytes Treg CTLA4(+) chez un donneur sain
- Comparaison de la fréquence des lymphocytes Treg CTLA4(+) entre les donneurs sains ($n=15$) et les patients ($n=53$) (Mann-Whitney test ; DS vs Patients $p=0,03$)
- Comparaison de la fréquence des lymphocytes Treg CTLA4(+) entre les donneurs sains ($n=15$), les patients sans cancer ($n=34$) et les patients avec cancer ($n=19$) (Mann-Whitney test ; DS vs P - cancer $p=0,10$, P - cancer vs P + cancer $p=0,69$, DS vs P + cancer $p=0,02$)
- Comparaison de la fréquence des lymphocytes Treg CTLA4(+) entre les donneurs sains ($n=15$), les patients CNI ($n=47$) et les patients Aza ($n=6$) (Mann-Whitney test ; DS vs CNI $p=0,05$, CNI vs Aza $p=0,51$, DS vs Aza $p=0,06$)

2.5. Synthèse de l'analyse des Treg

Chez les patients transplantés tolérants sous immunosuppression minimisée, nous avons mis en évidence une modification de la fréquence et des caractéristiques phénotypiques des Treg dépendante de la survenue de complications néoplasiques et du traitement. L'antécédent de cancer(s) serait associé à un enrichissement en lymphocytes Treg au stade final de leur différenciation (phénotype stable, effecteur mémoire et expression plus prononcée de CTLA4(+)).

3. Caractérisation phénotypique des lymphocytes T DP8 α

3.1. Enrichissement en T DP8 α selon le traitement immunosuppresseur et la survenue de complication(s) néoplasique(s)

Chez les donneurs sains, la fréquence de T DP8 α parmi les lymphocytes T CD3(+) est de $0,58 \pm 0,15$ %.

Chez les patients, celle-ci est variable, représentant $1,35 \pm 0,39$ % des lymphocytes T CD3(+).

Bien que non significative, nous observons une augmentation de la fréquence de T DP8 α chez les patients ayant présenté au moins un cancer ($2,4 \pm 1$ %) par rapport aux donneurs sains et aux patients n'ayant jamais présenté de cancer (**Figure 7**).

Les patients traités par Aza présentent aussi une hausse de la fréquence de ces lymphocytes à $4,8 \pm 2,6$ % (**Figure 7**). Deux patients en particulier, traités par Aza, transplantés tous les deux depuis 39 ans et ayant pour antécédent un ou plusieurs cancers cutanés post-transplantation, présentent une fréquence très augmentée de T DP8 α (15,7 et 9,4 %).

Des prélèvements répétés chez un de ces patients (n°52) ont révélé une augmentation systématique de la fréquence des T DP8 α par rapport aux donneurs sains, bien que variable dans le temps, allant de 4 à 22,8 % des lymphocytes T CD3(+).

Tableau 5. Fréquence moyenne de T DP8 α parmi les lymphocytes T CD3(+) chez les donneurs sains et les patients selon la survenue ou non de cancer(s) et le traitement immunosuppresseur

	Donneurs sains n=15	Patients			
		Sans cancer n=34	Avec cancer(s) n=19	CNI n=47	Aza n=6
% DP8 α (moyenne \pm écart type)	0,58 \pm 0,15	0,73 \pm 0,2	2,4 \pm 1	0,9 \pm 0,2	4,8 \pm 2,6

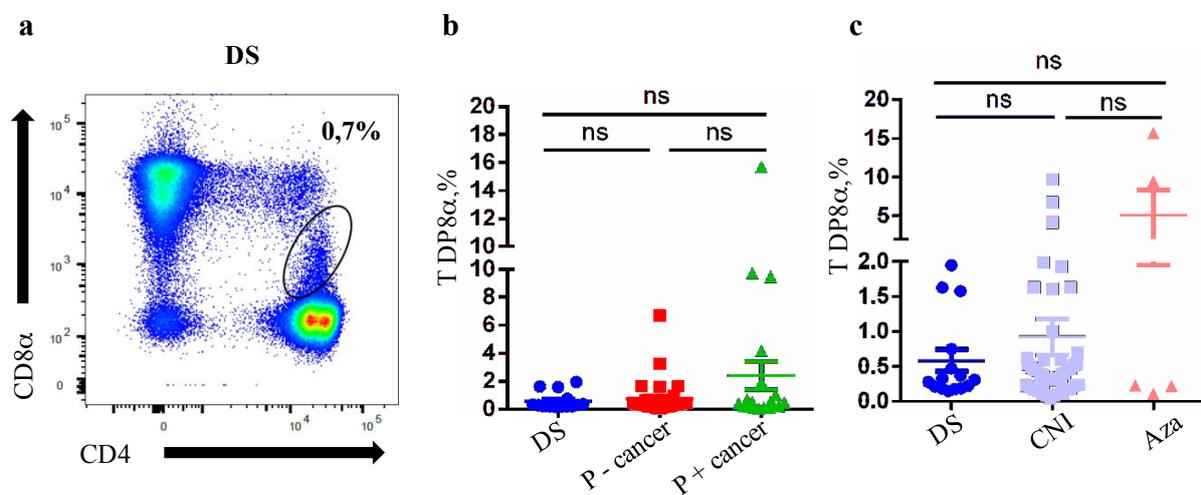


Figure 7. Analyse de la proportion de lymphocytes T DP8 α au sein des lymphocytes T CD3(+)

- Exemple d'analyse par cytométrie en flux de la population de lymphocytes T DP8 α chez un donneur sain
- Comparaison de la fréquence des lymphocytes T DP8 α au sein des lymphocytes T CD3(+) entre les donneurs sains (n=15), les patients sans cancer (n=34) et les patients avec cancer (n=19) (Mann-Whitney test ; DS vs P - cancer p=0,77, P - cancer vs P + cancer p=0,53, DS vs P + cancer p=0,62)
- Comparaison de la fréquence des lymphocytes T DP8 α au sein des lymphocytes T CD3(+) entre les donneurs sains (n=15), les patients CNI (n=47) et les patients Aza (n=6) (Mann-Whitney test ; DS vs CNI p=0,75, CNI vs Aza p=0,47, DS vs Aza p=0,39)

3.2. Profil d'expression des T DP8 α chez les patients et les donneurs sains

Nous avons ensuite cherché à déterminer le profil d'expression de certains marqueurs par les T DP8 α chez les patients comme chez les donneurs sains, en le comparant à celui des Treg et des lymphocytes T CD4(+) CD8(-) (**Figure 8**).

Chez les patients comme chez les donneurs sains, les T DP8 α n'expriment ni le facteur de transcription Foxp3, ni la molécule de costimulation négative CTLA4, ni l'ectoenzyme CD39, suggérant des mécanismes d'action immunosuppresseurs différents de ceux des Treg. De plus, à l'inverse des Treg, les T DP8 α expriment la chaîne alpha du récepteur de l'IL-7 (CD127).

S'il est bien documenté que les Treg peuvent présenter des caractéristiques phénotypiques mémoires, attestées par l'expression du facteur de transcription Helios, ou bien naïves attestées par leur expression de CD45RA, on ne retrouve dans notre travail aucune expression de ces marqueurs par la population de T DP8 α , chez les patients comme chez les donneurs sains.

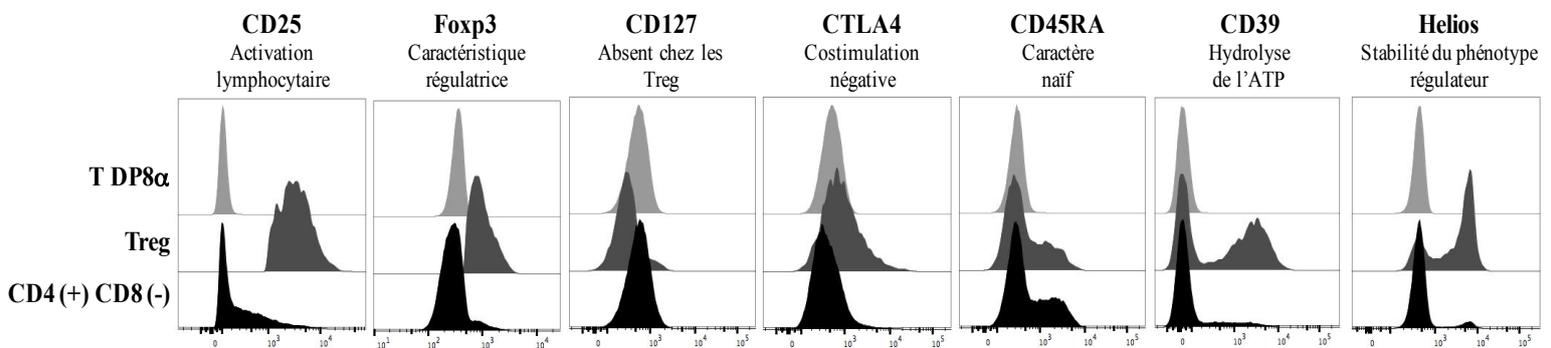


Figure 8. Comparaison de l'expression des marqueurs membranaires CD25, CD127, CTLA4, CD45RA et CD39 et des facteurs de transcription Foxp3 et Helios entre les lymphocytes T CD4(+) CD8(-), les Treg et les lymphocytes T DP8 α , exemple d'un patient représentatif

Discussion

Dans ce travail, nous avons cherché à décrire deux populations lymphocytaires T immunorégulatrices chez des patients transplantés rénaux « tolérants » sous immunosuppression minimisée.

Cette cohorte de patients présente plusieurs particularités. Il s'agit de patients bénéficiant d'une immunosuppression minimisée comportant des traitements hors « standard of care » et, pour certains, ayant présenté un ou plusieurs événements néoplasiques. L'étude des populations immunorégulatrices de cette cohorte peut se faire de 2 manières différentes : premièrement en analysant les populations immunorégulatrices selon la survenue d'un événement néoplasique (problématique de la perte de l'immunosurveillance en transplantation rénale) ou deuxièmement en analysant l'impact du traitement immunosuppresseur sur ces populations.

Concernant les Treg, nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux modifications, tant quantitatives que phénotypiques, de cette population selon la survenue ou non d'événement(s) néoplasique(s).

D'un point de vue quantitatif, nous avons mis en évidence une diminution de la fréquence de Treg chez les patients n'ayant jamais présenté de cancer par rapport aux patients ayant présenté au moins une complication néoplasique et aux donneurs sains. Deux hypothèses sont possibles devant ces résultats. La première est que le développement des Treg chez les patients induit une perte de l'immunosurveillance des cancers. La seconde est que la tumeur chez ces patients est elle-même responsable d'une augmentation de la fréquence des Treg par immunosubversion du système immunitaire.

Un travail mené par l'équipe de K. Wood a permis d'observer une augmentation de la fréquence de Treg circulants chez des patients transplantés rénaux présentant des carcinomes cutanés²³. La cohorte étudiée présentait des caractéristiques proches de la nôtre, pour ce qui concerne le nombre d'années d'immunosuppression et les schémas thérapeutiques, associant CsA ou Aza et faibles doses de stéroïdes. Poursuivant ces travaux sur une cohorte australienne de patients transplantés rénaux, l'équipe de R.P. Carroll²⁰ a confirmé les résultats observés au sein de la cohorte anglaise, suggérant que le nombre de lymphocytes Treg serait un facteur prédictif de la survenue de cancers cutanés chez ces patients. Ces différents résultats orientent donc vers notre première hypothèse, c'est-à-dire qu'il existerait une perte de

l'immunosurveillance secondaire au développement des Treg chez certains patients transplantés rénaux.

D'un point de vue phénotypique, nous avons mis en évidence des modifications des Treg selon la survenue ou non d'événement néoplasique. Les patients sans complication néoplasique présentent une fréquence moindre de Treg au phénotype stable Helios(+) ainsi que de Treg effecteurs mémoires CD45RA(-) Foxp3(Hi) par rapport aux donneurs sains et aux patients avec cancer. La perte de l'immunosurveillance des cancers chez ces patients pourrait donc être liée à la stabilité du phénotype Treg et à leur différenciation effectrice mémoire. Les travaux des équipes de l'équipe nantaise en transplantation et de H. Cantor ou de S. Sakaguchi en immunorégulation ont mis l'accent sur l'importance d'étudier les critères de stabilité du phénotype Treg^{7,8}. L'équipe de Nantes en particulier a montré chez les patients transplantés rénaux présentant un état de tolérance opérationnelle une augmentation de la fréquence de Treg effecteurs mémoire CD45RA(-) Foxp3(Hi), tandis que les travaux d'Azharuddin *et al.* ont montré que les Treg présents dans l'environnement tumoral immédiat de cancers pulmonaires exprimaient de manière plus prononcée le facteur de transcription Helios²⁴.

D'un point de vue fonctionnel, nos résultats évoquent une capacité suppressive accrue des Treg chez les patients, en particulier chez les patients avec cancer, par rapport aux donneurs sains (fréquence accrue de Treg CTLA4(+)). Le rôle de la molécule de costimulation négative CTLA4 dans les fonctions suppressives des Treg est bien décrit. Il a été montré que l'expression de CTLA4 par les Treg permettait l'inhibition des cellules présentatrices d'antigènes¹⁰. Par ailleurs, chez les patients transplantés en état de tolérance opérationnelle, l'équipe de Nantes a montré une majoration de l'expression de CTLA4 par les Treg⁸. Enfin, il a été montré qu'il existait une expression accrue de CTLA4 par les lymphocytes T CD4(+) de l'environnement tumoral de cancers pulmonaires, ainsi qu'une corrélation entre l'expression des facteurs de transcription Foxp3 et Helios par ces lymphocytes et l'expression de CTLA4²⁴. Ces données renforcent l'hypothèse d'un rôle de la molécule CTLA4 dans la perte de l'immunosurveillance antitumorale en transplantation ainsi que dans le développement d'un état de « tolérance » sous immunosuppression minimisée.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux modifications quantitatives et phénotypiques des Treg selon le traitement immunosuppresseur d'entretien employé.

Sur le plan quantitatif, notre travail met en évidence une modulation de la fréquence de Treg selon le traitement immunosuppresseur d'entretien. Nous constatons une augmentation de la fréquence de Treg chez les patients traités par Aza, à l'inverse des patients traités par CNI qui présentent une diminution de cette fréquence. Plusieurs travaux ont démontré une diminution de la fréquence de Treg chez les patients transplantés traités par CNI par rapport aux patients traités par un inhibiteur de mTOR comme la rapamycine^{25,26}. Par ailleurs, il a été montré *in vitro* que le traitement par CNI inhibait la transcription du gène Foxp3 au sein des lymphocytes T CD4(+) CD25(+) humains, contrairement au traitement par rapamycine qui n'avait pas d'effet sur la transcription²⁷.

Sur le plan phénotypique, nos résultats suggèrent aussi une modulation du phénotype Treg liée au traitement immunosuppresseur d'entretien. Le traitement par Aza dans notre étude est associé à une hausse de la fréquence de Treg au phénotype stable Helios(+) par rapport aux patients CNI. L'équipe de K.Wood n'a pas différencié dans son travail les caractéristiques immunologiques selon le traitement immunosuppresseur employé²³. Un travail récent s'est intéressé à la modulation de la réponse immunitaire T effectrice et régulatrice par les CNI et les inhibiteurs de mTOR chez des patients transplantés rénaux présentant des carcinomes cutanés non mélanomes²⁸. Ce travail a mis en évidence une proportion moindre de Treg circulants et intratumoraux chez les patients traités par CNI par rapport aux patients traités par inhibiteur de mTOR. Par ailleurs, la réponse spécifique T anti-tumorale (production d'IFN- γ) était moindre chez les patients CNI par rapport aux patients traités par inhibiteur de mTOR. La conversion du traitement CNI pour un traitement par inhibiteur de mTOR permettait une augmentation significative à un an du nombre de Treg circulants ainsi que de la réponse spécifique T anti-tumorale

Concernant les lymphocytes T DP8 α , l'implication de cette population récemment décrite dans la survenue de la tolérance en transplantation ou de la perte de l'immunosurveillance n'a pour le moment pas été étudiée.

Nos résultats montrent une augmentation de la fréquence des lymphocytes T DP8 α chez certains patients ayant présenté au moins un cancer et/ou traités par Aza, mais cette population lymphocytaire T immunorégulatrice demande à être plus précisément définie.

En ce qui concerne le phénotype de ces cellules, nous avons démontré qu'à l'inverse des Treg les T DP8 α n'exprimaient pas le facteur de transcription Foxp3 et exprimaient CD127, chaîne α du récepteur de l'IL-7, comme précédemment établi par les travaux de Sarrabayrouse *et al.* ¹⁹. L'augmentation des lymphocytes T DP8 α est particulièrement prononcée chez 2 patients étudiés (n°2 et n°52), suggérant l'existence d'autres facteurs modulant cette population lymphocytaire.

Parmi les autres facteurs pouvant influencer le développement des populations immunorégulatrices étudiées, une des pistes prometteuses réside dans l'analyse du microbiote intestinal. Il a été démontré par l'équipe de Sarrabayrouse que les lymphocytes T DP8 α de la lamina propria colique proliféraient en présence de monocytes présentant des déterminants antigéniques de *Faecalibacterium prausnitzii*, une espèce appartenant au phylum des *Clostridiales*, présente dans le microbiote digestif colique de sujets sains ¹⁹. Par ailleurs, *F. prausnitzii* exerce des fonctions immunorégulatrices chez la souris, en induisant la production par des lymphocytes T d'IL-10 sans production d'IFN- γ ni d'IL-17 ²⁹. D'autres travaux ont montré chez la souris que les *Clostridiales* favorisaient la différenciation des Treg ³⁰ ou encore que la bactérie *Lactobacillus reuteri* induisait la reprogrammation de lymphocytes T CD4(+) intra-épithéliaux de l'intestin en lymphocytes immunorégulateurs T DP8 α ³¹.

D'autre part, les traitements immunosuppresseurs administrés pourraient jouer indirectement un rôle dans la génération des populations régulatrices *via* des modifications du microbiote intestinal. Les travaux de Tourret *et al.* ont montré des modifications du microbiote chez des souris après administration de différents immunosuppresseurs (CNI, inhibiteur de mTOR et stéroïdes), notamment une réduction de la diversité des *Clostridiales* ³². Une analyse de la proportion de lymphocytes T DP8 α et de Treg présents dans la muqueuse intestinale ainsi que du microbiote intestinal des patients étudiés présentant une fréquence élevée de lymphocytes Treg et T DP8 α circulants serait donc intéressante.

Notre étude comprend plusieurs limites. Tout d'abord, le nombre de patients traités par Aza est réduit et doit donc rendre prudente l'interprétation des données. D'autre part, les patients présentés ici ont tous été transplantés il y a plus de 10 ans, et jusqu'à 30 ans pour

certain. À l'heure actuelle, les patients éligibles à la transplantation sont plus âgés, de même que les donneurs, ce qui accroît à la fois le risque de rejet, nécessitant un renforcement des thérapies immunosuppressives, mais aussi le risque de survenue de cancers. Enfin, notre travail s'est concentré sur l'étude de seulement 2 populations immunorégulatrices. Or, il est connu que les lymphocytes T immunorégulateurs ne sont pas les seuls acteurs de la tolérance immunitaire. D'autres populations lymphocytaires peuvent intervenir telles que les lymphocytes B régulateurs mais aussi des effecteurs de l'immunité innée tels que les cellules NK (*natural killer*), les cellules myéloïdes suppressives ou les lymphocytes iNKT (*invariant natural killer T lymphocytes*)^{33,34}.

Il existe différents moyens de compléter ce travail. Tout d'abord, bien que ne pouvant être envisagée en pratique courante, une analyse systématique chez ces patients de l'ensemble des populations immunorégulatrices pouvant être impliquées dans la tolérance de greffe et la perte de l'immunosurveillance des cancers serait informative. Dans un second temps, nous souhaitons étudier l'environnement péri-tumoral des carcinomes cutanés présentés par les patients transplantés sous immunosuppression minimisée. L'objectif serait de rechercher les Treg et T DP8 α infiltrant le tissu péri-tumoral *via* des techniques de microscopie confocale et d'immunofluorescence et d'analyser l'expression des différents marqueurs étudiés dans ce travail.

Les résultats de notre travail pourraient s'inscrire dans une stratégie d'immunomonitoring des patients. L'étude de ces deux populations lymphocytaires réalisée de manière prospective chez les patients transplantés rénaux pourrait constituer une aide à la décision de minimisation des thérapies immunosuppressives. Les résultats pourraient s'intégrer dans un score visant à évaluer le risque immunologique de chaque patient comportant par ailleurs la recherche d'anticorps anti-HLA de type DSA, l'analyse de la ponction biopsie du greffon...*etc.* L'objectif de cette stratégie étant de limiter au maximum le risque de survenue de complication néoplasique.

En conclusion, notre travail suggère que les patients transplantés rénaux stables sous immunosuppression minimisée présentent une signature phénotypique propre aux populations lymphocytaires immunorégulatrices, favorisant la survenue d'un état proche de la « tolérance ». Ce phénotype est caractérisé par un enrichissement en lymphocytes Treg, en particulier Treg au stade final de différenciation, et possiblement en lymphocytes T DP8 α . La génération de ces populations régulatrices pourrait être influencée par la nature du traitement immunosuppresseur administré et associée à la survenue de complications néoplasiques. Ce travail illustre donc le caractère ambivalent de ces populations régulatrices qui permettent, d'une part, d'acquérir un profil tolérant et de meilleurs résultats à long terme de la transplantation d'organe mais sont responsables, d'autre part, de complications néoplasiques par défaut d'immunosurveillance.

Enfin, ce travail est un exemple de recherche translationnelle en transplantation rénale, mettant en lien direct le patient et son devenir avec l'immunologie fondamentale.

Références bibliographiques

1. Katabathina VS, Menias CO, Tammiseti VS, et al. Malignancy after Solid Organ Transplantation: Comprehensive Imaging Review. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc.* 2016;36(5):1390-1407.
2. Wisgerhof HC, van der Geest LGM, de Fijter JW, et al. Incidence of cancer in kidney-transplant recipients: a long-term cohort study in a single center. *Cancer Epidemiol.* 2011;35(2):105-111.
3. Webster AC, Craig JC, Simpson JM, Jones MP, Chapman JR. Identifying High Risk Groups and Quantifying Absolute Risk of Cancer After Kidney Transplantation: A Cohort Study of 15 183 Recipients. *Am J Transplant.* 2007;7(9):2140-2151.
4. Thierry A, Lemeur Y, Ecotièrè L, et al. Minimization of maintenance immunosuppressive therapy after renal transplantation comparing cyclosporine A/azathioprine or cyclosporine A/mycophenolate mofetil bitherapy to cyclosporine A monotherapy: a 10-year postrandomization follow-up study. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant.* 2016;29(1):23-33.
5. Sakaguchi S, Sakaguchi N. Thymus and autoimmunity: capacity of the normal thymus to produce pathogenic self-reactive T cells and conditions required for their induction of autoimmune disease. *J Exp Med.* 1990;172(2):537-545.
6. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med.* 2001;193(11):1295-1302.
7. Kim H-J, Barnitz RA, Kreslavsky T, et al. Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. *Science.* 2015;350(6258):334-339.
8. Braza F, Dugast E, Panov I, et al. Central Role of CD45RA- Foxp3hi Memory Regulatory T Cells in Clinical Kidney Transplantation Tolerance. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2015;26(8):1795-1805.
9. Nakagawa H, Sido JM, Reyes EE, Kiers V, Cantor H, Kim H-J. Instability of Helios-deficient Tregs is associated with conversion to a T-effector phenotype and enhanced antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(22):6248-6253.
10. Braza F, Durand M, Degauque N, Brouard S. Regulatory T Cells in Kidney Transplantation: New Directions? *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2015;15(9):2288-2300.
11. Yang J, Fan H, Hao J, et al. Amelioration of acute graft-versus-host disease by adoptive transfer of ex vivo expanded human cord blood CD4+CD25+ forkhead box protein 3+ regulatory T cells is associated with the polarization of Treg/Th17 balance in a mouse model. *Transfusion (Paris).* 2012;52(6):1333-1347.

12. Sabbatini M, Ruggiero G, Palatucci AT, et al. Oscillatory mTOR inhibition and Treg increase in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol*. 2015;182(2):230-240.
13. Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, et al. Clinical Operational Tolerance after Kidney Transplantation: “Operationally Tolerant” Kidney Recipients. *Am J Transplant*. 2006;6(4):736-746.
14. Ashton-Chess J, Giral M, Brouard S, Souillou J-P. Spontaneous Operational Tolerance After Immunosuppressive Drug Withdrawal in Clinical Renal Allograft Transplantation. *Transplantation*. 2007;84(10):1215-1219.
15. Louis S, Braudeau C, Giral M, et al. Contrasting CD25hiCD4+T Cells/FOXP3 Patterns in Chronic Rejection and Operational Drug-Free Tolerance. *Transplantation*. 2006;81(3):398-407.
16. Baron U, Floess S, Wiczorek G, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(9):2378-2389.
17. Chesneau M, Pallier A, Braza F, et al. Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2014;14(1):144-155.
18. Pallier A, Hillion S, Danger R, et al. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int*. 2010;78(5):503-513.
19. Sarrabayrouse G, Bossard C, Chauvin J-M, et al. CD4CD8 $\alpha\alpha$ lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease. *PLoS Biol*. 2014;12(4):e1001833.
20. Hope CM, Grace BS, Pilkington KR, Coates PT, Bergmann IP, Carroll RP. The immune phenotype may relate to cancer development in kidney transplant recipients. *Kidney Int*. 2014;86(1):175-183.
21. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci Transl Med*. 2013;5(200):200ra116.
22. Saito T, Nishikawa H, Wada H, et al. Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat Med*. 2016;22(6):679-684.
23. Carroll RP, Segundo DS, Hollowood K, et al. Immune Phenotype Predicts Risk for Posttransplantation Squamous Cell Carcinoma. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(4):713-722.
24. Syed Khaja A, Toor S, El Salhat H, et al. Preferential accumulation of regulatory T cells with highly immunosuppressive characteristics in breast tumor microenvironment. *Oncotarget*. 2017.
25. De Serres SA, Sayegh MH, Najafian N. Immunosuppressive Drugs and Tregs: A

Critical Evaluation! *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(10):1661-1669.

26. Segundo DS, Ruiz JC, Izquierdo M, et al. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2006;82(4):550-557.
27. Baan CC, van der Mast BJ, Klepper M, et al. Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells. *Transplantation*. 2005;80(1):110-117.
28. Crespo E, Fernandez L, Lúcia M, et al. Effector Antitumor and Regulatory T Cell Responses Influence the Development of Nonmelanoma Skin Cancer in Kidney Transplant Patients. *Transplantation*. 2017;101(9):2102-2110.
29. Rossi O, van Berkel LA, Chain F, et al. Faecalibacterium prausnitzii A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses. *Sci Rep*. 2016;6:18507.
30. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science*. 2011;331(6015):337-341.
31. Cervantes-Barragan L, Chai JN, Tianero MD, et al. Lactobacillus reuteri induces gut intraepithelial CD4(+)CD8αα(+) T cells. *Science*. 2017;357(6353):806-810.
32. Turret J, Willing BP, Dion S, MacPherson J, Denamur E, Finlay BB. Immunosuppressive Treatment Alters Secretion of Ileal Antimicrobial Peptides and Gut Microbiota, and Favors Subsequent Colonization by Uropathogenic Escherichia coli. *Transplantation*. 2017;101(1):74-82.
33. Wortel CM, Heidt S. Regulatory B cells: Phenotype, function and role in transplantation. *Transpl Immunol*. 2017;41:1-9.
34. Barbarin A, Cayssials E, Jacomet F, et al. Phenotype of NK-Like CD8(+) T Cells with Innate Features in Humans and Their Relevance in Cancer Diseases. *Front Immunol*. 2017;8:316.

Résumé

Une des principales complications tardives des transplantations d'organes est l'apparition de néoplasies, expliquée par la perte de l'immunosurveillance anti-tumorale. Celle-ci peut être liée au développement de populations lymphocytaires T régulatrices, populations également impliquée dans la tolérance de greffe d'organe.

Nous avons étudié chez 53 patients transplantés rénaux depuis plus de 10 ans présentant une fonction rénale stable sous immunosuppression minimisée (azathioprine + stéroïdes ou ciclosporine A en monothérapie) les caractéristiques phénotypiques de deux populations T régulatrices, les lymphocytes Treg et T DP8 α .

L'objectif de ce travail était de montrer chez ces patients que les lymphocytes Treg et T DP8 α sont associés à la tolérance de greffe ainsi qu'à la survenue de complications néoplasiques.

Nous avons mis en évidence chez les patients tolérants ayant présenté au moins un cancer un enrichissement en Treg par rapport aux patients sans cancer ($6,3 \pm 0,6 \%$ vs $4,5 \pm 0,4 \%$, $p=0,06$). L'antécédent de cancer chez les patients est associé à un enrichissement en Treg au stade final de leur différenciation, c'est-à-dire au phénotype stable Helios(+), de type effecteurs-mémoires CD45RA(-) Foxp3(Hi) et exprimant de manière plus prononcée le marqueur de costimulation négative CTLA4. L'immunosuppression joue aussi un rôle dans le développement des Treg avec une hausse de la fréquence des Treg chez les patients Aza ($7,8 \pm 1 \%$) par rapport aux patients traités par CNI ($4,8 \pm 0,5 \%$, $p=0,01$) ainsi qu'une augmentation de la fréquence de Treg au phénotype stable et effecteurs mémoires. Par ailleurs, les patients ayant présenté un cancer et/ou traités par Aza présentent une tendance à l'augmentation de la fréquence de T DP8 α , en particulier chez 2 patients traités par Aza et ayant présenté un ou plusieurs cancers.

Notre travail suggère que les patients étudiés présentent un phénotype favorisant la survenue d'un état proche de la « tolérance », caractérisé par un enrichissement en populations lymphocytaires T régulatrices et pouvant être associé à la perte de l'immunosurveillance anti-tumorale en transplantation rénale.



Faculté de Médecine et de
Pharmacie

SERMENT



En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

