

UPMC
PARIS UNIVERSITAS
B. Bellier

UPMC BMC423 IF

Tolérance Immunitaire:
Mécanismes de tolérance périphérique

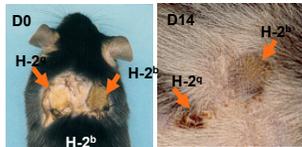
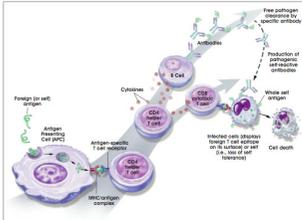
Bertrand Bellier
UPMC UMR7211
Immunology Immunopathology Immunotherapy
Pitié-Salpêtrière - Paris - France
bertrand.bellier@upmc.fr



UPMC
PARIS UNIVERSITAS
B. Bellier

Tolérance immunitaire

- Propriété essentielle du système immunitaire
- Assure la discrimination du soi / non-soi
- Tolérance naturelle
 - La tolérance naturelle au soi a été acquise après des centaines de millions d'années d'évolution qui ont sélectionné des récepteurs permettant de différencier les produits microbiens ou les cellules infectées des produits du soi ...
- Tolérance induite
 - Induction d'une non-réactivité immunitaire contre le non-soi
 - **Naturellement:** Infections chroniques
 - **Artificiellement:** Immunothérapies actives
- Conséquences:
 - Tolérance au soi
 - Réponse immunitaire et élimination des pathogènes
 - Rejet des greffes allogéniques
 - En cas de rupture de la tolérance : Maladies Auto Immunes

UPMC
PARIS UNIVERSITAS
B. Bollier

Rupture de Tolérance / Rejet du soi

- **Maladies auto-immunes:**
 - EX: les thyroidites auto-immunes, la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante, le diabète type 1, la maladie de Crohn, etc...

Insulin excreted into bloodstream
Blood capillary
Insulin-producing cells
Insulin-producing cells destroyed

Catheter
Skin
Insuline
Pump
Catheter
Pompe à insuline

Une pompe à insuline administre l'insuline par un cathéter dans le gras sous-cutané (l'abdomen, la fesse, la cuisse, etc.)
Une dose d'insuline est programmée pour couvrir les besoins selon (l'avis de l'adulte).
L'utilisateur doit activer sa pompe pour administrer la dose couvrant son repas (bolus).

UPMC
PARIS UNIVERSITAS
B. Bollier

Cette absence de réponse aux Ag du soi est assurée par différents mécanismes

TOLERANCE CENTRALE

TOLERANCE PERIPHERIQUE

Mécanismes actifs

Mécanismes passifs

Ignorance Privilège Tolérance dominante Anergie Deletion

UPMC
PARIS UNIVERSITAS
B. Boillier

Tolérance centrale

- Cf cours A. Six
- Etape déterminante de l'ontogénie lymphocytaire
- Tolérance T (thymus) et B (MO)
- Ontogénie T:
 - Sélection du répertoire disponible sur la base du CMH-AgSoi
 - Absence de sélection des clones non-fonctionnels (non-restreints au CMH)
 - Élimination des clones de forte affinité pour CMH-AgSoi

Diagram illustrating central tolerance: Réarrangement aléatoire (VDJ) + Sélection centrale leads to a Répertoire disponible. This is followed by Événements périphériques (Super-antigènes, Contraction clonale, Expansion clonale).

Graph (a) shows TCR affinity vs Cell number in the Thymus (Thymocyte) and Periphery (Peripheral T cell). Graph (b) shows % positively selected thymocytes vs Apparent affinity, with an Apparent affinity threshold. Legend: Death by neglect (grey), Positive selection (blue), Negative selection (red).

Nature Reviews | Immunology

UPMC
PARIS UNIVERSITAS
B. Boillier

Présence de lymphocytes autoréactifs en périphérie: un danger potentiel

Mécanismes de tolérance centrale

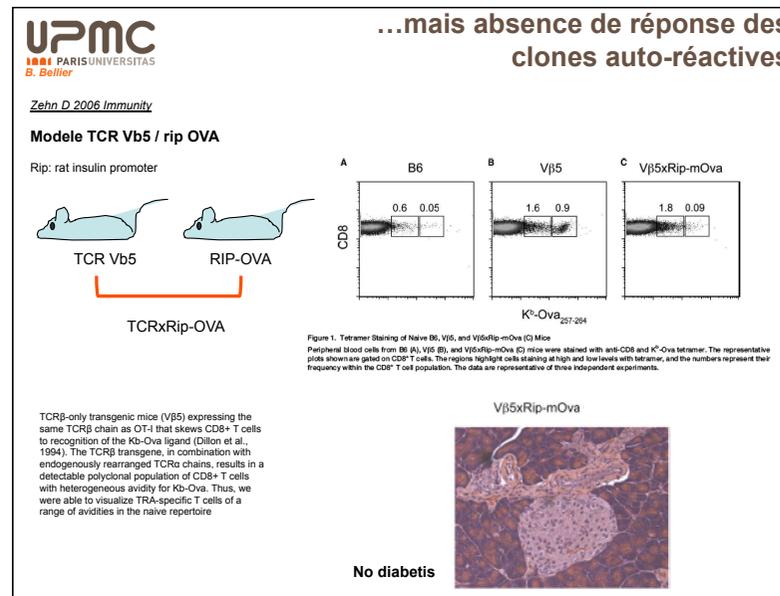
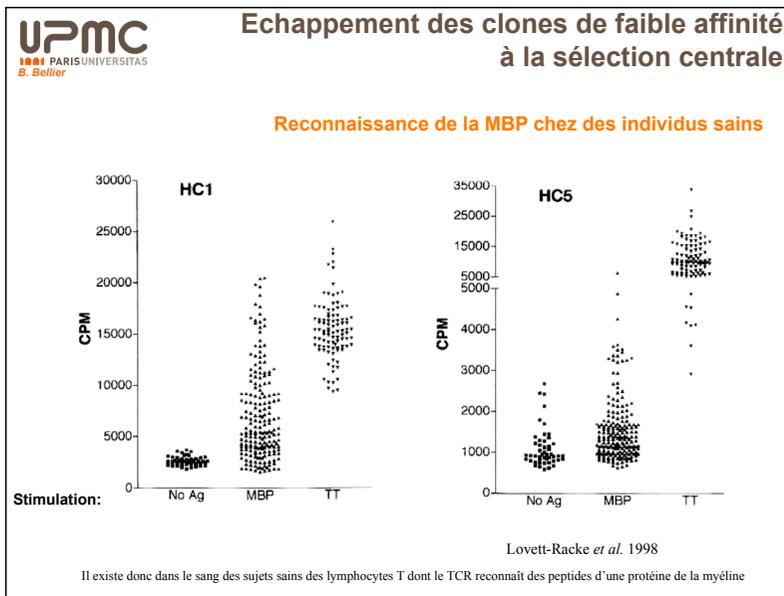
STOP

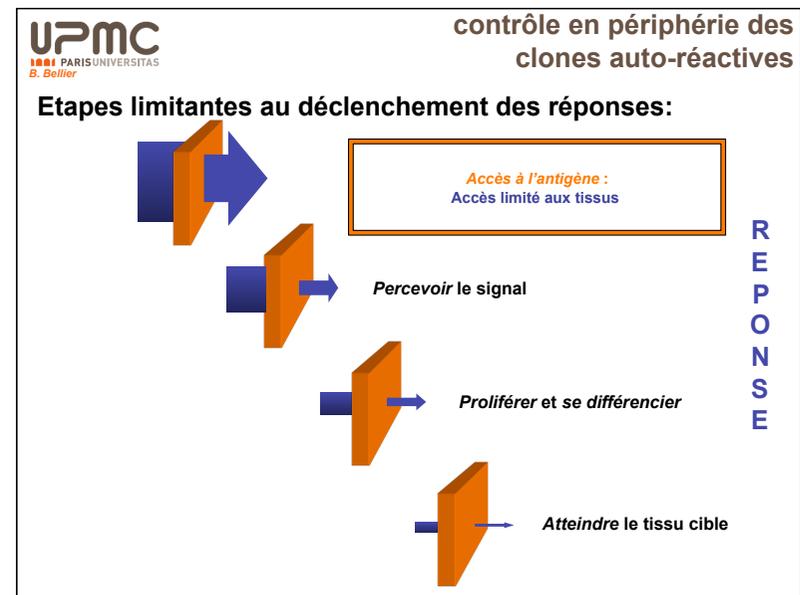
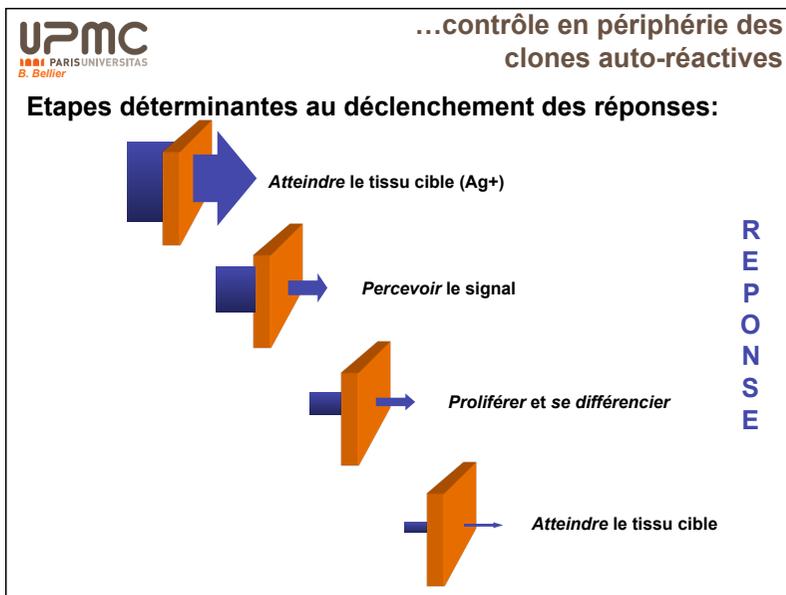
Insuffisants

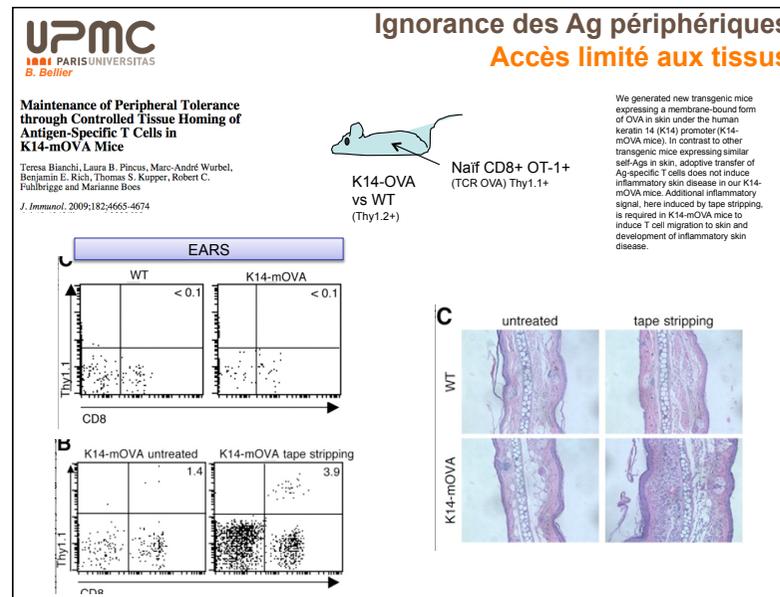
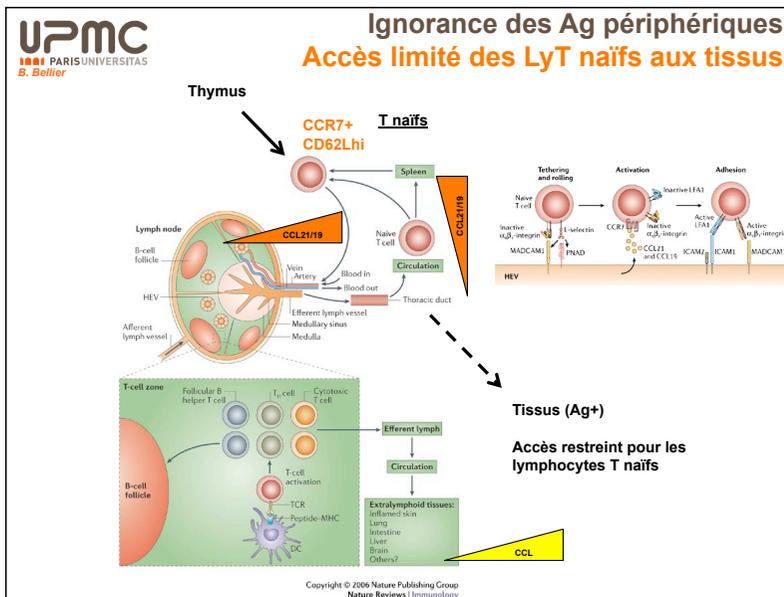
"L'armée" de moyens de contrôles périphériques

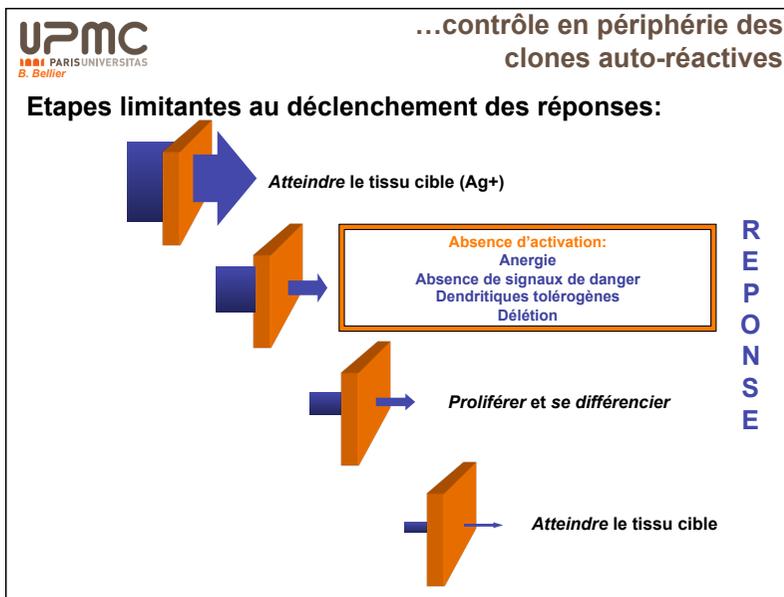
Clones de faible à moyenne affinité pour CMH-AgSoi

The slide uses a cartoon to illustrate the concept: a 'STOP' sign and the word 'Insuffisants' (insufficient) are shown next to the text 'Mécanismes de tolérance centrale'. Below, it says '"L'armée" de moyens de contrôles périphériques' (The army of peripheral control mechanisms) and 'Clones de faible à moyenne affinité pour CMH-AgSoi' (Clones of low to medium affinity for self-MHC-Ag). The cartoon shows two police officers and a soldier, suggesting a lack of sufficient control mechanisms.









UPMC PARIS UNIVERSITÉS
B. Boillier

Rôle des molécules de costimulation dans le contrôle de la réactivité

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 107, pp. 1117-1121, April 2010
doi:10.1073/pnas.0910000107

Mice expressing both B7-1 and viral glycoprotein on pancreatic beta cells along with glycoprotein-specific transgenic T cells develop diabetes due to a breakdown of T-lymphocyte unresponsiveness

DAVID M. HALLAM^{1,2}, HANG HONGGANG¹, MARI L. HUANG¹, YUAN-HUI KANG¹, RUY AN¹, RANDALL W. MORGENTHAU¹, HANSPETER FUCHS¹, GRAY S. GRAY¹, PAMELA S. OSAMU¹, GORDON J. FRIEDMAN^{1,2}, LIAO M. NARLEM¹, CAROL H. JOSE¹, AND PETER ACHTEL¹

TCR RIP-GP RIP-B7.1 (B7.1 = CD80)

GP-TCR GP-B7-TCR

Transgenic mouse line	Animal no.	Proportion with diabetes	Age
B7-GP	27	0/27	4 weeks–11 months
B7-TCR	36	0/36	4 weeks–11 months
GP-TCR	24	0/24	4 weeks–11 months
GP-B7-TCR	14	14/14	7–14 weeks at onset of hyperglycemia

Hematoxylin/eosin **Insulin**

GP-TCR (A, B)
GP-B7 (C, D)
GP-B7-TCR (E, F)
GP-B7-TCR (G, H)

FIG. 2. Histologic analysis of double (GP-TCR and B7-GP) and triple (GP-B7-TCR) transgenic mice. Photos are paired and are stained as follows: Hematoxylin/eosin (Left) and antiinsulin antibodies (Right). Sections from GP-TCR animals (A and B) and from B7-GP animals (C and D) reveal normal islet architecture, no lymphocytic infiltrate, and normal immunostaining for insulin. Sections from prediabetic (E and F) and diabetic (G and H) triple-transgenic mice reveal an intense lymphocytic infiltrate and a loss (F) or absence (H) of islet cells staining for insulin.

UPMC
UNIVERSITÄT PARIS
B. Bellier

Anergie

Pas d'activation T en l'absence de molécules de co-stimulation

Nature Reviews | Immunology

UPMC
UNIVERSITÄT PARIS
B. Bellier

Anergie: Un état de non-réponse réversible par l'IL-2

Induction of T cell anergy in the absence of CTLA-4/B7 interaction.
J Immunol. 2000 Mar 15;164(6):2987-93.

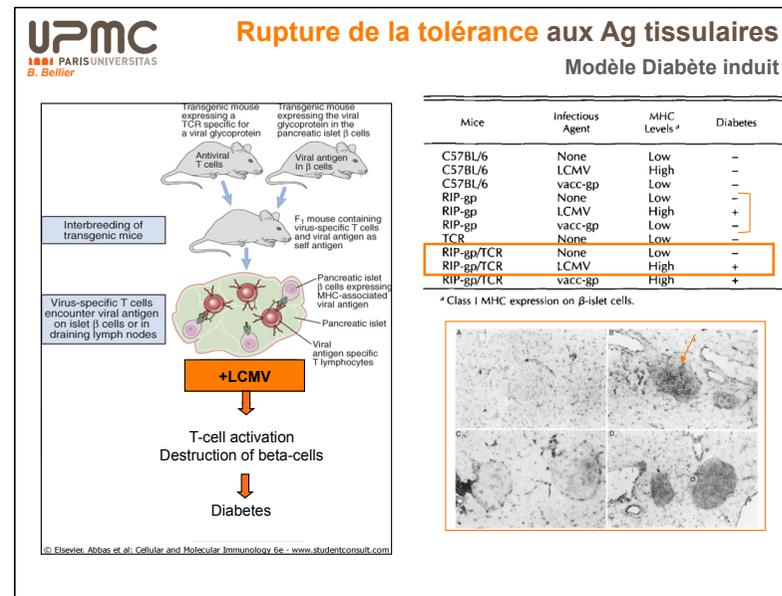
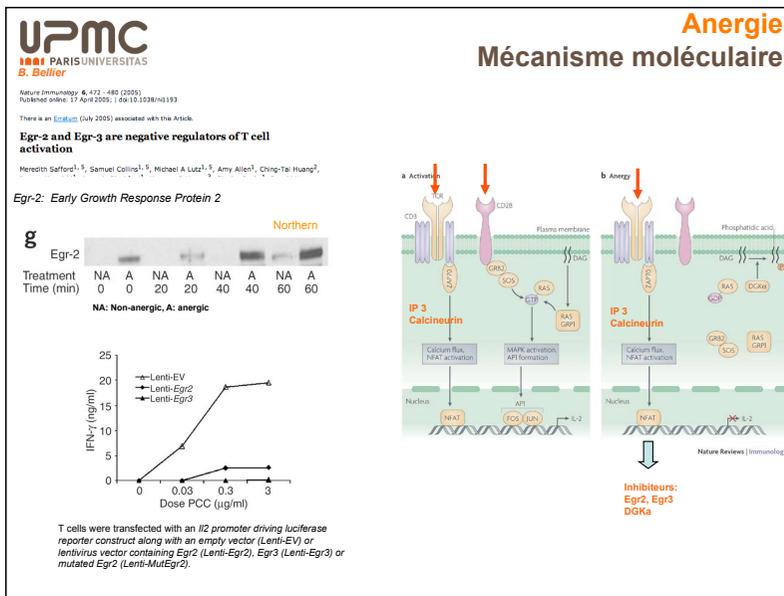
In vitro

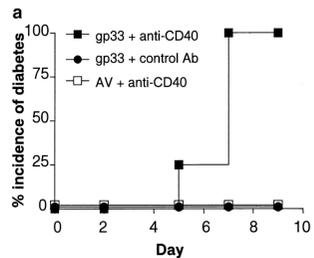
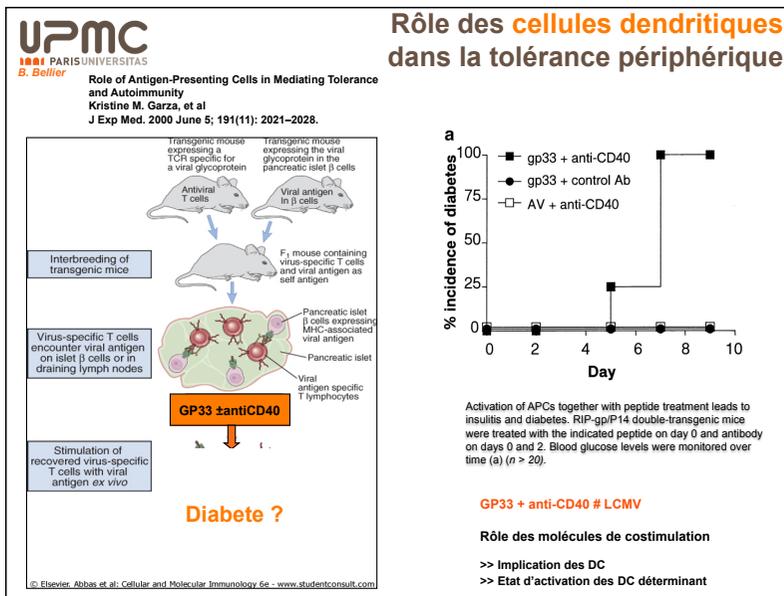
In vivo

Anergized cells enter cell cycle, but arrest in G₁ phase upon restimulation.

Absence of co-stimulation and not the intensity of TCR signaling is critical for the induction of T cell unresponsiveness *in vivo*
Martin F. Bachmann¹, Daniel E. Speiser², Tak W. Mak¹ and Pamela S. Ohashi²

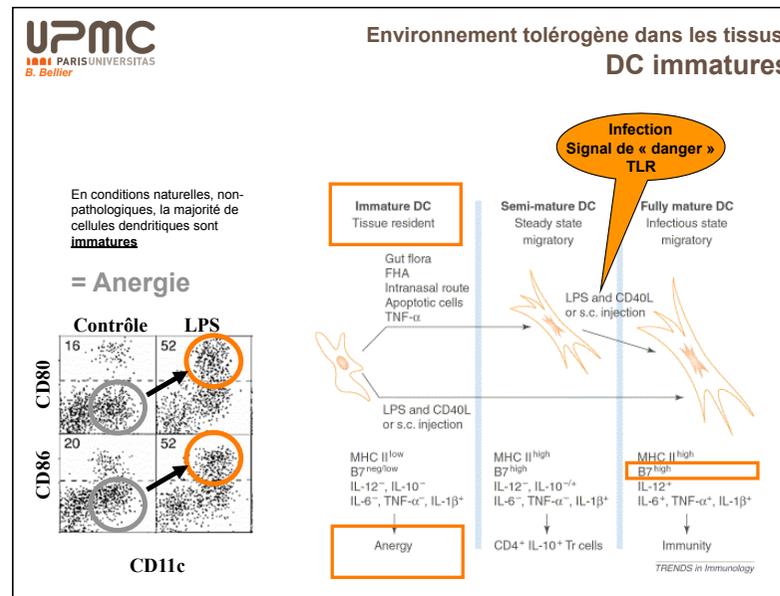
Figure 7. Blocking CD28 with CTLA-4-Ig induces T cell unresponsiveness *in vivo* after peptide injection. TCR-transgenic mice were immunized i.v. with 1 µg peptide and at the same time treated on 3 consecutive days with 50 µg CTLA-4-Ig or saline. Three days later, single-cell suspensions were prepared from spleens and cells were restimulated with p33-pulsed APC *in vitro*. Proliferation was assessed 2 days later by [³H]thymidine incorporation. One representative experiment of two is shown.

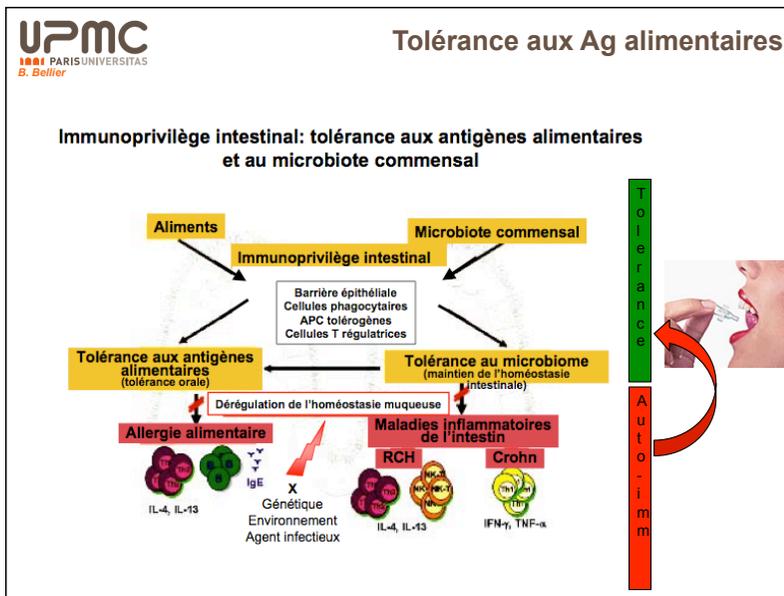




Activation of APCs together with peptide treatment leads to insulinitis and diabetes. RIP-gp/P14 double-transgenic mice were treated with the indicated peptide on day 0 and antibody on days 0 and 2. Blood glucose levels were monitored over time (a) ($n > 20$).

GP33 + anti-CD40 # LCMV
Rôle des molécules de costimulation
>> Implication des DC
>> Etat d'activation des DC déterminant





UPMC
PARIS UNIVERSITÉS
B. Boillier

Activation périphérique contre les Ag du soi

Excès d'activation induit l'AICD

- Délétion clonale des clones activés « chroniquement » par CMH-AgSoi
- Modèles d'immunisation témoin de l'influence de la dose antigénique sur l'immunogénicité
- Mécanisme d'AICD
Activation Induced Cell Death
- Différents mécanismes moléculaires de délétions
- Fas
- Bim

T Cell Priming Versus T Cell Tolerance Induced by Synthetic Peptides
By Peter Aichele, Karin Brduscha-Riem, Rolf M. Zinkernagel, Hans Hengartner, and Hanspeter Pircher

Influence of the route

No protection (arrow pointing to graph A)

Protection (arrow pointing to graph B)

Repetitive injection of high Ag dose = No protection (arrow pointing to graph C)

Repetitive injection of high Ag dose = No protection (arrow pointing to graph D)

Figure 1. Parameters defining peptide-induced priming or tolerance of CTL. C57BL/6 mice were immunized with different amounts of GP33 peptide emulsified in IFA, once s.c. (A) or i.p. (B) or three times at 3-d intervals s.c. (C) or i.p. (D). 10 d after the last peptide administration, mice were challenged s.c. with 200 PFU LCMV:WE, and virus titer in the spleen was analyzed 4 d later. Data represent values from individual mice (five animals per group). Deletion level is indicated as a dotted line.

UPMC
PARIS UNIVERSITAS
B. Bellier

Implication de Fas dans le contrôle de la réactivité des T spécifiques des Ag Soi

Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis
 Re. Watanabe-Fukunaga, Camlynm I. Braman, Neal G. Copeland, Nancy A. Jenkins & Shizuko Nagata
* J Exp Med 185:1173-1178 (1997); ** Nature 386:317-321 (1993)

Lpr phenotype

factor receptor. Mice carrying the lymphoproliferation (*lpr*) mutation have defects in the Fas antigen gene. The *lpr* mice develop lymphadenopathy and suffer from a systemic lupus erythematosus-like autoimmune disease, indicating an important role for Fas antigen in the negative selection of autoreactive T cells in the thymus.

ARN
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 MLR C3H
 + lpr + lpr + lpr + lpr
 ← 28S
 ← 18S

liver Thym liver Thym

Déletion clonale
 Mécanisme actif de tolérance périphérique

UPMC
PARIS UNIVERSITAS
B. Bellier

...contrôle en périphérie des clones auto-réactives

Etapas limitantes au déclenchement des réponses:

Atteindre le tissu cible (Ag+)

Percevoir le signal

Proliférer et se différencier
 Contrôle des réponses inflammatoires (rôle des cytokines)
 Populations suppressives
 LyT régulateurs

Atteindre le tissu cible

UPMC
PARIS UNIVERSITAS
B. Boillier

Cytokine: le 3eme signal d'activation

"Non-self" : activation

Professional Antigen Presentation
eg. CD28/B7 etc

Inflammatory Environment
eg. IFN- γ , IL-2 etc

Immunological tissues
eg lymph-nodes

"Self" : tolerance

Non-professional Antigen Presentation
eg. No B7 present

Non-inflammatory Environment
eg. IL-4, 10, TGF- β etc

Normal self tissues
eg. pancreatic islets

UPMC
PARIS UNIVERSITAS
B. Boillier

Environnement cytokinique

Anti-inflammatoires

IL-10
TGF- β

Pro-inflammatoires

TNF α
IL-1
IL-6

IL-12
IL-18
IFN γ

Immature DC
MHC II^{hi}
B7^{hi}
IL-12, IL-10
IL-6, TNF- α , IL-1 β → Anergy, Treg **Anti-Infl**

Semi-mature DC
MHC II^{hi}
B7^{hi}
IL-12, IL-10
IL-6, TNF- α , IL-1 β → Treg

Mature DC
MHC II^{hi}
B7^{hi}
IL-12
IL-6, TNF- α , IL-1 β → Immunity **Pro-Infl**

CD40L, CpG, LPS

UPMC
PARIS UNIVERSITÉS
B. Boillier

Tolérance et cytokines

Patients with inflammatory bowel disease may have a transforming growth factor- β , interleukin (IL)-2, or IL-10-deficient state induced by intrinsic neutralizing antibodies. *C. Emer. Clin. Exp. Immunol.* 2009

Autoimmunity
 -IL-10-knockout mice develop an autoimmune colitis spontaneously, and TGF- β -knockout mice that develop a more extensive, multifocal autoimmunity

- **Default of IL-10 production in AID patients:**
 Colitis, Crohn disease: presence of cytokine-spe neutralizing Ab (Fig. 1)
 Serum samples (1:200 dilution) from patients with ulcerative colitis (UC) or Crohn's disease (CD) or from normal individuals were tested by enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies recognizing (a) transforming growth factor- β , (b) interleukin (IL)-2, (c) IL-10 or (d) IL-4.

-IL-10 inhibits colitis induction in mice (Fig. 2)

-IL-4: Systemic injection of IL-4, gene therapy with IL-4 and transgene expression of IL-4 in β cells of the islets of Langerhans each prevent the onset of diabetes in NOD mice

Mucosal tolerance
 Tolerance to ubiquitous environmental antigens, : high frequency of TGF- β + cells (Th3) that have suppressive functions

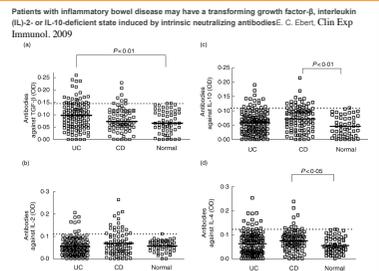
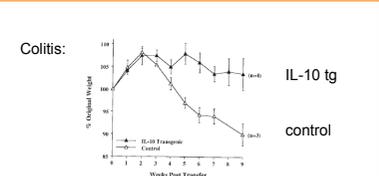



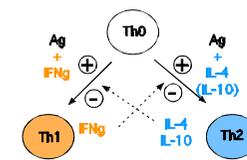
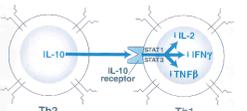
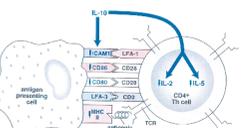
Figure 3: CD4⁺ CD45RO⁺ cells from IL-10 transgenic mice fail to induce colitis in SCID recipients. 4-5 x 10⁶ FACS⁺ sorted CD4⁺ CD45RO⁺ cells from IL-10 transgenic or control (immune mice) were injected into SCID mice. Weight gain was scored weekly for 8 wk. Values are shown as a percentage of original weight at day 0, the time of cell injection. Number of mice in each group is indicated in parentheses. Regression analysis of the two curves shown indicated the data to be highly significant, P = 0.0012. Similar results were obtained using Fag 2⁺ mice as T cell recipients.

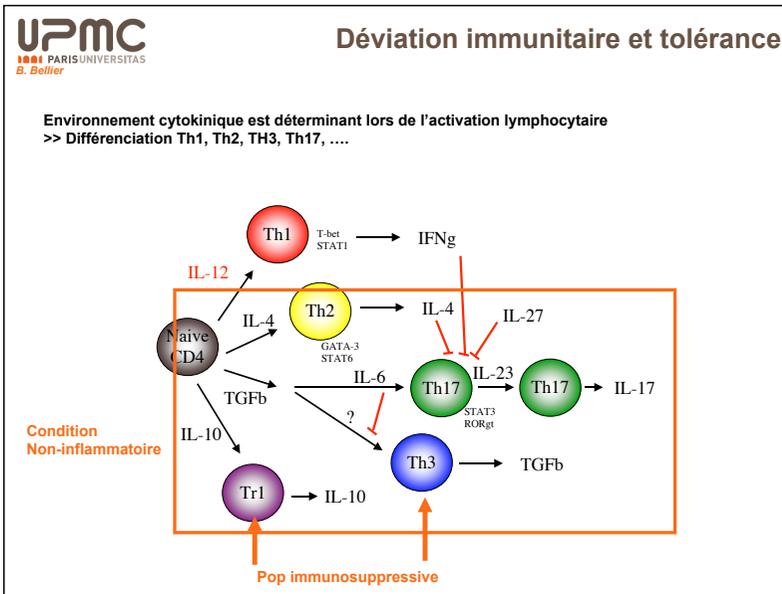
UPMC
PARIS UNIVERSITÉS
B. Boillier

Cytokines anti-inflammatoires

IL-10, TGF β

- Production**
 - IL-10: Mono, Macro, LyB, LyT Tr1
 - TGF β : tout type cellulaire, Th3
- Cytokines anti-Th1:**
 - >> **Déviation immunitaire**
- Actions:**
 - Inhibition de production des cytokines pro-inflammatoires
 - Inhibition activité microbienne du Macro, PN neutro
 - Induit baisse d'expression MHC II et B7, ICAM-1
- Génération de Lymphocytes suppresseurs:**
 - Treg induits: Tr1
 - Th3



UPMC
PARIS UNIVERSITAS
B. Boillier

Lymphocytes T suppresseurs

Interferon gamma	Th1	Th2	Th3	Tr1	Th3	Th1	Treg naturels
IL-4	+	+	+	+	+	+	CD25 ^{hi} /GITR ^{hi}
TGF-beta	-	-	+	+	+	+	
IL-10	-	-	+	+	+	+	
Growth	IL-2	IL-2/IL-4	IL-2/TGF-β	IL-10, Ilfma	IL-2	IL-2	IL-2
B helper	IgG2a	IgG1/IgE	IgA	Th1 ou 2	Th1	Th1 or 2	Th1 or 2
Suppression	Th2	Th1	Th1	Th1	Th1	Th1	Th1
Prolifération	+++	++	++	++	++	++	++
Affinity for self	+/+	+/+	+	+	+	+	+

Natural regulatory T cells
 Treg cell CD25⁺ GITR⁺

Inducible regulatory T cells
 Treg cell CD25⁻ GITR⁻

Th3 cell
 Treg cell CD25⁻ GITR⁻

Tr1 cell
 Treg cell CD25⁻ GITR⁻

CD39 regulatory T cell
 Treg cell CD25⁻ GITR⁻

IL-10 and/or TGF-β

MHC and co-stimulatory molecules
 ↓ APC function
 ↓ Inflammatory cytokines

Cell-cell contact
 ↓ Proliferation
 ↓ IFN-γ
 ↓ Proliferation
 ↓ IL-4
 ↓ Proliferation
 ↓ CTL activity
 ↓ IFN-γ

Condition Non-inflammatoire

Pop immunosuppressive

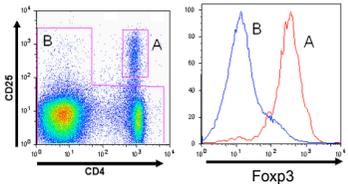
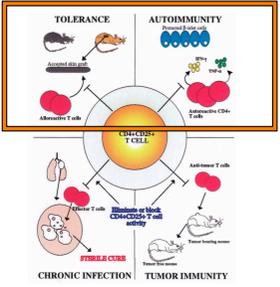
- Th3**
 sous-groupe de lymphocytes TCD4+ qui sécrètent du TGF-β (ainsi que de l'IL-4 et de l'IL-10), favorisant la sécrétion d'IgA par les plasmocytes, régulent à la baisse les Th1 et les Th2. Leur maturation dépend de la présence de TGF-β, d'IL-4, d'IL-10 et du blocage de l'IL-12, ainsi que de l'expression à leur surface de CD86 et de CTLA-4. Ces clones Th3 émergent surtout après pénétration de l'antigène par voie orale. Leurs cibles ne sont pas les T effecteurs mais plutôt les cellules présentatrices en contact avec ces derniers, la libération de TGF-β induisant un mécanisme de suppression paracrine sur celles-ci.
- Tr1**
 La production de taux élevés d'IL-10 supprime la réponse immunitaire par contacts cellulaires directs et/ou par sécrétion de cytokines. faible capacité à proliférer (du fait des hautes concentrations d'IL-10). se différencient après contacts avec des cellules présentatrices synthétisant de grandes quantités d'IL-10. Cette situation est surtout rencontrée lorsque la cellule dendritique est encore assez « immature », que l'antigène est en faible concentration, et que les contacts entre cellule présentatrice et lymphocyte TCD4+ sont répétés.

Nature Reviews | Immunology

UPMC
PARIS UNIVERSITAS
B. Boillier

Lymphocytes T régulateurs CD4+ CD25+

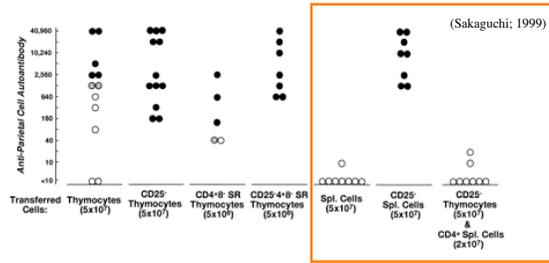
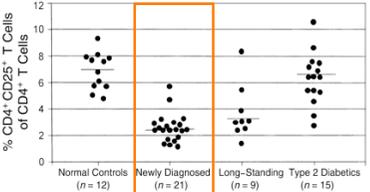
- **Ly T régulateurs:**
 - (re)découverts par Sakagushi
 - Rôle dans maintien de la tolérance périphérique
 - Préviennent l'apparition des MAI
- Phénotype:
 - **CD4+ CD25+**
 - **Foxp3+**
- 5-10% des T périphériques
- Cellules anergiques, dépendantes de l'IL-2 et de CD28 pour leur survie
- Action suppressive de proximité
 - Contact-dépendent
- Rôle multiple
- Suppression des réponses
 - auto-immunes
 - anti-tumorales
 - allogéniques
 - anti-infectieuses

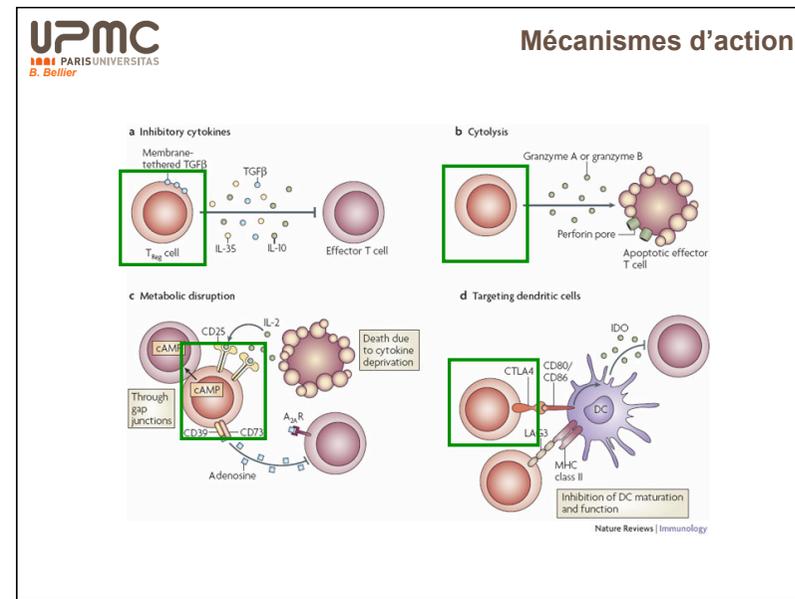
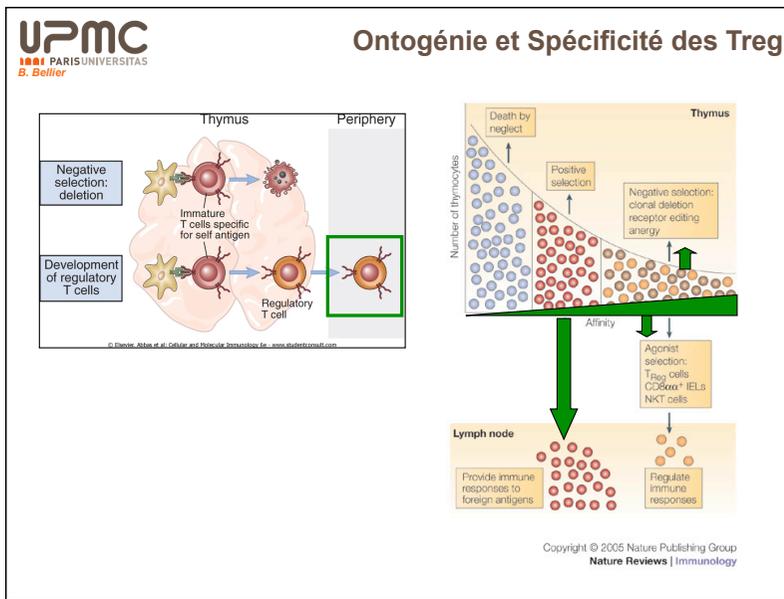



UPMC
PARIS UNIVERSITAS
B. Boillier

Lymphocytes T régulateurs: mise en évidence de leur implication dans MAI

- Chez la souris nude après transfert adoptif
 - (Sakaguchi; 1999)
- Chez les patients diabétiques insulino-dépendant (type 1)



UPMC
PARIS UNIVERSITÉS
B. Boillier

Treg: nouvel outil thérapeutique

- **Suppression**
 - Modification du ratio Teff: Treg
 - Expansion in vitro et injection
 - Expansion in vivo
 - Rôle de l'IL-2

- **Activation:**
 - Déplétion des Treg :
Anticorps monoclonaux anti-CD25
 - Bloque l'activation des Treg
 - Anti-CTLA4

UPMC
PARIS UNIVERSITÉS
B. Boillier

...contrôle en périphérie des clones auto-réactives

Etapes limitantes au déclenchement des réponses:

Atteindre le tissu cible

Percevoir le signal

Proliférer et se différencier

RÉPONSE

Accès limité aux tissus dits « immunopriviliés »

UPMC
PARIS UNIVERSITÉS
B. Boillier

Tissus « immunoprivilégiés »

- Accès limité de certains tissus aux lymphocytes T activés et potentiellement autoréactifs
- FasL+
 - Œil, cerveau (astrocytes), testicules, l'utérus et le placenta (Rôle dans la tolérance du fœtus)

Les anomalies de l'apoptose lymphocytaire induite par Fas peuvent favoriser l'irruption de cellules immunitaires dans des sanctuaires immunoprivilégiés

Oeil

Infiltration lymphocytaire en réponse à une inoculation virale dans la chambre antérieure

WT

FasL^{-/-}

Ferguson *et al.* 1997

UPMC
PARIS UNIVERSITÉS
B. Boillier

Conclusion

Mécanismes à l'origine de la tolérance

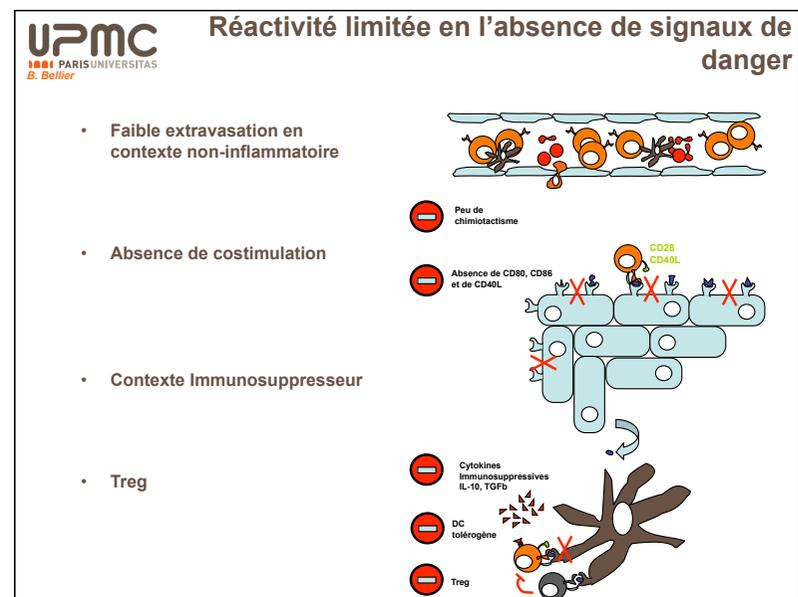
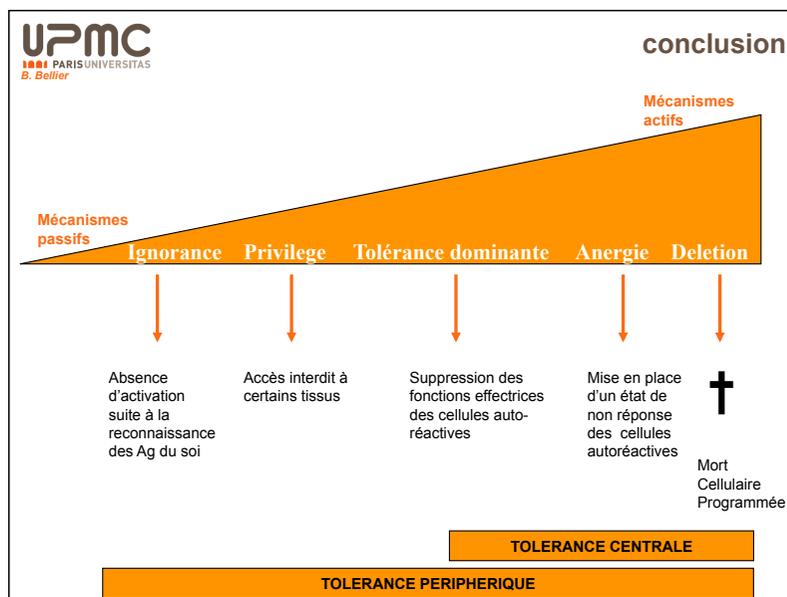
Tolérance centrale

Central tolerance: thymus (lymphatic, bone marrow)

Tolérance périphérique

Mechanisms that prevent potentially autoreactive T cells from reacting inappropriately to autoantigens

Expert Reviews in Molecular Medicine ©2000 Cambridge University Press



UPMC
PARIS UNIVERSITAS
B. Bellier

Difficulté de l'établissement des réponses anti-tumorales
Tumeur = soi modifié

Ignorance

Anergie

Déviation immunitaire

Suppression

Treg

Echappement

UPMC
PARIS UNIVERSITAS
B. Bellier

Importance de la tolérance T pour maintenir la tolérance B

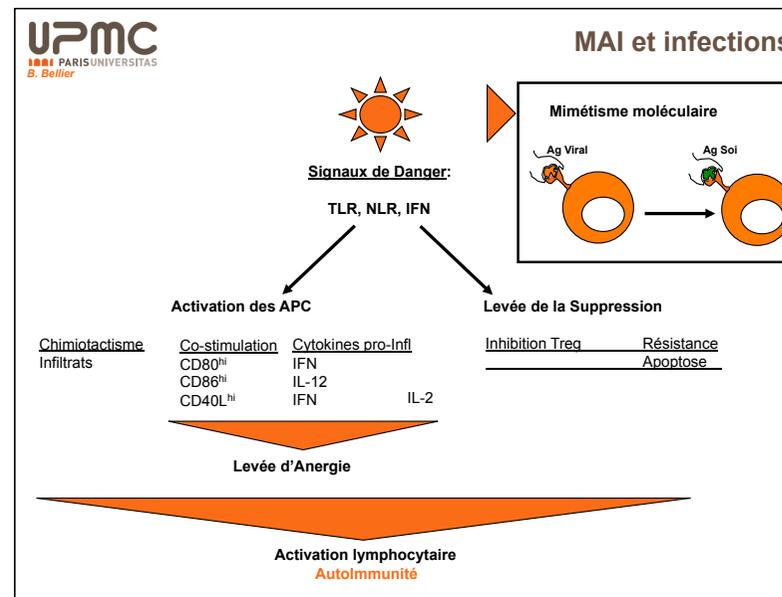
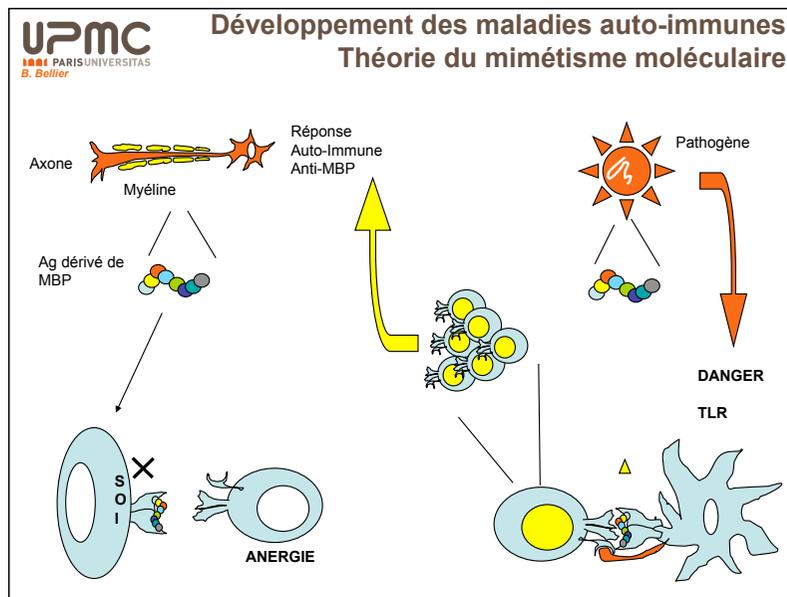
B cells need T cell "help" to make high affinity antibody

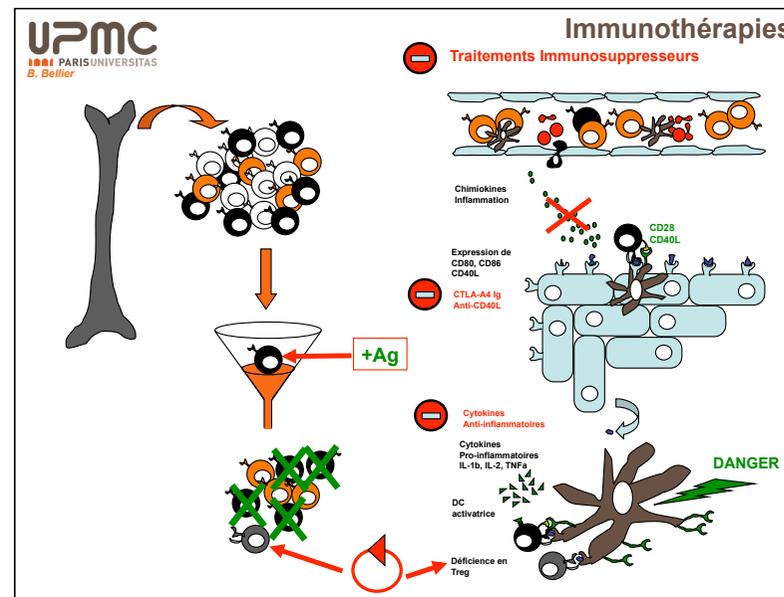
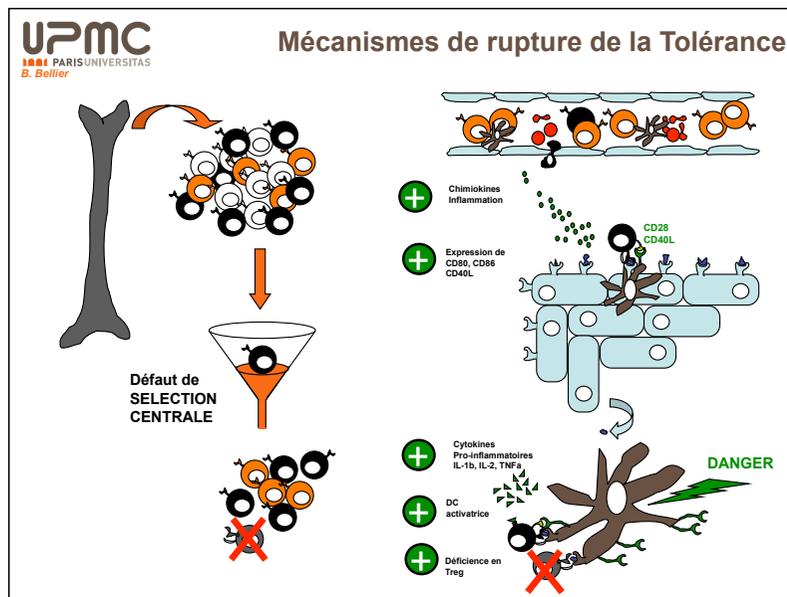
Non-self Ag

stage 1: priming of Th cell		stage 2: activation of B cell by primed Th cell after recognition of processed antigen		
T dependent antigen B cell epitope	processing APC MHC II	Th MHC II	processing B MHC II Ag capture	
		activation		

Self Ag

stage 1: priming of Th cell		stage 2: activation of B cell by primed Th cell after recognition of processed antigen		
T dependent antigen B cell epitope	processing APC MHC II	Th MHC II	processing B MHC II Ag capture	
		activation		







UPMC
PARIS UNIVERSITAS
B. Bellier

UPMC
M^{icrobiologie}
& C^{ellulaire}

Master de Sciences & Technologies
Métiers Biologie Médecine et Cellulaire
Biosciences Innovations

ImmunoTechnologies & Biothérapies

Une formation à l'innovation...

> Niveau de formation
- Master 2^{ème} année - Bac +5

> Objectifs

- Préparer les étudiants aux métiers de la recherche appliquée en immunologie, de l'innovation clinique et technologique dans le domaine des sciences biomédicales
- Offrir une formation de qualité, spécifique et intégrée, pour faciliter l'insertion professionnelle des jeunes diplômés, notamment par la conduite de projets d'étude et la réalisation d'un stage de spécialisation
- Rapprocher et intégrer les entreprises ou les laboratoires de recherche de notre formation en constituant un réseau d'échanges privilégiés

> Public concerné

- Étudiants scientifiques, médecins, pharmaciens... souhaitant intégrer le secteur de l'industrie des Biotechnologies, de la Recherche Académique ou poursuivre en Doctorat.
- Personnel scientifique se destinant à une carrière de R&D dans le domaine de l'innovation médicale et des biothérapies.

Responsables du programme:
Bernard Bellier - Stéphane Geoff-Dubois

Responsable Stage:
Isabelle Desrier

Responsables de la Spécialité:
François Lamotte & Adrien Be

Responsable de la Matière:
Jean-Christophe Lertzer

Directeur:
Lydia Feron

L'EXCELLENCE. SOURCE D'INSPIRATION

UPMC

www.upmc.fr

ITB

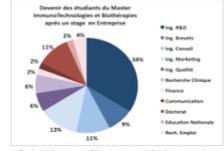
ImmunoTechnologies & Biothérapies

> Les débouchés

ImmunoTechnologies & Biothérapies

Entreprises Lab. Recherche Formation complémt.

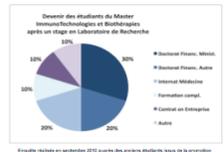
Devenir des étudiants du Master ImmunoTechnologies et Biothérapies après un stage en Entreprise



Catégorie	Pourcentage
R&D	45%
Ing. Biotech	13%
Ing. Conseil	2%
Ing. Marketing	2%
Ing. Qualité	2%
Recherche Clinique	6%
Finance	1%
Communication	1%
Contract	1%
Education/Non-Health	1%
Recr. Emploi	11%

Échantillon réalisé en septembre 2010 auprès des anciens étudiants issus des promotions 2006, 2008, 2009, 2010 et 2010.

Devenir des étudiants du Master ImmunoTechnologies et Biothérapies après un stage en Laboratoire de Recherche



Catégorie	Pourcentage
Recherche Financ. Médic.	30%
Recherche Financ. Autre	10%
Recherche Médicale	10%
Recherche conseil	10%
Contract en Entreprise	20%
Autre	20%

Échantillon réalisé en septembre 2010 auprès des anciens étudiants issus de la promotion 2006.