UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, SCIENCES ET TECHNOLOGIES

EA 4245 CELLULES DENDRITIQUES ET GREFFES

THÈSE présentée par :

Thomas HOFFMANN

soutenue le : **15 septembre 2009**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais - Tours**

Discipline ou Spécialité : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

ASSOCIATION ENTRE POLYMORPHISME DE GÈNES DE L'IMMUNITÉ ET EVENEMENTS CLINIQUES POST-TRANSPLANTATION RENALE

THÈSE dirigée par :

Monsieur BARON Christophe	Maître de Conférences/Praticien Hospitalier/Habilité à Diriger des Recherches, université François Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

Monsieur MERVILLE Pierre	Professeur/Praticien Hospitalier, université Bordeaux 2
Monsieur THERVET Eric	Professeur/Praticien Hospitalier, université Paris 5

JURY :

Monsieur BARON Christophe	Maître de Conférences/Praticien Hospitalier/Habilité à Diriger des Recherches, université François Rabelais de Tours
Monsieur DUCLOUX Didier	Praticien Hospitalier, CHU Saint Jacques, Besançon
Monsieur LEBRANCHU Yvon	Professeur/Praticien Hospitalier, université François Rabelais de Tours
Monsieur MERVILLE Pierre	Professeur/Praticien Hospitalier, université Bordeaux 2
Monsieur THERVET Eric	Professeur/Praticien Hospitalier, université Paris 5

Il est plus nécessaire d'étudier les hommes que les livres

(François de La Rochefoucauld)

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier le professeur Yvon Lebranchu et le docteur Florence Velge-Roussel de m'avoir permis de faire ma thèse au sein de leur laboratoire et m'avoir fait confiance tout au long de ces 3 ans, ainsi que le docteur Christophe Baron de m'avoir encadré pendant cette même période.

Je remercie également toute l'équipe EA 4245 Cellules Dendritiques et Greffes pour leur soutien, leur aide et surtout pour la bonne ambiance qu'ils ont su instaurer dans le laboratoire.

Je remercie beaucoup Roche, Genzyme, la Société Francophone de Transplantation, et Vaincre la Mucoviscidose pour le financement de ma thèse, ainsi que les membres du jury pour leur participation à l'évaluation de ce travail.

J'adresse ensuite mes remerciements à l'équipe de Néphrologie et Immunologie Clinique du CHRU Bretonneau, et tout particulièrement aux infirmières, pour l'obtention des prélèvements malgré leur surcharge de travail, ainsi qu'à Jean-Frédéric Marlière pour la base de données cliniques et le professeur Halimi pour les traitements statistiques.

Je remercie les patients transplantés rénaux de Tours d'avoir accepté de participer à cette étude.

Enfin, mes derniers remerciements vont à ma femme, ma fille Maëlle, mes parents et mes amis (Sarah et Arnaud, Béatrice et Vincent, Laëtitia et Geoffrey, Sabrina et Elise), qui m'ont supporté avec courage lors des nombreux moments de stress et de découragement qui jalonnent toute recherche scientifique.

Encore merci à vous tous.

Résumé

La transplantation rénale est actuellement la solution la plus efficace et la plus économique pour la prise en charge de l'insuffisance rénale chronique. Elle entraîne cependant une puissante réponse immunitaire dirigée contre le greffon allogénique qui nécessite la prise d'immunosuppresseurs à vie. Malgré les progrès effectués, on considère actuellement que près d'un tiers des greffons seront perdus dans les dix premières années, et cela en partie à cause du rejet chronique ainsi que des effets délétères associés aux immunosuppresseurs. Mettre en évidence des facteurs individuels influençant le devenir du greffon pourrait permettre de mieux gérer les traitements et la prise en charge individuelle des patients. Le polymorphisme génétique est un exemple de ce type de facteurs car c'est un élément important de la variabilité inter-individuelle. De nombreux polymorphismes, notamment dans des gènes de l'immunité, ont été associés au devenir du greffon rénal.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à 6 polymorphismes de gènes de l'immunité concernant les molécules suivantes : l'interleukine-12 p40 (IL-12p40), PD-1 (« Programmed Cell Death-1 »), AIF-1 (« Allograft Inflammatory Factor-1 »), Lyp (« Lymphoid-associated Protease »), TIM-1 et -3 (« T-cell Immunoglobulin Mucin »). L'objectif principal de ce travail a été de tester l'association de ces polymorphismes avec le devenir du greffon rénal. Nous avons d'abord constitué une banque d'ADN des patients transplantés rénaux au CHRU de Tours, puis nous avons génotypé ces 6 polymorphismes par digestion enzymatique ou avec une nouvelle méthode mise en place au laboratoire (basée sur la cytométrie en flux). Enfin, nous avons recherché une association statistique entre les génotypes et plusieurs événements cliniques répertoriés dans notre base de données cliniques et survenus après la transplantation rénale : le retard de reprise de fonction du greffon, le rejet aigu, l'infection à CMV, le cancer de la peau, la perte du greffon et la mort du patient.

Nous avons ainsi observé une association entre les polymorphismes dans les gènes de l'IL-12p40, PD-1, TIM-3 et l'infection à CMV, entre celui du gène de PD-1 et la survie du greffon, entre celui du gène codant AIF-1 et le cancer de la peau, ainsi qu'entre celui concernant Lyp et le retard de reprise de fonction du greffon.

Ces résultats suggèrent l'intérêt de stratifier génétiquement les patients afin d'identifier des sous-populations qui bénéficieraient tout particulièrement de traitements immunosuppresseurs

ou antiviraux et d'autres qui pourraient voir leur quantités diminuées. Cette meilleure gestion des traitements pourrait permettre d'augmenter la survie des greffons à long terme.

Abstract

Kidney transplantation is currently the treatment of choice for patients with end-stage renal failure. But after transplantation, a number of donor-derived proteins are recognized as foreign antigens by the recipient's immune system. This result in an immunological reaction in which the allograft might be rapidly destroyed. In spite of the continuous progress in immunosuppressive and supportive therapy, a number of factors still interfere with the complete success of renal transplantation, with immunosuppressors' side effects and chronic rejection in the first line. Revealing some factors with impact on graft outcome may therefore have important consequences in clinical practice. As an important factor of inter-individual variability, genetic polymorphisms are good candidates, all the rather than many of them have been associated with kidney graft outcome.

In the work presented here, we studied 6 polymorphisms into immunity genes coding IL-12p40 (Interleukin-12 p40), PD-1 (Programmed Cell Death-1), AIF-1 (Allograft Inflammatory Factor-1), Lyp (Lymphoid-associated Protease), TIM-1 et -3 (T-cell Immunoglobulin Mucin-1 and -3), and we aimed at assessing their association with kidney graft outcome. Using a DNA bank of the patients transplanted in the University Hospital of Tours, we genotyped the polymorphisms with enzymatic digestion or with a new method set up in the laboratory and based on flow cytometer. Then we assessed their association with several clinical events occurring after transplantation: delayed graft function, acute rejection, CMV infection, skin cancer, graft loss and patient death.

We showed that the polymorphisms into IL-12p40, PD-1 and TIM-3 genes were associated with CMV infection, that the PD-1 gene polymorphism was associated with graft survival, and that the polymorphisms into AIF-1 and Lyp genes were associated with skin cancer and delayed graft function, respectively.

These results suggest that it would be interesting to genetically stratify patients in order to reveal subpopulations who would take benefit from larger treatments or who could receive less of them. This better management might allow us to increase long-term kidney graft survival.

Table des matières

Remerciements 3
Résumé 4
Abstract 6
Table des matières 7
Liste des tableaux 11
Liste des figures 13
Liste des annexes 15
Introduction 16
Généralités et contexte de l'étude 19
I. Les polymorphismes génétiques. 20
I.1. Qu'est-ce qu'un polymorphisme génétique ? 20
I.2. Les études d'association. 21
I.2.1. Les études gènes candidats. 21
I.2.2. Les études pan-génomiques. 21
I.2.3. Ce qui fait une bonne étude d'association. 22
I.3. Les polymorphismes génétiques peuvent influencer l'expression génique et la fonction protéique. 22
I.4. Polymorphismes génétiques et associations cliniques. 23
I.4.1. Pharmacogénétique. 23
I.4.2. Maladies infectieuses. 24
I.4.3. Cancers. 25
I.4.4. Maladies auto-immunes. 25
I.4.5. Etudes pan-génomiques. 26
II. Généralités sur la transplantation rénale. 27
II.1. La réponse immunitaire induite par une allogreffe. 27
II.1.1. Les mécanismes entrant en jeu. 27
II.1.2. Les immunosuppresseurs. 30
II.2. Les principales complications. 32
II.2.1. Toxicité médicamenteuse. 33
II.2.2. Lésions d'ischémie/reperfusion. 33
II.2.3. Rejet aigu et rejet chronique. 34

II.2.4. Infections. 36
II.2.5. Cancers. 38
II.3. Les défis actuels. 38
III. Les polymorphismes génétiques en transplantation rénale. 40
III.1. Etat des connaissances. 40
III.1.1. Rejets et survie. 40
III.1.2. Retard de reprise du greffon (DGF). 41
III.1.3. Cytomégalovirus. 41
III.1.4. Cancer de la peau 42
III.2. Les polymorphismes étudiés dans notre travail. 42
III.2.1. Interleukine-12 p40 (IL-12p40). 42
III.2.2. Programmed Death-1 (PD-1). 44
III.2.3. Allograft Inflammatory Factor-1 (AIF-1). 46
III.2.4. Lymphoid-associated protease (Lyp). 48
III.2.5. T-cell Immunoglobulin Mucin-1 et -3 (TIM-1 et -3). 49
IV. Objectifs de ce travail. 53
Banque d'ADN 54
Méthodes de génotypage 57
I. Digestion enzymatique. 58
II. Mise en place d'une nouvelle méthode de génotypage. 60
II.1. Principe de la technique. 60
II.2. Matériels et méthodes. 63
II.2.1. Couplage des billes aux oligonucléotides. 63
II.2.2. Génotypage. 64
II.3. Exemples de résultats obtenus. 64
AXE 1 : 3 articles publiés, 1 article soumis et des résultats en cours de rédaction pour soumission. 69
I. Le SNP *IL12B* 3'UTR est associé à l'infection à CMV après transplantation rénale. 71
I.1. Résumé des articles publiés et résultats complémentaires. 72
I.1.1. L'allèle C est un facteur de risque de réactivation du CMV. 72
I.1.2. Hypothèse sur le lien pathogénique entre *IL12B* 3'UTR et l'infection à CMV (résultats non publiés). 73
I.2. Articles publiés (pdf). 77
I.2.1. Résultats préliminaires (publiés dans *Transplantation Proceedings*). 77

I.2.2. Résultats principaux (publiés dans *Transplantation*). 80
II. Le SNP PD-1.3 est associé à l'infection à CMV après transplantation rénale. 86
II.1. Résumé de l'article et résultats complémentaires. 86
II.1.1. L'allèle A est un facteur de risque de réactivation du CMV. 86
II.1.2. Hypothèse sur le lien pathogénique entre PD-1.3 et la réactivation du CMV (résultats non publiés). 88
II.2. Article publié dans *Journal of Medical Genetics* (pdf). 92
III. Etude des autres événements cliniques et des SNP *IL12B* 3'UTR et PD-1.3. 113
III.1. Organisation de l'étude. 113
III.2. Résultats et discussion. 114
III.2.1. Distribution des génotypes et caractéristiques de base des patients. 114
III.2.2. Les polymorphismes *IL12B* 3'UTR et PD-1.3 ne sont pas associés avec le rejet aigu, le DGF et le cancer de la peau. 116
III.2.3. *IL12B* 3'UTR n'est pas associé à la survie du greffon rénal ou du patient. 118
IV. PD-1.3 et survie du greffon (manuscrit en cours de rédaction). 120
IV.1. Patients et méthodes. 120
IV.2. Résultats 121
IV.2.1. L'allèle A est un facteur protecteur indépendant contre la perte du greffon. 121
IV.2.2. L'effet de PD-1.3 est lié au statut sérologique CMV du donneur. 125
IV.3. Discussion. 127
AXE 2 : résultats préliminaires non publiés portant sur les polymorphismes des gènes codant AIF-1, Lyp, TIM-1 et TIM-3 131
I. Patients et méthodes. 133
I.1. Schéma des études. 133
I.1.1. *AIF1* +899 et Lyp R620W. 133
I.1.2. TIM1_5. 134
I.1.3. TIM3_2. 135
I.2. Evénements cliniques étudiés. 136
I.3. Analyses statistiques. 136
II. Le SNP *AIF1* +899 en transplantation rénale. 137
II.1. Distribution des génotypes. 137
II.2. Caractéristiques de base des patients. 137
II.3. *AIF1* +899 et le devenir du greffon rénal. 139

II.3.1. Pas de lien statistique avec le rejet aigu, le DGF, l'infection à CMV et la survie du greffon ou du patient. 139
II.3.2. L'allèle A d'*AIF1* +899 est un facteur de risque de cancer de la peau après transplantation rénale. 141
III. Le SNP Lyp R620W en transplantation rénale. 143
III.1. Distribution des génotypes. 143
III.2. Caractéristiques de base des patients. 143
III.3. Lyp R620W et le devenir du greffon rénal. 145
III.3.1. Pas de lien statistique avec le rejet aigu, l'infection à CMV, la survie du greffon ou du patient, et le cancer de la peau. 145
III.3.2. L'allèle T de Lyp R620W est un facteur protecteur contre le DGF. 148
IV. Le polymorphisme TIM1_5 en transplantation rénale. 150
IV.1. Distribution des génotypes de TIM1_5. 150
IV.2. Caractéristiques de base des patients. 150
IV.3. Pas de lien statistique entre TIM1_5 et les événements cliniques post-transplantation étudiés. 151
V. Le SNP TIM3_2 en transplantation rénale. 156
V.1. Distribution des génotypes de TIM3_2. 156
V.2. Caractéristiques de base des patients. 156
V.3. TIM3_2 et le devenir du greffon rénal. 158
V.3.1. Pas de lien statistique avec le DGF, le rejet aigu, la survie du greffon ou du patient, et le cancer de la peau. 158
V.3.2. L'allèle G de TIM3_2 est un facteur protecteur contre la primo-infection à CMV. 160
Conclusion 163
Bibliographie 167
Annexes 194
Résumé 211
Abstract 211

Liste des tableaux

Tableau 1. Oligonucléotides utilisés pour le génotypage par OLA d'*IL12B* 3'UTR, PD-1.3 et TIM3_2. 63

Tableau 2. Intensités moyennes de fluorescence obtenues après le génotypage par OLA de 3 SNP chez 25 transplantés rénaux. 67

Tableau 3. Négativation spontanée de l'antigénémie CMV et génotype d'*IL12B* 3'UTR. 74

Tableau 4. Négativation spontanée de l'antigénémie CMV et génotype de PD-1.3. 89

Tableau 5. Distribution des génotypes d'*IL12B* 3'UTR et PD-1.3 chez 834 transplantés rénaux. 114

Tableau 6. Caractéristiques cliniques de base de 834 transplantés rénaux en fonction d'*IL12B* 3'UTR et PD-1.3. 115

Tableau 7. Survenue du DGF et du rejet aigu en fonction d'*IL12B* 3'UTR et de PD-1.3. 116

Tableau 8. L'allèle A de PD-1.3 est un facteur protecteur indépendant contre la perte du greffon avec mort censurée. 123

Tableau 9. Autres paramètres pouvant affecter la survie du greffon avec mort censurée chez 834 transplantés rénaux dans le centre de Tours (étude univariée). 124

Tableau 10. Caractéristiques liés au CMV de 834 transplantés rénaux en fonction de PD-1.3. 125

Tableau 11. Oligonucléotides utilisés pour le génotypage par OLA d'*AIF1* +899 et de Lyp R620W. 134

Tableau 12. Distribution des génotypes d'*AIF1* +899 chez 652 transplantés rénaux et chez des contrôles sains caucasiens de 2 autres études. 137

Tableau 13. Caractéristiques cliniques de base de 652 transplantés rénaux en fonction d'*AIF1* +899. 138

Tableau 14. Incidence de 3 événements cliniques post-transplantation en fonction d'*AIF1* +899. 139

Tableau 15. Distribution des génotypes de Lyp R620W chez 840 transplantés rénaux et chez des contrôles sains caucasiens de 2 autres études. 143

Tableau 16. Caractéristiques cliniques de base de 840 transplantés rénaux en fonction de Lyp R620W. 144

Tableau 17. Incidence du rejet aigu et de l'antigénémie CMV positive en fonction de Lyp R620W. 145

Tableau 18. Incidence du DGF en fonction de Lyp R620W chez 840 transplantés rénaux. . 148

Tableau 19. Distribution des génotypes de TIM1_5 chez 555 transplantés rénaux et chez des contrôles sains caucasiens. 150
Tableau 20. Caractéristiques cliniques de base de 555 transplantés rénaux en fonction de TIM1_5..... 151
Tableau 21. Incidence de 3 événements cliniques post-transplantation en fonction de TIM1_5. 152
Tableau 22. Distribution des génotypes de TIM3_2 chez 558 transplantés rénaux et chez des contrôles sains caucasiens. 156
Tableau 23. Caractéristiques cliniques de base de 558 transplantés rénaux en fonction de TIM3_2..... 157
Tableau 24. Incidence du DGF et du rejet aigu en fonction de TIM3_2. 158
Tableau 25. Incidence de l'antigénémie CMV positive après transplantation rénale en fonction de TIM3_2. 161

Liste des figures

Figure 1. Orientation de la réponse lymphocytaire T CD4+ (d'après Alegre *et al.*, 2007). 29
Figure 2. La superfamille B7-CD28 (d'après Chen, 2004). 30
Figure 3. Mécanismes du rejet de greffe (d'après (Briscoe et Sayegh, 2002). 36
Figure 4. Survie du greffon rénal selon la période de la greffe (rapport annuel 2007 de l'agence de Biomédecine). 39
Figure 5. Exhaustivité de la banque d'ADN. 55
Figure 6. Représentativité de la banque d'ADN. 56
Figure 7. Détermination du génotype d'*IL12B* 3'UTR par RFLP. 58
Figure 8. Détermination du génotype de PD-1.3 par RFLP. 59
Figure 9. Principe du génotypage de polymorphismes par un test de ligation couplé à la cytométrie en flux. 62
Figure 10. Exemple de résultat obtenu en génotypant un patient par OLA après le passage en cytométrie en flux. 65
Figure 11. Détermination visuelle du génotype de 3 SNP génotypés simultanément chez 25 transplantés rénaux. 66
Figure 12. Influence du génotype du SNP *IL12B* 3'UTR sur le délai avant l'antigénémie CMV positive. 75
Figure 13. Influence du génotype du SNP PD-1.3 sur le délai avant l'antigénémie CMV positive. 90
Figure 14. Survie à l'événement « cancer de la peau » en fonction des SNP *IL12B* 3'UTR et PD-1.3 chez 834 transplantés rénaux. 117
Figure 15. Survie du greffon et du patient en fonction du SNP *IL12B* 3'UTR chez 834 transplantés rénaux. 118
Figure 16. Survie du greffon et du patient en fonction du SNP PD-1.3 chez 834 transplantés rénaux. 122
Figure 17. Influence du statut sérologique CMV du donneur sur l'association de PD-1.3 avec la survie du greffon. 126
Figure 18. Association entre la survie du greffon et PD-1.3 en fonction du statut sérologique CMV donneur/receveur avant la transplantation. 127
Figure 19. Détermination des génotypes de TIM1_5 par électrophorèse. 135
Figure 20. Survie du greffon et du patient en fonction du SNP *AIF1* +899 chez 652 transplantés rénaux. 140

Figure 21. Survie à l'événement « cancer de la peau » en fonction du SNP *AIF1* +899 chez 652 transplantés rénaux. 141
Figure 22. Survie du greffon et du patient en fonction du SNP Lyp R620W chez 840 transplantés rénaux. 146
Figure 23. Survie à l'événement « cancer de la peau » en fonction du SNP Lyp R620W chez 840 transplantés rénaux. 147
Figure 24. Survie du greffon et du patient en fonction de TIM1_5 chez 555 transplantés rénaux. 153
Figure 25. Présence de l'insertion de TIM1_5 et survie du patient chez 555 transplantés rénaux. 154
Figure 26. Survie à l'événement « cancer de la peau » en fonction de TIM1_5 chez 555 transplantés rénaux. 155
Figure 27. Survie du greffon et du patient en fonction de TIM3_2 chez 558 transplantés rénaux. 159
Figure 28. Survie à l'événement « cancer de la peau » en fonction de TIM3_2 chez 558 transplantés rénaux. 160
Figure 29. Bilan des résultats de cette étude. 164

Liste des annexes

Annexe 1. Abréviations des produits chimiques utilisés..... 195

Annexe 2. Protocole de PCR..... 195

Annexe 3. Manuscrit sur *IL12B* 3'UTR, PD-1.3 et le devenir du greffon rénal, soumis à *Clinical Transplantation* (pdf). 196

Introduction

Le nombre de patients arrivant au stade terminal de l'insuffisance rénale est en augmentation (5% par an environ). La transplantation rénale représente actuellement la plus satisfaisante et la plus économique des méthodes de traitement de l'insuffisance rénale terminale, par rapport à la technique de suppléance classique qu'est la dialyse, mais elle n'est pas sans conséquences car elle engendre une puissante réponse immunitaire menant aux phénomènes de rejet du greffon. Des immunosuppresseurs sont donnés à vie aux patients pour combattre cette réponse. Cependant, malgré les progrès dans ces traitements, il subsiste de nombreux problèmes et environ un tiers des greffons sera perdu durant les 10 premières années post-transplantation.

Les raisons de ces échecs sont multiples mais le facteur immunologique est une cause importante, notamment dans la genèse des lésions de dysfonction chronique du greffon. Mettre en évidence des facteurs influençant cette réponse immune pourrait permettre d'améliorer la prise en charge des patients.

Le polymorphisme génétique est un bon exemple de ce type de facteurs car, au même titre que les facteurs environnementaux, il est une cause importante de variabilité interindividuelle affectant le niveau d'expression d'un gène. Il s'agit d'une variation dans la séquence génomique qui peut être silencieuse, affecter l'expression d'un gène en provoquant la synthèse d'une protéine dont la séquence en acides aminés est différente (mutation dans la région codante du gène), ou encore modifier la dynamique d'expression du gène en agissant sur la régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Un simple changement de base peut en effet modifier l'interaction d'un facteur de transcription avec l'ADN et modifier la production de l'ARN messager (ARN_m), voire de la protéine, ou encore modifier la stabilité de l'ARN_m. Le polymorphisme génétique a un impact sur la survenue d'un grand nombre de pathologies humaines dont certains cancers, ainsi que certaines pathologies infectieuses et auto-immunes. De plus, il influence la nature de la réponse immune et joue donc un rôle en transplantation d'organes et de tissus. C'est dans ce groupe de patients que s'est située notre étude : il s'agissait d'analyser l'influence du polymorphisme de 6 gènes codant des molécules de l'immunité sur le devenir des allogreffes rénales humaines.

Une bonne connaissance des polymorphismes influençant le devenir des greffons pourrait permettre de stratifier les patients selon leur risque de présenter une pathologie délétère pour le greffon et ainsi moduler les stratégies immunosuppressives, pour éventuellement améliorer

la survie des greffons rénaux chez les patients à risque et minimiser les effets secondaires associés aux traitements immunosuppresseurs.

Dans ce mémoire, nous allons tout d'abord présenter les généralités et le contexte de notre étude, en traitant notamment du polymorphisme génétique, de la transplantation rénale, et des liens potentiels entre ces 2 derniers. Puis nous traiterons de la constitution de notre banque d'ADN, et nous présenterons les 2 principales méthodes de génotypage utilisées ainsi que les résultats de nos travaux.

Généralités et contexte de l'étude

I. Les polymorphismes génétiques.

I.1. Qu'est-ce qu'un polymorphisme génétique ?

Il s'agit d'une variation dans la séquence nucléotidique retrouvée dans plusieurs individus d'une même espèce, qui se transmet de façon mendélienne.

On distingue tout d'abord les substitutions d'une base, ou SNP (pour « Single Nucleotide Polymorphism »), qui représentent à elles-seules 90% de l'ensemble des variations génétiques humaines. En effet, sur les 3 milliards de paires de bases du génome humain qui contiennent environ 30000 gènes, il a jusqu'à maintenant été identifié plus de 9 millions de SNP (Frazer *et al.*, 2007), avec près d'un SNP toutes les 1000-2000 paires de bases environ (Frazer *et al.*, 2007; Sachidanandam *et al.*, 2001). La plupart sont bi-alléliques et se caractérisent par la fréquence de l'allèle minoritaire, ou allèle variant. On qualifie communément de mutation ponctuelle un SNP dont la fréquence de l'allèle variant est inférieure à 1%.

Parmi les autres types de polymorphismes, beaucoup moins fréquents, on distingue les insertions/délétions et les microsatellites. Les premières représentant souvent des séquences d'une dizaine de paires de bases, elles ont souvent un effet sur la protéine concernée ou sur sa régulation et sont bi-alléliques. Les seconds sont des répétitions de dinucléotides ou trinucléotides, dont le nombre peut excéder 30 et qu'on retrouve souvent dans des zones non codantes telles que les promoteurs. Un microsatellite, en tant que polymorphisme, a autant d'allèles que de nombres différents de répétitions observées.

Enfin, il existe un cas particulier de polymorphismes : les variations du nombre de copies, ou CNV (pour « Copy Number Variation »). Un CNV est un segment d'ADN qui représente de 1 à 1000 kilobases et pour lequel il a été mis en évidence des différences de nombre de copies en comparant plusieurs génomes. En fait, un individu a en général 2 copies de chaque région autosomale, une par chromosome homologue, mais cela peut varier pour certaines régions particulières suite à des phénomènes de délétion, duplication, inversion et/ou translocation. Le projet de séquençage du génome humain a révélé que les CMV étaient un phénomène répandu et commun chez l'homme. Il a ainsi été estimé qu'environ 0,4% du génome différait entre 2 individus en terme de nombre de copies (Kidd *et al.*, 2008).

I.2. Les études d'association.

Elles ont pour but d'étudier statistiquement les liens entre un polymorphisme génétique et un phénotype particulier (expression du gène, fonction de la protéine associée ou événement clinique).

L'étape principale est la détermination du génotype de chaque individu. Ainsi par exemple, pour un SNP bi-allélique (a allèle le plus fréquent et b allèle le moins fréquent encore appelé allèle mineur), on déterminera pour chaque individu si il est homozygote (a/a), hétérozygote (a/b) ou homozygote pour l'allèle mineur (b/b). Il faut ensuite faire une étude statistique comparant la fréquence du phénotype pour chaque groupe de génotypes.

I.2.1. Les études gènes candidats.

Il y a quelques années, les études d'association s'intéressaient à des polymorphismes de gènes candidats connus pour coder des protéines suspectées de jouer un rôle dans le ou les phénotypes étudiés. Il s'agit de la méthode utilisée dans notre travail. Plusieurs sources peuvent contribuer au choix de ces gènes : les connaissances physiopathologiques, les modèles animaux, les données issues de l'analyse du transcriptome ou la recherche à partir de la littérature et des bases de données. Pour un gène candidat, l'étude peut soit concerner un ou plusieurs polymorphismes déjà caractérisés dans la littérature, soit comprendre une étape de caractérisation de la variabilité de la séquence.

Cependant, dans les études d'association traditionnelles, les gènes candidats sont sélectionnés a priori sur la base de la fonction biologique de la protéine codée, ce qui exclut toutes les gènes ou protéines inconnus ou dont le rôle est insoupçonné.

I.2.2. Les études pan-génomiques.

Une autre approche a récemment été mise en œuvre grâce au projet de séquençage du génome humain : il s'agit de l'approche pan-génomique. En effet, le séquençage du génome humain a permis la mise en place de cartes de SNPs couvrant le génome entier (projet HapMap), et grâce au développement de puces de génotypage haute-densité permettant de tester simultanément des centaines de milliers de SNPs, il est maintenant possible de s'intéresser à la variabilité globale du génome sans aucune hypothèse biologique préalable. Les biais culturels et scientifiques liés à l'approche gènes candidats peuvent ainsi être évités. Cette approche

peut être utilisée pour génotyper les individus de façon individuelle, ce qui est très coûteux, ou alors être appliquée à des mélanges de génomes, à moindre coût.

Cette approche, qui reste avant tout exploratoire, devrait être source de nouvelles hypothèses et de nouveaux gènes candidats à tester ensuite de manière plus approfondie.

I.2.3. Ce qui fait une bonne étude d'association.

En ce qui concerne les études d'association avec des événements cliniques, qu'elles soient pan-génomique ou gènes candidats, il est nécessaire de respecter certaines conditions avant de statuer sur le lien causal entre un polymorphisme et l'événement étudié. En effet, une association statistique peut être due à un biais de l'étude, à un coup de chance, ou encore à l'effet d'un autre polymorphisme génétique en déséquilibre de liaison avec celui étudié. Elle ne deviendra donc lien causal plausible que si elle est mise en évidence sur plusieurs grandes cohortes de patients indépendantes, après analyse des éventuels déséquilibres de liaison, et surtout s'il a été rapporté un impact fonctionnel de ce polymorphisme sur le gène et/ou la protéine associés.

S'appuyer sur des données de fonctionnalité biologique publiées permet de renforcer la suspicion de lien causal.

I.3. Les polymorphismes génétiques peuvent influencer l'expression génique et la fonction protéique.

L'impact fonctionnel d'un polymorphisme génétique dépend fortement de sa localisation. On retrouve des polymorphismes génétiques dans les zones codantes (exons), où ces variations de séquence peuvent être silencieuse ou amener à un changement de phénotype par la production d'une protéine différente, mais aussi dans les régions non codantes (introns, promoteurs, régions non traduites de l'ARN,…) où ils peuvent avoir des conséquences sur l'épissage, la transcription, ou encore sur la stabilité des ARN.

Ainsi par exemple, un polymorphisme dans l'intron 1 du gène codant l'IFNγ peut multiplier jusqu'à 4 la production *in vitro* de la protéine (Pravica *et al.*, 1999), et un autre dans le promoteur du gène codant l'IL-1α augmente l'activité transcriptionnelle de ce dernier ainsi

que la production de la cytokine (Dominici *et al.*, 2002). De même, un microsatellite dans la région 3'UTR du gène codant FGF9 (pour « Fibroblast Growth Factor 9 ») a récemment été rapporté comme pouvant moduler l'expression du gène à des niveaux pré- et post-transcriptionnels (Chen *et al.*, 2007). Par ailleurs, une délétion de 32 nucléotides (delta-32) dans un exon du gène codant un récepteur à chimiokines, CCR5 (pour « Chemokine C-C motif Receptor 5 »), entraîne la production d'une protéine tronquée qui ne se retrouve pas à la surface des lymphocytes, d'où une perte totale de fonction du récepteur (Liu *et al.*, 1996).

Enfin, on peut trouver des polymorphismes qui créent ou suppriment des sites de fixation pour les micro-ARN, des ARN endogènes non codant d'environ 23 nucléotides qui se fixent sur les ARN messagers (ARN_m) pour promouvoir une inhibition post-transcriptionnelle des gènes associés (Bartel, 2009), et d'autres qui se situent directement dans la séquence codant ces micro-ARN. Ces polymorphismes peuvent donc influer sur cette inhibition post-transcriptionnelle et par là-même moduler l'expression de nombreux gènes (Kim et Bartel, 2009; Mishra et Bertino, 2009). Ainsi, par exemple, l'allèle variant d'un SNP localisé dans la séquence d'un pré-micro-ARN (miR-146a) divise par près de 2 la production de ce dernier ainsi que du micro-ARN mature, ce qui diminue l'inhibition d'expression des gènes cibles (Jazdzewski *et al.*, 2008).

I.4. Polymorphismes génétiques et associations cliniques.

Vu que certains polymorphismes ont un effet sur l'expression du gène associé et/ou sur la production de la protéine, il semble raisonnable de penser que certains puissent également avoir un impact sur certaines pathologies où l'intervention des gènes associés est capitale.

I.4.1. Pharmacogénétique.

La pharmacogénétique a pour but d'identifier les facteurs génétiques influençant la réponse clinique aux traitements médicamenteux ou leurs caractéristiques pharmacologiques. Ainsi, dans le traitement des lymphomes non-Hodgkiniens, l'efficacité clinique du rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20) se trouve modifiée suivant le génotype du polymorphisme du récepteur au fragment Fc des immunoglobulines FcγRIIIa (Cartron et al., 2002), ce qui

suggère qu'une bonne liaison avec ce récepteur est nécessaire pour une totale efficacité du rituximab.

De plus, un grand nombre d'enzymes du métabolisme, de protéines de transport et de protéines cibles interviennent dans la pharmacologie des médicaments, toutes pouvant être affectées par des polymorphismes dans les gènes concernés. Ces derniers peuvent alors modifier la pharmacocinétique des traitements et par là-même leur efficacité. En transplantation rénale, un grand nombre d'études concernant principalement les anti-calcineurines (une famille d'immunosuppresseurs), a été publié. Ainsi, il a été démontré plusieurs fois que des polymorphismes dans les gènes codant la P-glycoprotéine (PGP) et le cytochrome P450 3A (CYP3A), deux enzymes majeures du métabolisme des anti-calcineurines, étaient associés avec des modifications de la pharmacocinétique de la cyclosporine et du tacrolimus chez le transplanté rénal, notamment en terme de dose efficace et de biodisponibilité (Anglicheau *et al.*, 2007; Anglicheau *et al.*, 2004; Krüger *et al.*, 2008; Le Meur *et al.*, 2006). Par ailleurs, un SNP du donneur dans le gène codant la PGP a été associé au risque de néphrotoxicité liée à la cyclosporine (Hauser et al., 2005).

D'autres études en transplantation rénale concernent les enzymes du métabolisme du mycophénolate mofétil (MMF, un autre immunosuppresseur), avec notamment 2 SNP dans le gène codant la UDP-glucuronosyltransférase-2B7 (UGT2B7) qui affectent l'activité et la cinétique de l'enzyme ainsi que donc la pharmacocinétique du MMF (Djebli *et al.*, 2007).

I.4.2. Maladies infectieuses.

L'importance du polymorphisme génétique a été mise en évidence dans les infections bactériennes et virales, avec notamment beaucoup d'études sur les récepteurs aux PAMP (pour « Pathogen-Associated Molecular Pattern) tels que ceux de type Toll (TLR, pour « Toll-like Receptor »), qui constituent la première barrière immunitaire anti-infectieuse. Ainsi des SNP dans le gène codant TLR4 augmentent chez l'humain la sensibilité au lypopolysaccharide (LPS), ce qui peut aller jusqu'à une grave septicémie (Arbour *et al.*, 2000), mais augmentent aussi le risque d'infections bactériennes et opportunistes en transplantation rénale (Ducloux *et al.*, 2005). Par ailleurs, un SNP et un microsatellite dans le gène codant TLR-2 ont été associés chez des patients lépreux à une modification de l'évolution de l'infection par *Mycobacterium leprae* (Bochud *et al.*, 2007). Une insertion/délétion dans le gène codant l'IFNα2 a quant à elle été associée avec l'infection par

le virus de l'hépatite C, mais pas avec l'évolution de la malaria (Tena-Tomas *et al.*, 2008), et une étude récente a rapporté que des SNP dans les gènes codant TLR4 et TLR9 étaient associés avec des pathologies pulmonaires causées par *Aspergillus fumigatus*, l'un des champignons pathogènes les plus répandus (Carvalho *et al.*, 2008).

Un autre exemple intéressant est la délétion delta-32 dans le gène codant CCR5. Cette délétion, qui inactive le récepteur, ralentit la progression du SIDA pour les hétérozygotes et protège contre l'infection par le VIH chez les homozygotes (Dean *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996). D'ailleurs, un CNV concernant le principal ligand connu de CCR5, CCL3L1 (pour « Chemokine C-C motif Ligand 3-Like 1 »), a lui aussi un impact sur la susceptibilité au VIH : un grand nombre de copies diminue la proportion de lymphocytes T (LT) $CD4^+$ exprimant CCR5 et par là-même diminue le nombre de copies d'ARN viral (Gonzalez *et al.*, 2005).

I.4.3. Cancers.

Les polymorphismes génétiques ont également été associés à la survenue de cancers. Ainsi des microsatellites dans les gènes codant les récepteurs nucléaires aux œstrogènes ainsi que celui aux androgènes ont été associés au risque de déclarer un cancer du sein (Iobagiu *et al.*, 2006). Un polymorphisme du gène codant le récepteur à la vitamine D a été lui aussi associé au risque de déclarer un cancer du sein (Guy *et al.*, 2004), mais aussi à un risque presque 4 fois supérieur de présenter des métastases lors de ce même cancer (Ruggiero *et al.*, 1998). Par ailleurs, une autre étude a démontré un lien causal entre 2 polymorphismes du gène codant la NRH:quinone oxydoréductase 2 (NQO2) et le cancer du sein sur 2 cohortes indépendantes de plus de 1000 patients chacune, l'effet passant par une dérégulation de la transcription du gène : les génotypes à risque entraînent une production diminuée de l'ARN_m de NQO2 (Yu *et al.*, 2009). De même, le cancer de la thyroïde a été fortement associé à un SNP localisé dans la séquence d'un pré-micro-ARN (miR-146a) et impliqué dans l'expression de ce dernier ainsi que du micro-ARN mature (Jazdzewski *et al.*, 2009; Jazdzewski *et al.*, 2008).

I.4.4. Maladies auto-immunes.

De nombreux polymorphismes ont été associés à la survenue de maladies autoimmunes. Un SNP dans le gène de la « vitamine D binding protein » est un facteur de risque pour développer un diabète de type 1 avec anticorps IA-2 (Ongagna *et al.*, 2005). Plusieurs SNP

dans le gène codant CD25 ont également été associés au risque de diabète de type 1 chez presque 3000 patients (Qu *et al.*, 2007). Une autre importante maladie auto-immune, la sclérose en plaques, a été associée avec un SNP du gène codant l'IL-4 (Urcelay *et al.*, 2005). Par ailleurs, un SNP dans le gène codant le ligand de CD40, molécule importante notamment pour l'activation des LB, a été associé au risque de lupus érythémateux (Citores et al., 2004). Cette maladie auto-immune et la glomérulopathie à complexe immun qui en découle ont également été fortement associées à un CNV dans le gène codant FcγRIIIB (Aitman et al., 2006; Fanciulli et al., 2007).

I.4.5. Etudes pan-génomiques.

A ce jour, plusieurs d'études d'association clinique suivant l'approche pan-génomique ont été rapportées. Ainsi la sclérose en plaque a été associée avec une série de plusieurs SNP, dont 2 sont dans le gène codant CD25, et une validation par une cohorte de réplication (Hafler *et al.*, 2007). D'ailleurs, une des 2 associations concernant le gène de CD25 a été retrouvée dans une étude gène candidat (Alcina *et al.*, 2009). D'autres maladies induites par le système immunitaire ont également été largement étudiées, avec par exemple le diabète de type 1 et les maladies inflammatoires de l'intestin qui ont été associés respectivement à 16 et plus de 40 polymorphismes, avec des cohortes de validation (Hakonarson et Grant, 2009).

L'incidence du diabète de type 2 a elle-aussi été beaucoup étudiée selon cette approche (Saxena *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2007; Sladek *et al.*, 2007), de même que la maladie d'Alzheimer et son association avec le gène codant ApoE (Beecham *et al.*, 2009). On peut citer également une étude pan-génomique concernant le cancer colorectal (Zanke *et al.*, 2007).

II. Généralités sur la transplantation rénale.

En médecine, une transplantation est une opération visant à remplacer un organe défaillant par un organe sain, appelé greffon ou transplant. La première transplantation rénale a été effectuée en 1952 par l'équipe de Louis Michon à l'Hôpital Necker à Paris, les suites néphrologiques étant assurées par Jean Hamburger (Michon et al., 1953). La transplantation rénale est la plus pratiquée en France, représentant à elle seule 62% de l'ensemble des transplantations d'organe en 2007 (rapport annuel 2007 de l'Agence de la Biomédecine), et elle est considérée actuellement comme la plus efficace et la plus économique des méthodes de traitement de l'insuffisance rénale terminale.

Cependant une transplantation rénale n'est pas sans conséquence pour le patient. En effet, le greffon est dans la majorité des cas reconnu comme étranger par le système immunitaire du receveur, et il s'en suit une forte réponse immunitaire intervenant notamment dans les phénomènes de rejet. Les patients sont donc contraints de prendre à vie des médicaments inhibant leur système immunitaire : les immunosuppresseurs.

II.1. La réponse immunitaire induite par une allogreffe.

II.1.1. Les mécanismes entrant en jeu.

La disparité antigénique HLA (pour « Human Leukocyte Antigen ») entre donneur et receveur est probablement le facteur le plus puissant pour stimuler la réponse immune. Elle induit une activation des lymphocytes T (LT) $CD4^+$, ce qui entraîne une mobilisation des LT $CD8^+$ notamment, ces derniers participant à la destruction des cellules du greffon.

Le devenir de cette réponse immune est influencé par le microenvironnement dans lequel elle s'effectue (organes lymphoïdes ou greffon). Un déterminant important est le profil local de sécrétion de cytokines (Shi *et al.*, 1997). Ainsi des expériences sur des modèles animaux ont révélé que le niveau local de sécrétion de cytokines modifiait les caractéristiques cliniques du rejet de greffe rénale, comme par exemple la faible expression d'interféron γ (IFNγ) qui

entraîne des rejets à lésions vasculaires (Wang *et al.*, 2003). Les cytokines sont sécrétées à la fois par les cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules dendritiques et les monocytes, et les cellules effectrices, telles que les LT, les lymphocytes B (LB) et les cellules « natural killer » (NK). Les LT peuvent être divisés en 4 grands types suivant le profil de cytokines synthétisées par eux ou les CPA (principalement les cellules dendritiques) : il s'agit de l'orientation de la réponse immunitaire (Figure 1).

La sécrétion de l'interleukine (IL)-12 (IL-12) par les cellules dendritiques oriente vers des LT CD4+ de type T helper 1 (Th1) qui synthétisent fortement de l'IFNγ. Les LT Th1 activeront ensuite à leur tour les LT CD8+ qui vont participer à la destruction des cellules du greffon (Goriely et Goldman, 2007). Sous l'influence de l'IL-4, les LT vont s'orienter vers une réponse de type Th2, synthétiser de l'IL-5 ainsi que de l'IL-13, et ainsi participer au rejet du greffon via les LB, comme le suggère notamment l'expression de gènes de type Th2 dans des biopsies de rejet aigu (Alegre et al., 2007). Le troisième type d'orientation est appelé Th17. Les LT CD4+ de ce type ont été orientés par l'IL-23, l'IL-6 et le « Transforming Growth Factor » (TGF) β et produisent entre autres de l'IL-17. Ils pourraient causer des lésions au greffon par l'induction d'une forte inflammation neutrophile-dépendante (Alegre et al., 2007).

Enfin, les LT n'ont pas qu'une activité effectrice et délétère envers le greffon : ils peuvent s'orienter vers un type régulateur suite à divers signaux particuliers, tels que le TGFβ et l'IL-10. Ces LT régulateurs ont la capacité d'induire une tolérance à un antigène donné en inhibant l'activation des LT effecteurs, ce qui, dans le cas d'une greffe allogénique, pourrait permettre d'augmenter la survie du greffon (Karim *et al.*, 2002; Waldmann et Cobbold, 2001). Ainsi, il a été rapporté que les LT régulateurs pouvaient induire une absence de réactivité des LT effecteurs vis-à-vis du donneur chez des patients transplantés rénaux (Velthuis et al., 2006).

Les 3 voies d'orientation effectrices peuvent interagir entre elles. En effet, il existe un mécanisme de balance Th1/Th2 par lequel la voie Th1 inhibe Th2 par l'IFNγ et vice-versa via l'IL-4 (de Jong *et al.*, 2005). De plus, les voies Th1 et Th2 peuvent chacune inhiber l'orientation des LT vers la voie Th17, notamment par l'IL-2 (Alegre *et al.*, 2007).

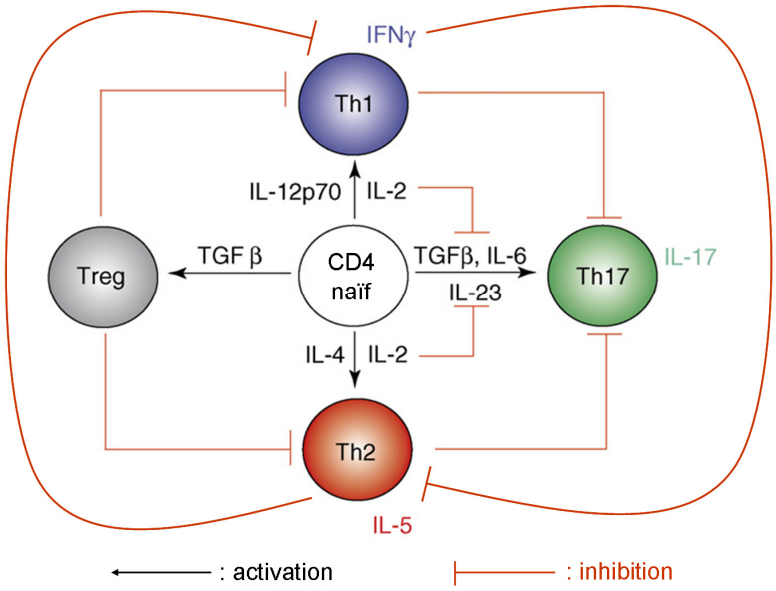


Figure 1. Orientation de la réponse lymphocytaire T CD4+ (d'après Alegre *et al.*, 2007).

La réponse immune, et notamment l'activation des LT naïfs, est aussi largement influencée par la nature des molécules de costimulation exprimées par les CPA et les LT qui déterminent le devenir de chaque réponse immunitaire : effecteur ou tolérance (Carreno et Collins, 2002; Sharpe et Freeman, 2002). Les principales voies de costimulation font intervenir les membres de la superfamille B7-CD28, et notamment l'interaction du complexe B7-1/B7-2 (CD80/CD86) sur les CPA avec la molécule CD28, puissant coactivateur des LT. Par ailleurs, la caractérisation de molécules de coinhibition dans cette superfamille, comme Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 (CTLA-4, un autre récepteur de B7) et Programmed Death-1 (PD-1), a permis d'avancer dans la compréhension du contrôle de l'immunité LT-dépendante (Chen, 2004). Cette famille de molécules est donc impliquée dans le contrôle de la réponse immune contre le greffon.

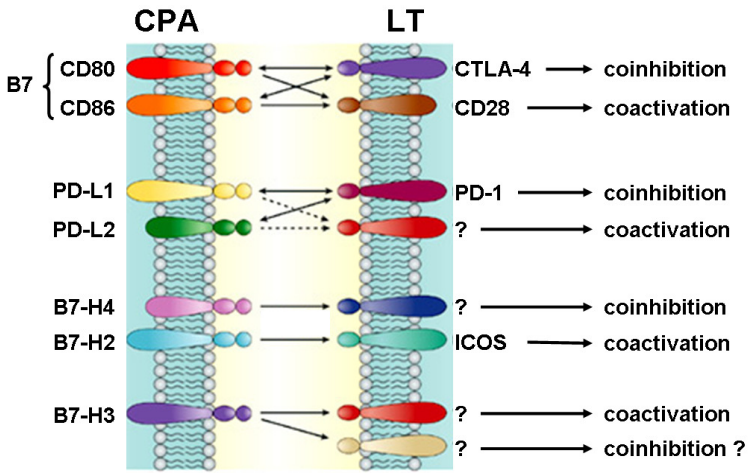


Figure 2. La superfamille B7-CD28 (d'après Chen, 2004).
Les principaux représentants sont le complexe B7 et ses récepteurs CD28 ou CTLA-4, activant ou inhibant respectivement les LT. Mais il a aussi été mis en évidence la molécule B7-H2, dont l'engagement avec son récepteur ICOS active les LT, ainsi que les molécules PD-L1 et PD-L2 qui inhibent les LT par leur liaison sur PD-1. Notons enfin l'existence de B7-H3 et B7-H4, dont les récepteurs et les effets sont peu caractérisés.

Il est donc rapidement apparu aux pionniers de la transplantation que la recherche et l'utilisation de produits inhibant cette réponse immunitaire anti-greffon s'avéraient nécessaires pour garantir l'intégrité du greffon.

II.1.2. Les immunosuppresseurs.

La 6-mercaptopurine est le premier immunosuppresseur découvert. Cette molécule peut en effet inhiber la prolifération des LT et prolonger la survie du greffon (Schwartz *et al.*, 1959). Cette découverte a constitué une étape déterminante pour le développement de la transplantation d'organe, notamment en intensifiant les recherches sur des molécules ayant le même effet. Ceci a permis le développement de nombreux autres immunosuppresseurs tels que les glucocorticoïdes, les anti-calcineurines, l'azathioprine, le mycophénolate mofétil (MMF), la rapamycine, les anticorps polyclonaux anti-lymphocytaires (ATG, pour « anti-thymocyte globulins »), ou encore les anticorps monoclonaux spécifiques du récepteur à l'IL-2 CD25 (anti-IL-2R) et de CD3 (anti-CD3).

Notre étude concernant les patients transplantés rénaux du service de Néphrologie et Immunologie Clinique du CHRU de Tours, seuls les immunosuppresseurs les plus couramment utilisés dans ce service seront détaillés.

II.1.2.1. Les glucocorticoïdes.

Leur effet sur les lymphocytes est principalement lié à l'inhibition de la sécrétion des cytokines. En effet, le complexe corticoïde/récepteur se fixe sur des séquences régulatrices, situées dans les promoteurs de gènes et appelées éléments de réponse aux glucocorticoïdes, et peut ainsi moduler la transcription des gènes concernés, notamment ceux codant l'IL-2, l'IL-6, l'IFNγ et le TNFα (Almawi *et al.*, 1996). De plus, les glucocorticoïdes peuvent également avoir un impact sur l'expression de gènes ne possédant pas d'éléments de réponse aux glucocorticoïdes, vraisemblablement en bloquant la translocation vers le noyau d'importants facteurs de transcription (Almawi *et al.*, 1996).

II.1.2.2. Les anti-calcineurines.

L'activation des LT par les antigènes du donneur entraine un signal calcique qui active une phosphatase, la calcineurine. Cette dernière permet la déphosphorylation de NF-AT, un facteur de transcription, qui va entrer dans le noyau pour activer la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Shibasaki *et al.*, 2002). Les anti-calcineurines, couplés à une protéine intracellulaire appelée immunophiline, inhibent l'activité de la phosphatase et donc la synthèse des cytokines, bloquant par là-même l'activation et l'activation des LT (Taylor et al., 2005). La cyclosporine et le tacrolimus sont les 2 principaux anti-calcineurines utilisés en transplantation et diffèrent par leur immunophiline.

II.1.2.3. L'azathioprine et le mycophénolate mofétil (MMF).

L'azathioprine est un immunosuppresseur cytostatique dont le principe actif, la 6-mercaptopurine, est libéré après hydrolyse. L'azathioprine est une forme de 6-mercaptopurine moins toxique que la 6-mercaptopurine pure. En tant qu'analogue des purines, cette dernière inhibe la synthèse d'ADN par antagonisme des bases puriques et a donc un effet anti-prolifératif, notamment sur les lymphocytes (Taylor *et al.*, 2005).

Le MMF libère après hydrolyse son principe actif, l'acide mycophénolique (MPA, pour « mycophenolic acid »), qui a été à l'origine identifié comme un produit de fermentation du champignon *Penicillium fungus*. Le MPA est un inhibiteur non compétitif et réversible de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), enzyme impliquée dans la synthèse *de novo* des nucléotides guanosines (Allison et Eugui, 2000). Les LT sont tous particulièrement dépendant de cette enzyme car elle constitue pour eux la seule voie de synthèse des

guanosines, d'où un puissant effet cytostatique du MPA sur les LT (Allison et Eugui, 2000). Cette molécule induit également l'apoptose des LT activés suite à une stimulation antigénique et empêche la glycosylation et l'expression de certaines molécules d'adhésion, ce qui limite ainsi le recrutement des lymphocytes vers les sites d'inflammation (Allison et Eugui, 2000). Le mécanisme d'action du MMF sur la prolifération des LT est similaire à celui de l'azathioprine, mais il est plus spécifique des LT et montre une meilleure efficacité contre le rejet aigu (European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group, 1995; Sollinger, 1995; The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group, 1996). Ainsi, le MMF a progressivement remplacé l'azathioprine dans les traitements immunosuppresseurs de routine depuis 1995.

II.1.2.4. Les anticorps anti-lymphocytaires.

Les anticorps anti-lymphocytaires ciblent spécifiquement les lymphocytes et sont majoritairement utilisés en traitement d'induction. Il existe 2 grands types d'anticorps anti-lymphocytaires utilisés en transplantation d'organe : les polyclonaux et les monoclonaux. Les premiers sont un mélange d'anticorps ciblant de nombreuses molécules de surface des lymphocytes et obtenus en inoculant des lapins ou des chevaux avec des cellules humaines. Ils induisent généralement une déplétion lymphocytaire périphérique, probablement par une réaction complément-dépendante (Taylor et al., 2005). L'exemple le plus utilisé en transplantation rénale est l'ATG.

Les seconds ciblent spécifiquement un épitope d'une molécule de surface. Ils agissent suivant divers mécanismes : déplétion complément-dépendante, modulation de l'expression de surface de la molécule ciblée, ou encore blocage de l'interaction avec le ligand de cette molécule (Taylor et al., 2005). Les anticorps monoclonaux sont de plus en plus utilisés, notamment parce que leur cible est mieux définie et qu'ils sont élaborés pour limiter la réponse immune inter-espèce. L'anticorps anti-IL-2R, qui reconnaît un épitope de la sous-unité α du récepteur à l'IL-2 (CD25), est le plus couramment utilisé.

II.2. Les principales complications.

Malgré les progrès observés dans les traitements immunosuppresseurs et la prise en charge des patients, il subsiste de nombreux problèmes qui affectent la survie à long terme des

greffons. Ces complications peuvent être dues à une maitrise inadéquate de la réponse immune par les traitements ou être causées par ces derniers. Si le rejet aigu est devenu maintenant une complication relativement peu fréquente (environ 15 à 20% des patients), le rejet chronique reste une cause importante de perte de greffon (Ponticelli, 2004). Par ailleurs, les lésions d'ischémie/reperfusion, traduites cliniquement par une reprise retardée de fonction du greffon, sont des facteurs importants de perte de greffon à long terme (Perico *et al.*, 2004). Enfin, les immunosuppresseurs, en plus de leurs effets toxiques intrinsèques, n'induisent pas de tolérance immune spécifique et inhibent le système immunitaire de façon non spécifique. Ils peuvent ainsi engendrer le développement de cancers et infections opportunistes.

II.2.1. Toxicité médicamenteuse.

Comme tout médicament, les immunosuppresseurs ont des effets secondaires délétères, dont certains sont directement causés par ces derniers et indépendants de leur effet sur le système immunitaire. On trouve en première ligne les glucocorticoïdes, dont les effets secondaires sont nombreux et bien connus : diabète, obésité, hypertension artérielle et ostéoporose sont des problèmes assez fréquents (Taylor et al., 2005).

Les anti-calcineurines sont également des immunosuppresseurs dont la toxicité est assez importante, les principaux problèmes rencontrés étant une néphrotoxicité et, dans une moindre mesure, une neurotoxicité dose-dépendantes (Taylor et al., 2005). Ainsi, un traitement à long terme peut causer des lésions chroniques irréversibles sur les greffons rénaux (Taylor et al., 2005).

La toxicité directe de l'azathioprine et du MMF est plus faible, ces immunosuppresseurs causant principalement des désordres hépatiques et gastro-intestinaux, respectivement (Taylor *et al.*, 2005).

II.2.2. Lésions d'ischémie/reperfusion.

Le phénomène d'ischémie/reperfusion (I/R) est intrinsèquement lié à la transplantation. En effet, la privation d'oxygène (ischémie) pendant plusieurs heures après le prélèvement puis le raccordement au système circulatoire du receveur (reperfusion) entraînent le relargage de nombreuses molécules associées à un signal nécrotique, ce qui cause des lésions au niveau du greffon. Cependant, ce phénomène mobilise également l'immunité innée et certains médiateurs de l'inflammation, ainsi que les cellules de l'immunité adaptative qui jouent un

rôle très actif dans les lésions observées (Boros et Bromberg, 2006). L'image histologique caractéristique est celle d'une nécrose tubulaire aigue.

Les lésions d'I/R peuvent se traduire cliniquement soit par une absence transitoire ou quasi absence de fonction du greffon dans la première semaine post-transplantation (DGF, pour « Delayed Graft Function ») nécessitant des séances de dialyse transitoires dans les formes les plus sévères, soit par une reprise lente et progressive de la fonction rénale (SGF, pour « Short Graft Function »), le DGF étant un important facteur diminuant la survie du greffon (Perico *et al.*, 2004).

La fréquence rapportée des lésions d'I/R est très variable d'une étude à l'autre (habituellement comprise entre 10 et 50% des patients), atteignant 39% à Tours (22% de DGF et 17% de SGF). Les facteurs de risque qui vont entraîner une expression clinique plus ou moins sévère des lésions d'I/R sont multiples, mais citons notamment l'âge du donneur, le temps d'ischémie froide et l'immunisation anti-HLA en prégreffe du receveur (Perico *et al.*, 2004).

II.2.3. Rejet aigu et rejet chronique.

La disparité HLA donneur/receveur a pour principales conséquences le rejet aigu (touchant de 15 à 20% des patients durant la première année) mais aussi possiblement le rejet chronique. Le rejet aigu est dû à une activation des LT $CD4^+$ du receveur après reconnaissance des antigènes incompatibles du donneur qui sont exprimés à la surface des CPA du donneur pour la présentation directe ou du receveur pour la présentation indirecte (Figure 3). Certaines données expérimentales chez les rongeurs suggèrent que la présentation directe par les CPA du donneur joue un rôle dominant dans le rejet aigu précoce, d'autant plus qu'elle mobilise un répertoire plus polymorphe et plus important (Benichou, 1999). Cependant il est clair que la voie indirecte peut entraîner des rejets aigus assez précoces et indépendamment de la stimulation de la voie directe (Reed *et al.*, 2003; Roussey-Kesler *et al.*, 2005). De plus, Mandelbrot *et al.*, sur des souris dont les gènes B7-1 et B7-2 ont été invalidés, ont même montré que la voie directe de présentation (greffon de type sauvage renfermant donc des CPA normales non déficitaires en B7) ne permet pas d'induire un rejet aigu de greffe cardiaque murine chez un receveur dont les CPA sont déficitaires en B7-1 et B7-2, pour lesquels la voie indirecte est donc absente (Mandelbrot *et al.*, 1999). Ceci suggère donc que les CPA du receveur (voie indirecte) jouent un rôle capital dans la genèse du rejet aigu de greffe cardiaque, du moins dans certaines combinaisons CMH incompatibles. Chez l'homme, dans

la mesure où on ne peut étudier ces deux voies séparément in vivo, il est difficile d'affirmer avec certitude laquelle est dominante, mais il semble qu'elles soient toutes les 2 détectables longtemps après la transplantation (Bestard *et al.*, 2008).

Une conférence de consensus (Banff 2007) a établi la classification histologique des rejets selon trois critères : la densité des cellules infiltrant l'interstitium, le nombre de cellules infiltrant les tubules et celui infiltrant les endothéliums (Solez *et al.*, 2008).

Cependant, la cause la plus importante de perte des greffons sur le long terme n'est pas le rejet aigu mais le rejet chronique (Ponticelli, 2004). Cette pathologie a été récemment mieux caractérisée grâce à la nouvelle classification histologique de Banff. Elle est différenciée en deux catégories chroniques : humorale (type 2) ou chronique cellulaire (type 4). La première est C4d positive et présente des contours glomérulaires doubles et/ou un dédoublement des membranes basales des capillaires péri-tubulaires et/ou une fibrose interstitielle avec atrophie tubulaire et/ou un épaississement fibreux de l'intima. La seconde présente une fibrose intimale avec infiltration de cellules mononuclées au sein de la fibrose et la formation de néo-intima. Le rejet chronique finit par évoluer vers une fibrose interstitielle et une atrophie tubulaire diffuse (FI/AT) associée à un déclin progressif de la fonction rénale (CAN, pour « Chronic Allograft Nephropathy »). Cette néphropathie résulte d'une association ou d'une succession de diverses agressions dont les plus importantes sont l'ischémie/reperfusion, la réponse immune de l'hôte dirigée spécifiquement contre le donneur, et enfin la toxicité directe de certains médicaments (au premier rang les anti-calcineurines de type cyclosporine). Ces agressions répétées, associées à une capacité réparatrice insuffisante du rein, sont à l'origine de la dégradation progressive de la fonction rénale. Même si, pour un patient pris individuellement, la part dominante de chacun de ces facteurs est souvent difficile à discerner, de nombreuses données cliniques et biologiques montrent que le système immunitaire de l'hôte est un acteur majeur à l'origine du rejet chronique.

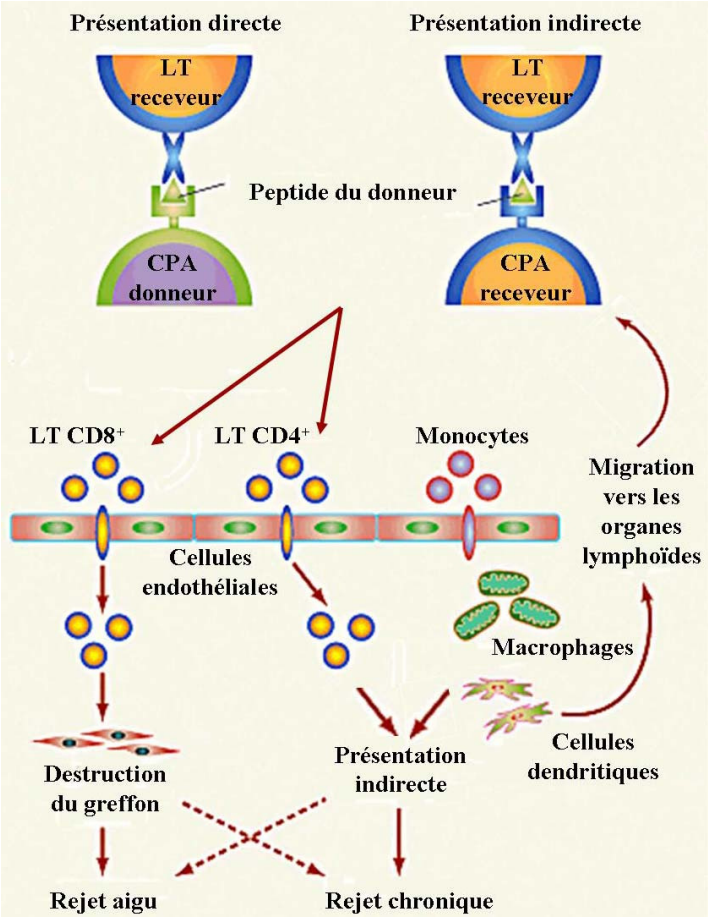


Figure 3. Mécanismes du rejet de greffe (d'après (Briscoe et Sayegh, 2002).
La présentation des antigènes du greffon se fait par les CPA (dont les cellules dendritiques) du donneur ayant migré dans les organes lymphoïdes du receveur (présentation directe) ou par celles du receveur s'étant infiltrées dans le greffon et ayant après migré vers les organes lymphoïdes du receveur (présentation indirecte). Les LT ainsi activés migrent vers le greffon et s'y infiltrent pour participer à sa destruction : c'est le rejet aigu. La réaction immunitaire est entretenue au sein du greffon et finit par provoquer un rejet chronique.

II.2.4. Infections.

Comme indiqué précédemment, les immunosuppresseurs déprime le système immunitaire de façon non spécifique et peuvent donc engendrer le développement d'infections opportunistes. Les infections virales sont les principaux pathogènes opportunistes suite à une transplantation d'organe, avec en première ligne le cytomégalovirus (CMV). On peut aussi observer des infections bactériennes (des pyélonéphrites aigues du greffon) et fongiques (peu fréquentes en transplantation rénale).

L'infection à CMV est la plus fréquente cause d'infection après transplantation d'organe (Sagedal *et al.*, 2000). C'est pourquoi nous nous sommes tout particulièrement intéressés à cet

agent infectieux. La plupart des adultes sont infectés par cet herpès-virus, ce dernier restant latent au cours de la vie dans des sites spécifiques tels que les progéniteurs hématopoïétiques et les monocytes. Bien que les mécanismes actifs impliqués dans le maintien de la latence restent encore peu connus, des études cliniques (Asadullah *et al.*, 1999; Heininger *et al.*, 2001; Söderberg-Nauclér, 2008; von Müller *et al.*, 2007) et expérimentales (Söderberg-Nauclér *et al.*, 1997) ont montré qu'une inflammation pouvait initier la sortie de latence virale via l'activation NFκB-dépendante de son promoteur IE1/2, ce dernier étant indispensable à la production de particules virales.

En réponse à ces événements infectieux, l'hôte mobilise habituellement l'immunité innée et adaptative, via l'activation des cellules NK, des LT $CD8^+$ et des LT γ/δ (Halary *et al.*, 2005; Lafarge *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Ninomiya *et al.*, 2000; Presti *et al.*, 1998).

Le CMV représente une faible menace pour les individus immunocompétents, chez qui il est généralement bien contrôlé, même si on peut observer des réactivations du virus chez des patients immunocompétents en période inflammatoire (Asadullah *et al.*, 1999; Heininger *et al.*, 2001). Par contre, l'infection à CMV chez des immunodéprimés tels que les transplantés d'organe est directement et indirectement associée à un taux de morbidité non négligeable. Le CMV a ainsi été rapporté comme ayant un effet sur la survie du greffon rénal (Brennan, 2001) et est suspecté d'être une cause de dysfonction chronique du greffon tant en transplantation humaine (Humar *et al.*, 1999; Hussain *et al.*, 2007; Potena *et al.*, 2006) que sur des modèles animaux (Lautenschlager *et al.*, 1997).

En transplantation, on distingue 2 principaux états cliniques : le premier est réplicatif mais asymptomatique, communément appelé infection à CMV, tandis que le second est réplicatif avec des atteintes organiques, appelé maladie à CMV. Si l'impact négatif de la maladie à CMV sur le devenir du greffon rénal est bien documenté et reconnu, celui de l'infection asymptomatique reste par contre encore peu clair, avec certaines études rapportant un effet sur le rejet aigu et la survie du patient et d'autres montrant une absence d'association avec le rejet aigu et la survie du greffon (Sagedal *et al.*, 2005). Deux principales stratégies ont été proposées pour la gestion du CMV en transplantation : la première consiste à traiter les patients avant la détection d'une réplication virale (traitement prophylactique), alors que la seconde ne traite les patients qu'à partir de la détection d'une réplication virale mais avant l'apparition de symptômes (traitement préemptif). La prescription d'un traitement prophylactique pour les patients à haut risque de maladie à CMV, tels que les séronégatifs

pour le CMV avant la greffe recevant un rein séropositif (D^+/R^-) et donc sujets à une primo-infection (80% de risque), est très largement admise. Cependant, la stratégie pour les receveurs séropositifs (R^+) reste encore sujette à débats, ces derniers étant moins à risque d'activation du CMV (50% environ dans notre centre).

Un consensus a émergé sur le bénéfice de les traiter avant l'émergence des signes cliniques, la supériorité de la prophylaxie universelle sur le traitement préemptif n'étant pas encore définitivement démontrée. En effet, non seulement il n'y a pas de certitudes concernant l'impact de l'infection asymptomatique sur le devenir du greffon, mais en plus, puisque seulement certains R^+ développeront une infection à CMV, la prévention universelle chez ces patients soulève les problèmes associés aux traitements antiviraux : le prix élevé, les effets secondaires et le possible développement de résistances (Khoury *et al.*, 2006). Il reste donc probablement à mettre en évidence des critères autres que la sérologie en prégreffe pour la prise en charge du CMV en transplantation rénale.

II.2.5. Cancers.

Suite à l'immunodépression causée par les immunosuppresseurs, on peut observer l'émergence de cancers ou le développement de tumeurs qui auraient normalement été maîtrisées par un système immunitaire efficace. Les immunosuppresseurs peuvent aussi augmenter le risque de cancer directement par leurs mécanismes d'action, comme c'est le cas pour l'azathioprine, ou indirectement en causant la réactivation de virus pro-oncogènes tels que l'Epstein-Barr virus (Moal, 2008).

Le risque global de cancer chez les transplantés rénaux est de 3 à 5 fois supérieur à celui de la population générale, celui des cancers cutanés, qui sont les plus communs, étant multiplié par 100 (Moal, 2008). Loin derrière ces derniers, les autres cancers fréquents après transplantation rénale sont les cancers solides et lympho-prolifératifs. Les décès par cancers post-transplantation représentent la deuxième cause de perte de greffon.

II.3. Les défis actuels.

La survie à 10 ans d'un greffon rénal est de 63% en France (rapport annuel 2007 de l'Agence de Biomédecine). Il est apparu qu'un plateau s'était installé depuis quelques années

concernant l'évolution de la survie des greffons, et ce malgré les progrès dans les traitements et la prise en charge des patients (la courbe de survie du greffon des patients transplantés entre 1995 et 1999 est la même que celle des patients transplantés entre 2000 et 2006 ; Figure 4).

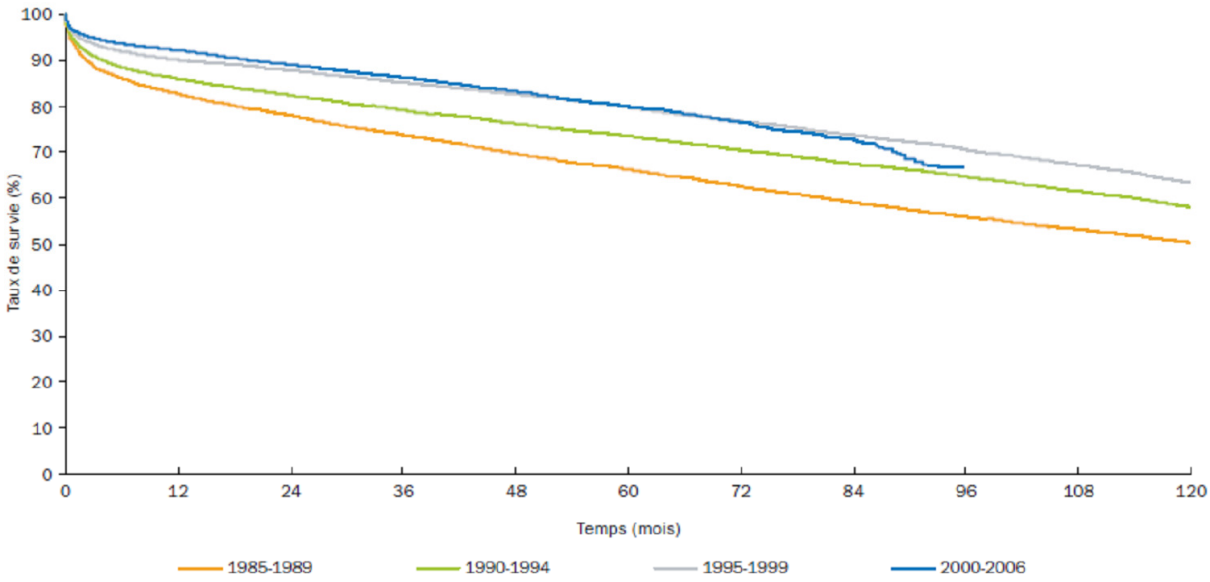


Figure 4. Survie du greffon rénal selon la période de la greffe (rapport annuel 2007 de l'agence de Biomédecine).
La survie du greffon a été calculée avec une analyse de Kaplan-Meier pour 4 périodes de greffes : 1985 à 1989 (orange), 1990 à 1994 (vert), 1995 à 1999 (gris) et 2000 à 2006 (bleu). Les courbes obtenues représentent le taux de survie du greffon en fonction temps post-transplantation.

Les causes de ces pertes sont diverses, mais il apparaît qu'à immunosuppression et disparité HLA égales, tous les patients ne vont pas développer le même schéma de complications. Les variabilités inter-individuelles dans le type de la réponse immune (synthèse cytokinique et niveau d'expression d'autres molécules de l'immunité) pourraient être des facteurs de cette disparité. Nous avons vu auparavant que les polymorphismes génétiques pouvaient influencer l'expression génique et la fonction de nombreuses protéines. Ces observations suggèrent que des polymorphismes génétiques pourraient être un facteur potentiel influençant le devenir clinique des greffons.

Ainsi, une meilleure connaissance de ces polymorphismes pourrait permettre d'adapter individuellement les traitements immunosuppresseurs en fonction de l'intensité de la réponse immune anti-greffon.

III. Les polymorphismes génétiques en transplantation rénale.

III.1. Etat des connaissances.

Le polymorphisme le plus anciennement décrit et le plus connu pour influencer le devenir du greffon chez l'homme est celui du complexe majeur d'histocompatibilité, ou CMH (Dausset, 1981).

Depuis, d'autres molécules ont été étudiées, et plus particulièrement celles liées à l'immunité. En transplantation rénale, de nombreux polymorphismes ont déjà été étudiés et ont été associés à divers événements liés à la greffe (Krüger et al., 2008). C'est dans ce domaine que se situe notre étude. Toutes ces études ont été effectuées avec l'approche gènes-candidats, et souvent sans cohorte de validation, aucune équipe n'ayant publié à notre connaissance d'étude pan-génomique en transplantation rénale.

III.1.1. Rejets et survie.

Un SNP du gène codant la protéine Fas (molécule membranaire impliquée notamment dans les mécanismes de mort cellulaire) chez le donneur a été associé au risque de rejet aigu (Cappellesso *et al.*, 2004), et il en est de même chez le receveur pour 2 polymorphismes dans les gènes codant TNFα et l'IL-10, également associés à l'expression transcriptionnelle des gènes et la production des protéines (Krüger *et al.*, 2008). De plus, il a été démontré que des substitutions dans le gène codant TLR-4 chez les receveurs protégeaient contre le rejet aigu et l'athérosclérose après transplantation rénale (Ducloux *et al.*, 2005). Par ailleurs, il a été décrit un lien négatif possible entre un SNP du gène codant CTLA4 chez le receveur et le rejet aigu (Wisniewski *et al.*, 2006), et un haplotype du receveur constitué à partir de 3 SNP du gène codant la PGP a été relié à un risque plus élevé de rejet aigu (Bandur et al., 2008). Enfin, il a été récemment publié qu'un SNP du gène codant l'IL-6 chez le receveur, affectant la production de la cytokine, était associé au risque de rejet chronique, avec notamment un risque relatif pouvant atteindre 3 (Pawlik *et al.*, 2005).

Les plus importantes études ayant montré une association entre un polymorphisme de gène de l'immunité chez le receveur et la survie à long terme du greffon rénal concernent le SNP du gène de l'IL-6 déjà relié au rejet chronique (Muller-Steinhardt *et al.*, 2004; Muller-Steinhardt *et al.*, 2002) ; d'ailleurs cet impact sur la survie du greffon et le rejet chronique a été retrouvé en transplantation cardiaque (Densem *et al.*, 2005). On notera également une étude sur une grande cohorte de transplantés rénaux qui a montré que les patients homozygotes pour la délétion delta 32 du gène codant CCR5 avaient une meilleure survie du greffon que les autres, avec un risque de perdre le greffon près de 3 fois moins élevé (Fischereder *et al.*, 2001). Par ailleurs, il a tout récemment été rapporté une association entre un polymorphisme du gène codant ICOS (pour « inducible costimulator ») et la survie du greffon (Haimila *et al.*, 2009).

Enfin, on peut citer l'étude rapportant une association entre le génotype donneur/receveur d'un SNP dans le gène codant le C3 (composant 3 du complément) et la survie du greffon (Brown *et al.*, 2006). Cependant, ces résultats n'ont pas été retrouvés par une autre équipe étudiant une cohorte plus importante (Varagunam *et al.*, 2009), ce qui montre bien l'importance des cohortes de validation dans une étude d'association clinique.

III.1.2. Retard de reprise du greffon (DGF).

Très peu d'étude ont concerné l'effet du polymorphisme du receveur sur le DGF et seules 2 ont rapporté une association significative, concernant les gènes d'ICOS et de la molécule HLA-A (Haimila *et al.*, 2009; Kamoun *et al.*, 2008). Ceci n'est pas étonnant quand on considère que le DGF est un événement plutôt précoce et que donc sa part immunologique concernerait plutôt des caractéristiques du donneur telles que la présentation directe des antigènes par les CPA du donneur. Ainsi 2 études ont rapporté une association entre le polymorphisme du donneur et le DGF et concernaient le TNFα (Alakulppi *et al.*, 2004; Israni *et al.*, 2008), mais ce résultat ne reste significatif après analyse multivariée que dans une seule (Alakulppi *et al.*, 2004).

III.1.3. Cytomégalovirus.

L'impact du polymorphisme génétique sur l'infection au cytomégalovirus (CMV) après transplantation rénale est assez peu documenté. Un SNP du donneur dans le gène codant l'IL-10 a été associé à la primo-infection du CMV, ce qui ne concerne donc que les patients D^+/R^- (Alakulppi *et al.*, 2006), et des études ont rapporté une association entre 2 SNP du receveur

dans le gène codant TLR4 et la maladie à CMV (Cervera *et al.*, 2007; Ducloux *et al.*, 2005). Notons qu'en transplantation hépatique, un SNP du receveur dans le gène de TLR2 a été associé à la charge virale ainsi qu'au risque de maladie à CMV (Kijpittayarit *et al.*, 2007).

III.1.4. Cancer de la peau

Peu d'études ont également été faites concernant l'influence du polymorphisme génétique du receveur sur la survenue du cancer de la peau après transplantation rénale. Les résultats significatifs ne concernent que quelques SNP, dont un seulement touche le gène d'une molécule de l'immunité, l'IL-10 (Alamartine *et al.*, 2003) ; les autres sont situés dans le gène codant p53 (McGregor *et al.*, 2002), une protéine du cycle cellulaire à effet anti-tumoral, ainsi que ceux codant la méthylène-tétrahydrofolate réductase (Laing *et al.*, 2007), une enzyme du métabolisme cellulaire, et la superfamille de la glutathione S-transférase (Ramsay *et al.*, 2001), qui contient des enzymes de détoxification cellulaire.

III.2. Les polymorphismes étudiés dans notre travail.

Dans cette étude, nous avons choisi d'étudier d'autres polymorphismes en transplantation rénale, le choix ayant été fait en fonction de 4 critères : ils devaient concerner des gènes de l'immunité, avoir été caractérisés antérieurement, avoir un effet sur la réponse immune caractérisé *in vitro* ou être associé cliniquement à la survenue de maladies dysimmunitaires, et enfin être non étudiés en transplantation rénale.

Notre choix s'est ainsi porté sur 6 gènes, qui codent l'IL-12p40, PD-1 (pour « Programmed Death-1 »), AIF-1 (pour « Allograft Inflammatory Factor-1 »), Lyp (pour « Lymphoid-associated phosphatase »), ainsi que TIM-1 et -3 (pour « T-cell Immunoglobulin Mucin »).

III.2.1. Interleukine-12 p40 (IL-12p40).

III.2.1.1. Description et fonction.

L'IL-12 est une cytokine de 70 kDa composée de 2 sous-unités, p35 et p40, qui sont respectivement codées par *IL12A* et *IL12B* (Sieburth *et al.*, 1992). Ces 2 gènes sont situés sur 2 chromosomes différents. L'IL-12p70 est principalement produite par les macrophages et les

monocytes après activation par un antigène (Trinchieri, 2003), et la liaison avec son récepteur de haute affinité, composé de 2 chaînes β1 et β2, stimule la production d'IFNγ par les LT et les cellules NK (Magram *et al.*, 1996; Trinchieri, 2003). Elle agit ainsi comme l'acteur majeur de la balance Th1/Th2, stimulant la réponse anti-infectieuse et anti-greffon via la voie Th1.

L'IL-12p40, hormis son intervention dans la formation de l'IL-12p70, entre aussi dans la composition de 2 autres molécules. Tout d'abord, elle peut former un homodimère p40-p40, soit p80. IL-12p80 peut interagir avec la sous-unité β1 du récepteur à l'IL-12 et avoir sur les cellules cibles des effets complexes et plutôt controversés (Cooper et Khader, 2007). L'IL-12p80 a tout d'abord été considérée comme un antagoniste spécifique de l'IL-12p70 car, outre son effet antagoniste *in vitro* sur des cellules murines (Mattner *et al.*, 1993), il a été rapporté que l'injection de p80 protégeait des souris d'un choc septique IL-12-dépendent (Mattner *et al.*, 1997) et diminuait la production d'IFNγ suite à un challenge à l'endotoxine, toujours chez la souris (Heinzel *et al.*, 1997). Par ailleurs, un rôle activateur de p80 a récemment été révélé chez les rongeurs. Ainsi, p80 semble inhiber la synthèse d'IFNγ par les LT $CD4^+$ mais stimuler celle des LT $CD8^+$ (Piccotti *et al.*, 1997), agir comme un chimioattractant pour les macrophages (Ha *et al.*, 1999) et déclencher la migration des cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques pour activer les LT (Khader *et al.*, 2006). En transplantation d'organe, une étude a rapporté que la surexpression de p80 dans un modèle murin de transplantation pulmonaire augmentait la dysfonction chronique du greffon (Mikols *et al.*, 2006). Cependant, chez l'homme, l'affinité de p80 pour le récepteur à l'IL-12 est beaucoup plus faible en comparaison de l'IL-12p70 et il n'a de plus pas été mis en évidence de production de p80 par des cellules non transfectées, et ce malgré des conditions où de fortes quantités de p40 libres étaient produites (Trinchieri, 2003). Il semble donc que chez l'homme l'homodimère p80 ne soit pas un antagoniste de l'IL-12p70 et qu'on ne puisse pas pour le moment attribuer avec certitude les effets agonistes à p80, p40 seule ou aux deux. D'ailleurs, une étude montrant chez la souris une très forte augmentation de la concentration sérique en Il-12p40 après une infection à CMV (Ruzek *et al.*, 1997) tendrait à prouver un effet de p40 à l'état de monomère.

L'IL-12p40 peut également former, avec la sous-unité p19, l'IL-23. Cette dernière semble avoir un effet similaire à l'IL-12 concernant la production d'IFNγ, mais son rôle principal est l'orientation des LT $CD4^+$ vers la voie Th17 pour la mise en place d'une inflammation induite notamment par les neutrophiles (Goriely et Goldman, 2007). L'IL-23 joue ainsi un rôle

important dans divers maladies infectieuses, auto-immunes et dans certains rejets en transplantation.

III.2.1.2. Le polymorphisme étudié.

Un SNP a été décrit dans la région 3'UTR (pour « untranslated region ») du gène *IL12B* (rs3212227) au nucléotide 16974 (numéro Genbank : AY008847), ce qui correspond à la position 1188 dans l'ARN messager (Hall *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000). Cette substitution de A en C, avec une fréquence de l'allèle variant C d'environ 20-23% chez des contrôles sains, crée un site de restriction pour l'enzyme *Taq*I et son impact fonctionnel a été démontré. En effet, l'allèle C a été associé à une diminution de stabilité de l'ARN_m de p40 (Hirota *et al.*, 2005; Morahan *et al.*, 2001) ainsi qu'à une baisse de production de p40 par des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC, pour « Peripheral Blood Mononuclear Cells ») activées (Miteva et Stanilova, 2008; Stanilova et Miteva, 2005). Ce polymorphisme a également un impact clinique : des études ont notamment identifié l'allèle C comme un facteur de risque de dermatite atopique (Tsunemi *et al.*, 2002) et de maladies infectieuses telles que la tuberculose et la salmonellose (Freidin *et al.*, 2006), ainsi qu'un facteur protecteur contre le psoriasis (Cargill *et al.*, 2007; Tsunemi *et al.*, 2002), la sclérose en plaques (van Veen *et al.*, 2001) et le diabète de type 1 (Morahan *et al.*, 2001). On peut d'ailleurs noter que cet effet négatif concernant des pathologies de type Th1 ou une maladie auto-immune de type Th2 et la protection contre des maladies auto-immunes de type Th1 peuvent s'expliquer la diminution de production de p40 avec l'allèle C. Cependant, l'impact de ce SNP sur les événements cliniques survenant après transplantation rénale n'a jusqu'à maintenant jamais été rapporté.

III.2.2. Programmed Death-1 (PD-1).

III.2.2.1. Description et fonction.

PD-1 est une molécule de coinhibition appartenant à la superfamille B7-CD28 et codée par le gène *PDCD1*. Cette protéine membranaire est majoritairement exprimée sur les LT et LB activés, mais elle se retrouve aussi sur les cellules NK et les monocytes activés (Sharpe *et al.*, 2007). Des études *in vitro* ont montré que PD-1 inhibait l'activation lymphocytaire et la production cytokine (notamment l'IFNγ) après engagement par ces ligands PD-L1 (ou B7-

H1) et PD-L2 (ou B7-DC), principalement exprimés par les CPA (Freeman *et al.*, 2000; Latchman *et al.*, 2001). En fait, PD-1 possède dans sa partie intra-cytoplasmique un domaine ITIM (pour « Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif »). Il transduit un signal inhibiteur lorsqu'il est engagé par ses ligands en même temps que l'engagement du récepteur des LT (TCR, pour « T Cell Receptor ») ou de celui des LB (BCR, pour « B Cell Receptor ») par les molécules du CMH, et cela en recrutant des phosphatases qui vont inhiber les effecteurs des voies TCR, BCR et CD28 (Latchman *et al.*, 2001; Parry *et al.*, 2005). Par ailleurs, il a été montré que des souris congéniques dont le gène *PDCD1* a été supprimé (souris PD-$1^{-/-}$) présentaient d'important troubles immunitaires, avec notamment une arthrite proliférative de type lupus et une glomérulonéphrite, ainsi que des LT CD8+ PD-$1^{-/-}$ qui voyaient leur prolifération fortement augmentée *in vitro* (Nishimura *et al.*, 1999). Ces résultats suggère un rôle de régulateur de la tolérance périphérique du soi, ce qui a été confirmé par d'autres études (Keir *et al.*, 2006; Latchman *et al.*, 2004). Plusieurs études ont également montré que PD-1 pouvait réguler la réponse immune durant les infections virales, laissant apparaître que certains pathogènes pouvaient exploiter la voie PD-1 pour échapper au système immunitaire (Sharpe *et al.*, 2007). D'ailleurs, ceci a récemment été mis en évidence pour le CMV (Benedict *et al.*, 2008; Sester *et al.*, 2008). La voie PD-1 joue donc un rôle majeur dans la balance entre les signaux de stimulation et d'inhibition impliqués dans la réponse antimicrobienne et dans la tolérance du soi.

III.2.2.2. PD-1 en transplantation.

L'implication de PD-1 en transplantation a été assez peu étudiée. Cependant, une étude chez des transplantés rénaux a rapporté que l'expression de l'ARN_m de PD-1 semblait plus élevés chez les patients ayant présenté un rejet aigu que chez les autres (Alakulppi *et al.*, 2007). De plus, il semble que le blocage de la voie PD-1 dans un modèle de greffe de moelle osseuse supprime l'immunomodulation et la protection contre la maladie du greffon contre l'hôte induites par les LT régulateurs (Kitazawa *et al.*, 2007), ce qui suggère que PD-1 pourrait être une voie utilisée par ces derniers pour leur activité suppressive en transplantation. Enfin, il apparaît que la voie PD-1 joue aussi un rôle protecteur pour le rein contre les agressions liées à la réponse immunitaire. Ainsi plusieurs études ont montré que PD-L1 était exprimé par les cellules épithéliales du tubule rénal pour supprimer l'activation des LT et la synthèse cytokinique de ces derniers (Ding *et al.*, 2005; Schoop *et al.*, 2004; Waeckerle-Men *et al.*, 2007). Tout ceci renforce l'intérêt d'étudier l'expression de PD-1 en transplantation rénale.

III.2.2.3. Le polymorphisme étudié.

Un SNP a récemment été caractérisé dans l'intron 4 de *PDCD1* (rs11568821) et appelé PD-1.3 (Prokunina *et al.*, 2002). Cette substitution de G en A au nucléotide 7809 (numéro GenBank : AF363458) crée un site de restriction pour l'enzyme *Pst*I et supprime un site de fixation pour le facteur de transcription Runx1. L'allèle A entraîne ainsi une diminution de l'activité transcriptionnelle de *PDCD1* (Bertsias *et al.*, 2009), mais aussi une diminution de sa fonction inhibitrice dans des LT $CD4^+$ de patients atteints de sclérose en plaques (Kroner *et al.*, 2005) ainsi qu'une diminution de l'expression de PD-1 et de sa fonction inhibitrice dans des LT $CD4^+$ de patients atteints de lupus (Bertsias *et al.*, 2009). Par ailleurs, ce polymorphisme a également un impact clinique, l'allèle A ayant été rapporté comme facteur de risque de lupus (Prokunina *et al.*, 2002), de néphrites liées au lupus (Johansson *et al.*, 2005; Prokunina *et al.*, 2004), d'aggravation de la sclérose en plaque (Kroner *et al.*, 2005), et de diabète de type 1 (Nielsen *et al.*, 2003), ce qui est en accord avec la baisse de fonction de PD-1 observée pour l'allèle variant A. Enfin, on peut noter que la fréquence de l'allèle variant A n'est pas la même partout en Europe et augmente sur un axe allant du Nord-est vers le Sud-ouest (Ferreiros-Vidal *et al.*, 2007) seulement pour les individus sains, ce qui pourrait rendre les précédentes études d'association sujettes à caution. Cela nous permet tout de même d'estimer la fréquence de l'allèle A dans notre pays : environ 12-15% chez des individus sains.

L'association avec des lésions rénales justifie fortement l'étude de PD-1.3 en transplantation rénale. Cependant, hormis une étude montrant l'absence d'association entre PD-1.3 et le rejet aigu, le DGF ainsi que la survie du greffon (Haimila *et al.*, 2009), aucun autre travail n'a été rapporté jusqu'à maintenant concernant l'impact de PD-1.3 sur les événements cliniques suivant une transplantation rénale.

III.2.3. Allograft Inflammatory Factor-1 (AIF-1).

III.2.3.1. Description et fonction.

AIF-1 est une protéine identifiée pour la première fois dans le greffon cardiaque de rats présentant un rejet chronique et qui semble jouer un rôle majeur dans la réponse immunitaire et la vasculopathie proliférative liées à cet événement (Utans *et al.*, 1995). Cette protéine est

presque exclusivement produite par les macrophages et les neutrophiles, son expression étant fortement induite par l'IFNγ et le TGFβ (Sibinga *et al.*, 2002; Utans *et al.*, 1995). Trois isoformes ont été identifiées et sont issues d'épissages alternatifs différents ; elles sont toutes inductibles par l'IFNγ, mais seule l'expression de l'isoforme 2 semble être augmentée par le TGFβ (Del Galdo *et al.*, 2006). La fonction d'AIF-1 n'est pas entièrement connue, mais il a été montré qu'elle stimulait la synthèse de l'IL-6, IL-10 et IL-12 chez une lignée cellulaire de macrophages murins activés avec le LPS (Watano *et al.*, 2001). De plus, sa forte expression dans les vasculopathies liées aux rejets de greffe semblent indiquer un rôle majeur dans le remodelage et la réparation vasculaire (Autieri, 1996). Enfin, son expression dans les lésions inflammatoires liées à des maladies auto-immunes et sa diminution d'expression chez des patients recevant des traitements immunosuppresseurs suggèrent également un rôle majeur dans l'auto-immunité et les processus inflammatoires en général (Liu *et al.*, 2007). Toutes ces données démontrent l'intérêt d'étudier AIF-1 en transplantation rénale dans le contexte de la réponse immunitaire anti-greffon, d'autant plus qu'une expression augmentée d'AIF-1 a été mise en évidence dans des biopsies de greffon de transplantés rénaux ayant présenté un rejet aigu en comparaison avec les patients n'en ayant pas présentés (Grimm *et al.*, 1999).

III.2.3.2. Le polymorphisme étudié.

Le polymorphisme génétique d'AIF-1 est peu étudié et les travaux publiés sont tous très récents. Un SNP a récemment été caractérisé dans le gène *AIF1* (rs2269475) et se situe exclusivement dans l'exon 4 de l'isoforme 2 d'AIF-1 (Otieno *et al.*, 2007). Cette substitution de G en A, en position +899 dans l'ARN_m (numéro d'accession GenBank : NM_004847), cause une substitution non synonymique dans la séquence de la protéine (tryptophane en arginine). La fréquence de l'allèle variant A est d'environ 10-13% dans une population d'individus sains. Bien que son impact fonctionnel sur l'expression de la protéine soit encore inconnu, il apparaît que ce SNP a un effet clinique, et notamment sur des maladies auto-immunes. L'allèle A a ainsi été mis en évidence comme facteur de risque de sclérodermie (Otieno *et al.*, 2007), pathologie où l'expression d'AIF-1 est augmentée dans les lésions (Del Galdo *et al.*, 2006), mais aussi de polyarthrite rhumatoïde (Pawlik *et al.*, 2008), ce qui suggère que l'allèle variant A pourrait augmenter la production et/ou l'activité d'AIF-1. Cependant, malgré un impact de ce SNP sur la réponse immunitaire, son effet sur les événements cliniques survenant après transplantation rénale n'a jusqu'à maintenant jamais été rapporté.

III.2.4. Lymphoid-associated protease (Lyp).

III.2.4.1. Description et fonction.

Lyp est une tyrosine phosphatase intracellulaire codée par le gène *PTPN22* et exprimée tout particulièrement dans les LT et LB activés (Cohen *et al.*, 1999). Cette protéine se lie avec la tyrosine-kinase Csk qui inhibe les kinases de la famille Src et qui représente un important régulateur négatif du signal TCR (Bottini *et al.*, 2006). Les 2 protéines ensemble ont alors un effet inhibiteur synergique sur le signal du TCR en ciblant différentes tyrosines des mêmes enzymes, même si Lyp a également un effet inhibiteur à elle seule (Bottini *et al.*, 2006). Cependant, certaines parties de la fonction de Lyp restent obscures. En effet, on ignore la façon dont le complexe Csk/Lyp cible les kinases Src, vu que ces dernières sont regroupées dans les radeaux lipidiques et qu'on n'y trouve pas ce complexe (Bottini *et al.*, 2006). De plus, même si de petites quantités de Lyp seule se retrouvent au niveau des radeaux lipidiques, ce qui s'accorde avec son effet direct sur les kinases Src (Bottini *et al.*, 2006), des souris $PEP^{-/-}$ (l'orthologue de Lyp) présentent une signalisation TCR et BCR intacte chez des lymphocytes naïfs (Hasegawa *et al.*, 2004). Il faut une seconde stimulation pour observer une hyper prolifération des lymphocytes (Hasegawa *et al.*, 2004). Il n'en reste pas moins que sa fonction de régulateur du signal TCR en fait un candidat très intéressant pour une étude en transplantation.

III.2.4.2. Le polymorphisme étudié.

Un SNP dans un exon du gène *PTPN22* est tout particulièrement étudié et a fait l'objet de nombreuses publications. Il s'agit d'une substitution de C en T en position +1858 de l'ARN_m (rs2476601), ce changement de base étant non synonymique car il entraîne le remplacement d'une arginine par un tryptophane au niveau de l'acide aminé 620 (Bottini *et al.*, 2004). Cette substitution, appelée polymorphisme R620W, touche le site de fixation à CsK et empêche par là-même la formation du complexe Csk/Lyp (Bottini *et al.*, 2004), ce qui laisserait penser que l'allèle variant T entraînerait une inhibition de l'activité de Lyp. Cependant, il a été démontré que ce SNP était en fait associé à un gain de fonction de la protéine. En effet, une étude a rapporté que les LT des porteurs de l'allèle T produisaient moins d'IL-2 suite à une stimulation du TCR, l'enzyme Lyp produite ayant une activité catalytique plus élevée et étant un meilleure régulateur négatif de l'activation des LT (Vang *et al.*, 2005). Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés par une autre étude, qui a en plus observé le même effet sur les LB

(Rieck *et al.*, 2007). Ce SNP a également un fort impact clinique. En effet, l'allèle T a été associé à un bon nombre de maladie auto-immunes telles que le diabète de type 1 (Bottini *et al.*, 2004; Santiago *et al.*, 2007), la polyarthrite rhumatoïde (Begovich *et al.*, 2004; Michou *et al.*, 2007; Orozco *et al.*, 2005), le lupus (Kyogoku *et al.*, 2004; Orozco *et al.*, 2005), et les désordres rénaux dus au lupus indépendamment du polymorphisme PD-1.3 (Reddy *et al.*, 2005). De plus, il semble que l'allèle T soit un facteur protecteur contre le développement de la tuberculose (Gomez *et al.*, 2005) et que des patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse soient protégés contre les infections bactériennes sévères lorsque leur donneur est porteur de l'allèle T (Azarian *et al.*, 2008). Ces études semblent aller à l'encontre du gain de fonction de Lyp entraîné par l'allèle T et donc d'une réponse immunitaire potentiellement diminuée, mais une hypothèse possible pour les maladies auto-immunes serait une atteinte au niveau des LT régulateurs et de la sélection négative dans le thymus qui entraînerait donc une augmentation des LT auto-réactifs circulants (Rieck *et al.*, 2007; Vang *et al.*, 2005). Par ailleurs, il apparaît que la fréquence de l'allèle variant T n'est pas la même suivant les populations européenne. Elle diminue en effet en allant du Nord vers le Sud, allant par exemple d'environ 12,5% à 6% chez des individus sains (Bottini *et al.*, 2006). La fréquence de l'allèle T dans notre pays chez des individus sains est d'environ 11% (Michou *et al.*, 2007).

L'association avec des événements en greffe de moelle osseuse ainsi qu'avec des lésions rénales justifie fortement l'étude du polymorphisme R620W de Lyp en transplantation rénale. Cependant aucun travail n'a été jusqu'à maintenant rapporté concernant de ce SNP sur les événements cliniques suivant une transplantation rénale.

III.2.5. T-cell Immunoglobulin Mucin-1 et -3 (TIM-1 et -3).

Les protéines récemment décrites de la famille des TIM sont exprimées sur les lymphocytes T et jouent un rôle dans l'activation des différentes sous-populations Th1 et Th2 (Kuchroo *et al.*, 2003).

III.2.5.1. TIM-1.

Description et fonction.

Cette protéine membranaire a été initialement identifiée comme un récepteur du virus de l'hépatite A (HAVCR-1, pour « Hepatite A Virus Cellular Receptor-1 ») puis comme KIM-1 (pour « Kidney Injury Molecule-1), pour finalement prendre le nom de TIM-1 (Kuchroo *et al.*, 2003). Elle est exprimée à la surface des LT $CD4^+$ activés, mais ne persiste qu'à la surface des lymphocytes stimulés dans des conditions polarisantes Th2 (Kuchroo *et al.*, 2003). Son action sur la réponse immune lorsqu'elle est engagée par son ligand TIM-4, exprimée sur les cellules dendritiques notamment, a récemment été rapportée. En effet, lors d'une activation via le TCR, un anticorps monoclonal agoniste anti-TIM-1 induit chez la souris une prolifération lymphocytaire et une production forte d'IL-4 par les LT Th2 (Umetsu *et al.*, 2005), la prolifération lymphocytaire étant retrouvée avec une protéine de fusion TIM-4/Ig (Meyers *et al.*, 2005). De plus, avec l'anticorps agoniste anti-TIM-1, les mêmes effets ont été observés *in vivo* chez la souris, avec en plus une prolifération de LT $CD4^+$ produisant de l'IL-17, une déprogrammation des LT régulateurs et, lors d'une greffe allogénique d'îlots de Langherans, une suppression de la tolérance du greffon (Degauque *et al.*, 2008). Enfin, l'administration d'un anticorps monoclonal antagoniste de TIM-1 est capable de prolonger la survie de greffons cardiaques et d'entrainer une diminution de la réponse Th1 (Ueno *et al.*, 2008). Notons par ailleurs que le rôle de régulateur de la réponse immunitaire de TIM-1 a également été montré dans divers modèles auto-immuns et d'asthme (Kuchroo *et al.*, 2003) et qu'il a tout récemment été rapporté que l'effet de TIM-1 sur la prolifération des LT et sur leur fonction peut être positif ou négatif suivant l'affinité avec laquelle il est engagé (Xiao *et al.*, 2007).

Il semble donc que TIM-1 joue un rôle important dans la régulation de la réponse immune allogénique : des modifications dans son niveau d'expression ou sa fonction pourraient influer sur le devenir du greffon après transplantation, et plus particulièrement en transplantation rénale. En effet, TIM-1 est fortement exprimée sur les cellules épithéliales rénales après ischémie et se retrouve dans l'urine de patients présentant une nécrose tubulaire aigue (Kuchroo *et al.*, 2003), ce qui en fait ainsi un potentiel biomarqueur de telles lésions (d'où son ancien nom de KIM-1).

Le polymorphisme étudié.

Parmi les polymorphismes identifiés du gène *TIM1*, nous avons sélectionné une insertion/délétion de 15 à 18 pb (5383-5397del/ins) dans l'exon 4 (Chae *et al.*, 2003), affectant l'allongement du domaine mucine et que nous nommerons par la suite TIM1_5. La répartition des génotypes de TIM1_5 est plutôt originale, vu que les pourcentages d'homozygotes pour la délétion (del/del) et d'hétérozygotes (del/ins) sont assez proches chez des contrôles sains : 41% et 44% respectivement, avec 15% d'homozygotes pour l'insertion chez des caucasiens américains, donnant une fréquence de l'allèle ins de 37% environ (Graves *et al.*, 2005). On peut noter par ailleurs que cette répartition des génotypes est différente et moins originale dans une population saine asiatique : 67% de del/del, 31% de del/ins et 2% de ins/ins, donnant ainsi une fréquence de l'allèle ins de 17,5% environ (Chae *et al.*, 2004d). Aucune étude fonctionnelle de TIM1_5 chez l'homme ne semble à ce jour avoir été réalisée, mais diverses études suggèrent que ce polymorphisme a un impact clinique, notamment dans des maladies auto-immunes et allergiques. Ainsi, l'insertion est un facteur de risque d'atopie et d'eczéma (Graves *et al.*, 2005), ainsi que de polyarthrite rhumatoïde (Chae *et al.*, 2004d), ce qui suggère que l'insertion pourrait augmenter l'expression et/ou la fonction de TIM-1. Cependant, malgré un impact de ce SNP sur la réponse immunitaire et l'association de TIM-1 avec des lésions rénales, son effet sur les événements cliniques survenant après transplantation rénale n'a jusqu'à maintenant jamais été rapporté.

III.2.5.2. TIM-3.

Description et fonction.

Cette protéine membranaire, initialement identifiée comme un autre récepteur du virus de l'hépatite A (HAVCR-2) est exprimée assez tardivement à la surface des LT activés $CD4^+$ Th1 et des $CD8^+$ cytotoxiques (Kuchroo *et al.*, 2003). On peut noter qu'il existe une forme soluble de TIM-3, sans domaine mucine, mais dont le rôle est inconnu actuellement. L'engagement de TIM-3 par son ligand, la galectine-9 entraîne la phosphorylation d'une des tyrosines de sa région intracytoplasmique, ce qui déclenche une cascade enzymatique aboutissant à l'apoptose du LT (van de Weyer *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2005). L'importance de Tim-3 a également été démontrée *in vivo* dans des modèles expérimentaux chez la souris. Ainsi, l'utilisation d'anticorps pour bloquer l'interaction TIM-3/galectine-9 augmente l'intensité de la réponse Th1 auto- et allo-immunitaire, ainsi que supprime la tolérance

immunologique (Monney *et al.*, 2002; Sabatos *et al.*, 2003; Sanchez-Fueyo *et al.*, 2003). Ces résultats traduisent l'importance de cette interaction dans la régulation de la réponse Th1 effectrice et la génération de LT régulateurs. En pathologie humaine, la dérégulation de TIM-3 a été impliquée dans la sclérose en plaques, où il a été montré que son expression membranaire était diminuée sur les LT du liquide céphalo-rachidien par rapport à des sujets sains (Koguchi *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008). Par ailleurs, en transplantation rénale, la quantité d'ARN_m de TIM-3 est augmentée en cas de rejet aigu cellulaire dans les urines (Renesto *et al.*, 2007) et dans les biopsies rénales (Ponciano *et al.*, 2007), ce qui justifie grandement le choix de cette molécule dans notre étude.

Plus récemment Tim-3 a été mis en évidence à la surface de certaines cellules dendritiques murines et humaines, pour lesquelles la liaison à la galectine-9 induirait une sécrétion de TNF-α en synergie avec l'engagement du TLR-4, c'est-à-dire un signal pro-inflammatoire à l'opposé de celui induit sur les LT par l'engagement de TIM-3 (Anderson *et al.*, 2007).

Le polymorphisme étudié.

Parmi les nombreux polymorphismes identifiés dans *TIM3*, nous avons sélectionné un SNP dans l'exon 3 du gène (rs1036199), que nous nommerons par la suite TIM3_2. Cette substitution de T en G en position +4259 sur l'ARN_m supprime un site de restriction pour l'enzyme *Pst*I, et n'est pas synonymique car elle entraîne le remplacement d'une leucine par une arginine dans le domaine mucine (Chae *et al.*, 2004c). La fréquence de l'allèle variant G est d'environ 10-15%, avec des variations suivant l'origine ethnique (Chae *et al.*, 2004a; Graves *et al.*, 2005). Aucune étude sur l'impact fonctionnel de TIM3_2 n'a été menée à ce jour mais, du point de vue clinique, des études ont montré que l'allèle variant G était un facteur de risque de divers maladies allergiques ou auto-immunes telles que la rhinite allergique (Chae *et al.*, 2004a), la polyarthrite rhumatoïde (Chae *et al.*, 2004b), l'atopie (Graves *et al.*, 2005), ainsi que potentiellement l'eczéma (Graves *et al.*, 2005), ce qui suggère que l'allèle variant G pourrait diminuer l'expression et/ou la fonction de TIM-3. Cependant, malgré un impact de ce SNP sur la réponse immunitaire et l'implication de TIM-3 en transplantation rénale, son effet sur les événements cliniques survenant après transplantation rénale n'a jusqu'à maintenant jamais été rapporté.

IV. Objectifs de ce travail.

Le premier objectif a été de constitué une banque d'ADN des patients transplantés rénaux au CHRU de Tours entre 1985 et 2008.

Le second a été d'étudier, dans cette étude rétrospective concernant ces patients, l'association entre les 6 polymorphismes précédemment cités et la survenue des événements cliniques post-transplantation suivants : retard de reprise de fonction du greffon, rejet aigu, perte du greffon, décès du patient, infection à CMV et cancer de la peau.

Après avoir traité de la constitution de notre banque d'ADN et des méthodes de génotypage utilisées, ce mémoire présentera donc les résultats de notre travail, qui seront divisés en 2 grands axes. Nous traiterons tout d'abord des résultats publiés, soumis ou en passe de l'être : ils concernent les SNP dans les gènes codant l'IL-12p40 et PD-1. Nous exposerons ensuite des résultats préliminaires, obtenus pour AIF-1 et Lyp, ainsi que pour TIM-1 et -3.

Banque d'ADN

Nous avons constitué une banque d'ADN des patients transplantés rénaux au CHRU de Tours entre 1985 et 2008, à partir d'échantillons sanguins des patients vus en consultation dans le service de Néphrologie (après signature d'un consentement éclairé) ou à partir d'échantillons d'ADN obtenus auprès de l'Etablissement Français du Sang Centre-Atlantique. Dans le premier cas, l'ADN a été extrait du prélèvement sanguin en utilisant le QIAmp Blood Midi Kit (Qiagen), selon les instructions du fournisseur.

Sur les 1281 patients transplantés rénaux entre 1985 et 2008 au CHRU de Tours, 1157 sont représentés dans notre banque d'ADN, soit 90%, ce qui montre l'exhaustivité de cette dernière. Par ailleurs, au sein de chaque année de transplantation, nous avons une exhaustivité supérieure à 70% (mise à part une exception), et plus de la moitié des années en présentent une supérieure ou égale à 90% (Figure 5).

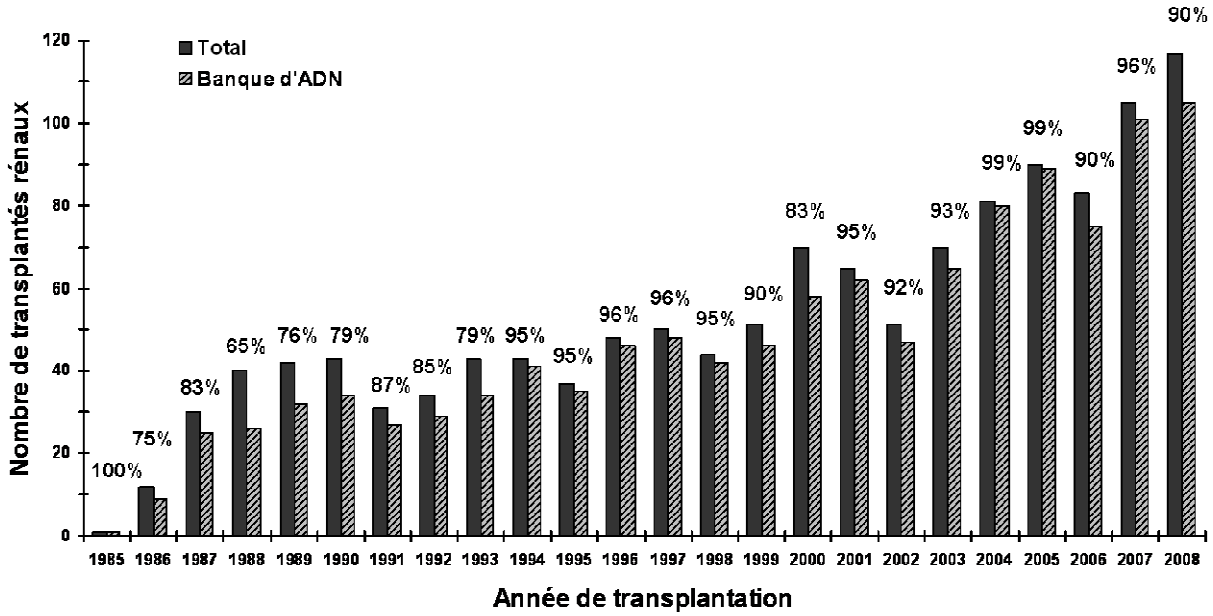


Figure 5. Exhaustivité de la banque d'ADN.
Nous avons représenté, en fonction de l'année de transplantation (1985 à 2008), le nombre total de transplantés rénaux au CHRU de Tours (histogrammes foncés) ainsi que le nombre de patients parmi eux qui sont représentés dans notre banque d'ADN (histogrammes rayés). Le pourcentage d'exhaustivité de notre banque pour chaque année est également indiqué.

Notre banque d'ADN est également représentative de l'ensemble des transplantés rénaux en terme de pertes de greffon. En effet, au 31 décembre 2008, on observe 28% de pertes de greffon (retour en dialyse ou mort du patient, 361 sur 1281 patients) chez l'ensemble des patients transplantés rénaux entre 1985 et 2008 contre 26% (300 sur 1157) chez les patients

parmi ces derniers qui sont représentés dans notre banque d'ADN (p = 0,212, test du Chi 2). Par ailleurs, on peut remarquer que ce pourcentage reste assez similaire entre les 2 groupes de patients au sein de chaque année de transplantation (Figure 6).

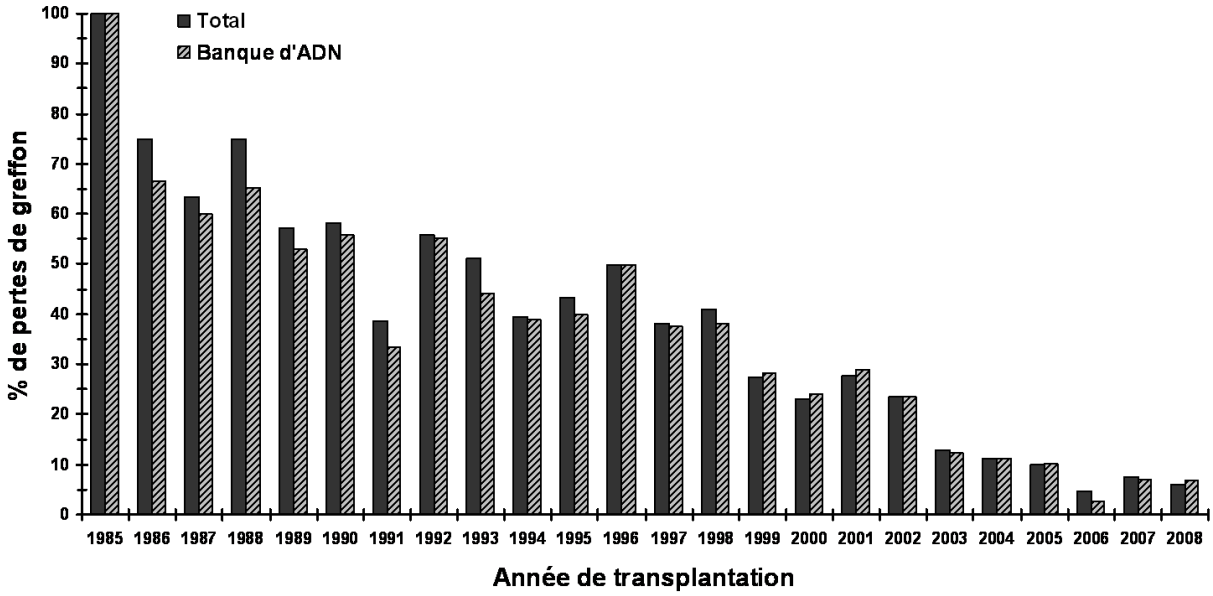


Figure 6. Représentativité de la banque d'ADN.
Nous avons représenté, en fonction de l'année de transplantation (1985 à 2008) et au 31 décembre 2008, le pourcentage de pertes de greffon (retour en dialyse ou mort du patient) chez l'ensemble des transplantés rénaux au CHRU de Tours (histogrammes foncés) et chez les patients parmi ces derniers qui sont représentés dans notre banque d'ADN (histogrammes rayés).

L'étape suivante a été de déterminer les différents génotypes de chacun des polymorphismes étudiés dans une cohorte de patients formée à partir de notre banque d'ADN. Nous avons classé les patients en 2 groupes selon la présence ou l'absence de l'allèle variant (respectivement hétérozygotes/homozygotes variants et homozygotes communs) et, pour chaque polymorphisme, nous avons analysé et comparé par des tests statistiques appropriés les fréquences des différents événements cliniques cités précédemment.

Méthodes de génotypage

I. Digestion enzymatique.

Lorsqu'un polymorphisme affecte un site de restriction (création ou suppression), on peut alors utiliser pour le génotypage une technique très répandue et appelée RFLP (pour « Restriction Fragment Length Polymorphism »). Il s'agit d'amplifier par PCR (pour « Polymerization Chain Reaction ») une région contenant le polymorphisme puis de digérer le produit de PCR par l'enzyme de restriction correspondante. Une migration sur un gel d'agarose et une révélation par le BET (bromure d'éthidium) permettront de déterminer le génotype en comptant le nombre de bandes obtenues, celui-ci reflétant une coupure par l'enzyme ou l'absence de coupure.

Cette méthode a été utilisée pour les polymorphismes *IL12B* 3'UTR et PD-1.3, dont les allèles variants créent respectivement dans le gène correspondant un site de restriction pour les enzymes *Taq*I et *Pst*I. Ainsi, pour *IL12B* 3'UTR, la PCR produit un amplicon de 421 pb (paire de bases). Après digestion par *Taq*I (Figure 7), on observe sur le gel une seule bande à 421 pb si le patient testé est homozygote commun A/A (absence de coupure sur les 2 chromosomes homologues) et 2 bandes (269 et 152 pb) s'il est homozygote variant C/C (coupure sur les 2 chromosomes homologues). Un patient hétérozygote A/C présente les 3 bandes citées précédemment (coupure sur un des 2 chromosomes homologues).

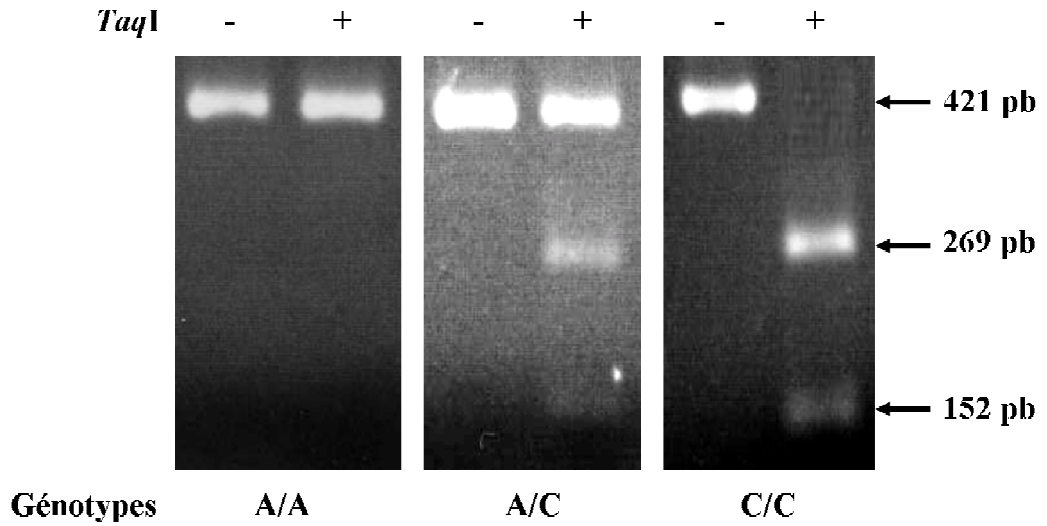


Figure 7. Détermination du génotype d'*IL12B* 3'UTR par RFLP.
Suivant le génotype du patient, *Taq*I coupe ou pas dans le produit de PCR et permets donc d'obtenir sur gel d'agarose 3 différents profils de digestion.

En ce qui concerne PD-1.3, un patient homozygote commun G/G présente sur le gel une bande à 331 pb, tandis qu'un homozygote variant A/A présente 2 bandes (276 et 55 pb) et un hétérozygote G/A les 3 bandes (Figure 8).

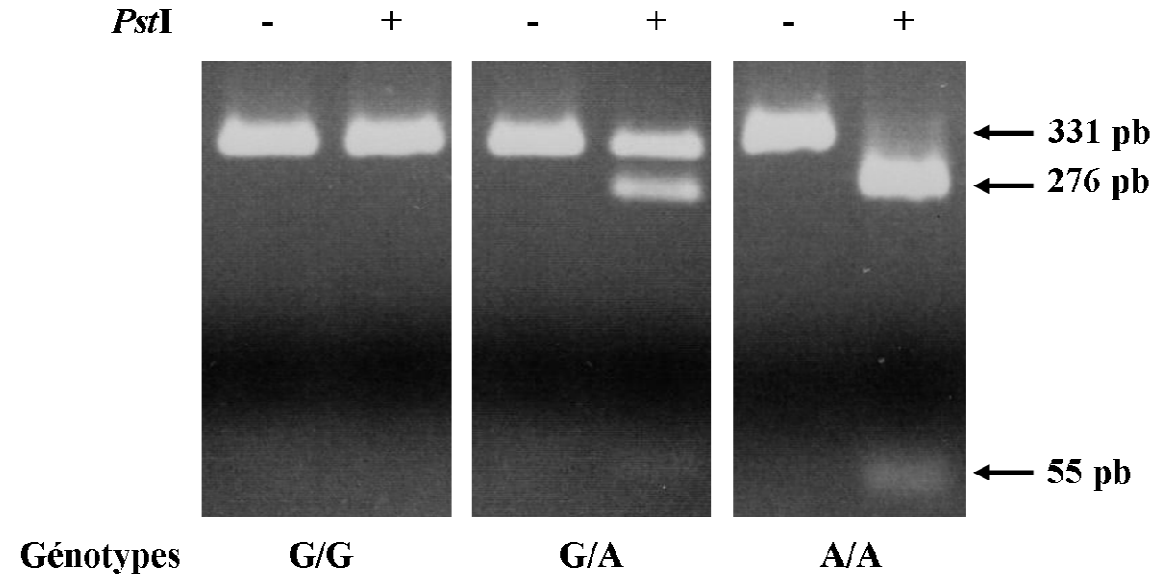


Figure 8. Détermination du génotype de PD-1.3 par RFLP.
Suivant le génotype du patient, *Pst*I coupe ou pas dans le produit de PCR et permets donc d'obtenir sur gel d'agarose 3 différents profils de digestion.

Nous avons utilisé l'amplification du gène codant la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) comme témoin interne de digestion. En effet, ce produit de PCR de 607 pb contient les 2 sites de restriction *Taq*I et *Pst*I et présente donc sur le gel 2 bandes (449 et 158 pb ou 406 et 201 pb, respectivement) en cas de complète digestion par l'enzyme concernée.

Les détails de ces protocoles sont indiqués dans les différents articles présentés dans les parties suivantes (Hoffmann *et al.*, 2009a; Hoffmann *et al.*, 2008) ainsi que dans l'annexe 2 pour la PCR.

II. Mise en place d'une nouvelle méthode de génotypage.

La RFLP est une technique couramment utilisée en routine dans les laboratoires effectuant du génotypage de polymorphismes car elle est peu coûteuse et facile à mettre en œuvre. Cependant, elle dispose d'un faible rendement et a surtout un inconvénient majeur : elle ne peut s'appliquer qu'aux polymorphismes créant ou supprimant un site de restriction. Elle ne concerne donc qu'une faible proportion de SNP, d'où l'intérêt de mettre en place une technique de routine qui puisse s'appliquer à la majorité des polymorphismes. Ce genre de techniques requiert des conditions de réaction hautement standardisées, et donc des équipements et consommables assez coûteux. Cependant, des méthodes avec un bon rapport rendement/prix sont nécessaires pour mener des études de génotypage multiple en transplantation rénale. Le séquençage est une technique qui répond très bien à ces exigences, mais peu de laboratoires d'immunologie clinique ont facilement accès à un séquenceur.

Notre but a donc été de mettre en place au laboratoire une méthode rapide de génotypage, basée sur la cytométrie en flux (tous les laboratoires d'immunologie clinique ont accès à un cytomètre en flux) et permettant d'analyser plusieurs polymorphismes simultanément chez des transplantés rénaux. Cette technique a été testée sur 3 SNP dont nous avons parlé précédemment : *IL12B* 3'UTR, PD-1.3 et TIM3_2.

Cette étude donne lieu à un manuscrit en cours de rédaction, qui rapporte pour la première fois l'application de cette technique pour le génotypage de 3 polymorphismes de gènes de l'immunité simultanément en transplantation rénale, et qui sera certainement soumis dans *Journal of Immunological Methods*.

II.1. Principe de la technique.

Nous avons appliqué une technique précédemment rapportée, qui est basée sur un test de ligation et la cytométrie en flux (Iannone *et al.*, 2000). Son principe est représenté dans la

Figure 9. Le test de ligation, ou OLA (pour « Oligonucleotide Ligation Assay »), concerne une sonde-piège et une sonde reportrice : la première contient une séquence complémentaire de l'ADN du patient, avec le dernier nucléotide testant un des 2 allèles du polymorphisme, et une autre non complémentaire appelée ZipCode et utilisée ultérieurement ; la seconde est 100% complémentaire de l'ADN du patient, s'hybride directement à la suite de la sonde-piège (juste après le nucléotide testant l'allèle du polymorphisme), et est couplée en 3' à un marqueur fluorescent (le FITC, ou fluorescéine isothiocyanate) ainsi qu'en 5' à un groupement phosphate.

Pour chaque patient, les 2 allèles du polymorphisme sont testés dans des tubes séparés avec 2 sondes-pièges différentes par leur dernier nucléotide. L'OLA repose sur le fait qu'une ligase ne liguera la sonde-piège et la sonde reportrice que si les 2 sont 100% complémentaires à leur matrice au niveau du point de jonction. La zone cruciale est donc le dernier nucléotide de la sonde-piège : il n'y aura ligation que si le patient possède l'allèle testé par cette dernière. Après la ligation, la sonde-piège, liguée ou pas à la sonde reportrice selon le génotype du patient, est alors mise en présence de billes fluorescentes (dans le rouge-orange) couplées à un oligonucléotide qui contient la séquence complémentaire au ZipCode, le cZipCode.

Enfin, après l'hybridation de la sonde-piège aux billes grâce au couple ZipCode/cZipCode, les billes sont passées au cytomètre en flux afin de déterminer le génotype du patient en fonction de la présence ou non d'une fluorescence FITC associée aux billes (respectivement ligation ou pas) dans chacun des 2 tubes de test. Un patient homozygote pour l'allèle 1 ne présentera ainsi de fluorescence FITC que dans le tube testant l'allèle 1 et il en sera de même pour un patient homozygote allèle 2 avec l'autre tube de test, alors qu'un hétérozygote présentera une fluorescence FITC dans les 2 tubes.

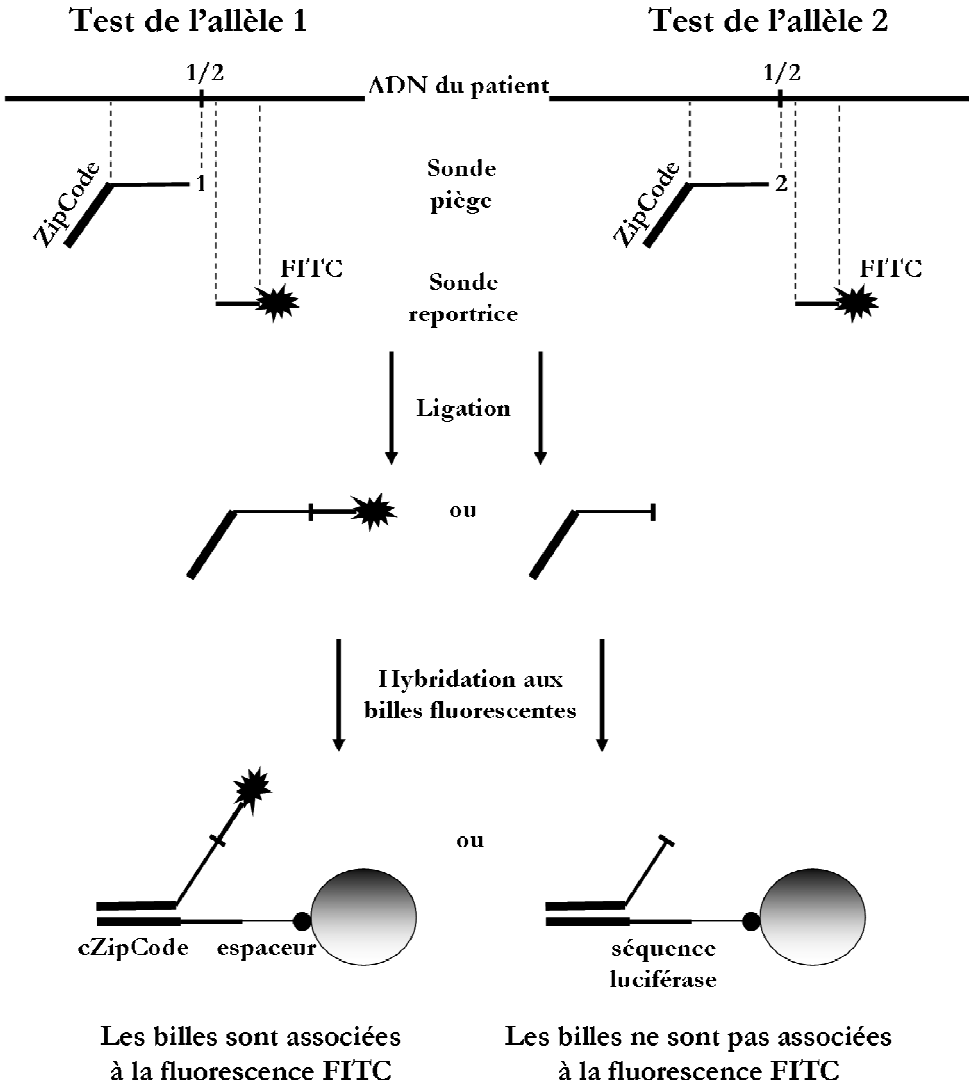


Figure 9. Principe du génotypage de polymorphismes par un test de ligation couplé à la cytométrie en flux.

Le génotypage de plusieurs polymorphismes simultanément est possible car il existe plusieurs types de billes fluorescentes (différentes par leur niveau de fluorescence rouge-orange) et car plusieurs couples ZipCode/cZipcode sont disponibles : chaque polymorphisme correspondra à un type de billes et à un couple. Nous avons utilisé en grande partie le protocole rapporté dans l'étude qui a présenté pour la première fois cette technique (Iannone *et al.*, 2000).

II.2. Matériels et méthodes.

Les séquences des sondes et amorces utilisées pour chacun des 3 SNP sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Oligonucléotides utilisés pour le génotypage par OLA d'*IL12B* 3'UTR, PD-1.3 et TIM3_2.

Oligonucléotides (5'→3')	Polymorphismes		
	IL12B 3'UTR (A/C)	PD-1.3 (G/A)	TIM3_2 (T/G)
Amorces de PCR	GGCATGAAATCCCTGAAACC	CCAGGCAGCAACCTCAATC	TGAATTCAGAGCCAGCTAAAGA
	TACATCCTGGCAGACAAACG	GTCCCCCTCTGAAATGTCC	CCTTTGATTCCCTGAAATAAGC
Sondes-pièges [a, b]	**GATGATCGACGAGACACTCTCGCCA**GTTTCAATGAGCATTTAGCATCT/G	**CGGTCGACGAGCTGCCGCGCAAGAT**GCACCCCCGGAGACC/T	**GACATTCGCGATCGCCGCCCGCTTT**CCCCTGCACCGACTCT/G
Sonde reportrice (5' phosphate et 3' FITC)	AACTATACAAATACAGCAA	GCAGGTGGGCTG	GCAGAGAGACTTCACTG
Oligonucléotide couplé aux billes [a] (5' amine)	CAGGCCAAGTAACTTCTTCG**TGGCGAGAGTGTCTCGTCGATCATC**	CAGGCCAAGTAACTTCTTCG**ATCTTGCGCGGCAGCTCGTCGACCG**	CAGGCCAAGTAACTTCTTCG**AAAGCGGGCGGCGATCGCGAATGTC**

[a] Les séquences des ZipCodes et cZipCodes sont en gras, respectivement dans les séquences des sondes-pièges et des oligonucléotides couplés aux billes. [b] Les nucléotides testant les différents allèles sont soulignés dans les séquences des sondes-pièges.

II.2.1. Couplage des billes aux oligonucléotides.

Dans 62 µL de MES à 0,1 M, nous mettons en contact 2,5 millions de billes fluorescentes carboxylées (Luminex®) avec 5 nmol d'oligonucléotides 5'-aminés, puis nous ajoutons 10 µL d'EDC à 30 mg/mL (préparé juste avant). Après une incubation d'une heure dans l'obscurité à température ambiante, pendant laquelle on a ajouté 10 µL d'EDC toutes les 20 minutes, les billes sont lavées dans 1 mL de PBS/Tween 20 0,02% puis dans 150 µL de tampon TE (centrifugations de 6 min à 1100 g), et enfin reprises dans 200 µL de tampon TE pour un stockage à 4°C dans l'obscurité. Afin de génotyper les 3 SNP en même temps, nous avons

utilisé 3 types différents de billes (Luminex® 43, 24 et 77) ainsi que 3 oligonucléotides, ce protocole devant être effectué séparément pour chacun des couples.

L'oligonucléotide couplé dispose, en plus de la séquence cZipCode, d'une séquence luciférase qui permet de contrôler l'efficacité du couplage en utilisant une sonde complémentaire marquée au FITC (Iannone *et al.*, 2000).

II.2.2. Génotypage.

Pour chaque patient, des régions contenant chacun des 3 SNP sont d'abord amplifiées par PCR dans le même tube (voir Annexe 2). Puis, dans le test de ligation, les 2 allèles de chaque polymorphisme sont testés pour chaque patient dans 2 tubes séparés avec les 2 sondes-pièges différentes : un tube pour les 3 allèles communs ensemble (A pour *IL12B* 3'UTR, G pour PD-1.3 et T pour TIM3_2) et un autre pour les 3 allèles variants ensemble (respectivement C, A et G). Nous mélangeons ainsi 1,5 µL de produit de PCR, 0,1 pmol de sonde-piège, 5 pmol de sonde reportrice (5' phosphate et 3' FITC), 5 unités de ligase thermostable et son tampon 1X avec de l'eau ultra pure jusqu'à 10 µL. Le test de ligation s'effectue dans un thermocycleur selon le programme qui suit : 2 min à 96°C, puis 30 cycles de 15 s à 94°C et 1 min à 45°C. Chaque produit de ligation est mis en contact avec 12500 de chacun des 3 types de billes couplées et incubé pendant 2 min à 96°C puis 2h30 à 45°C pour l'hybridation, cette étape utilisant 3 couples ZipCode/cZipCode différents (Tableau 1). Enfin, nous observons l'association de la fluorescence des billes avec celle des sondes reportrices sur un cytomètre en flux. L'exactitude de cette technique de génotypage a été vérifiée avec la méthode RFLP.

II.3. Exemples de résultats obtenus.

Un exemple de résultat obtenu pour un patient est donné dans la Figure 10.

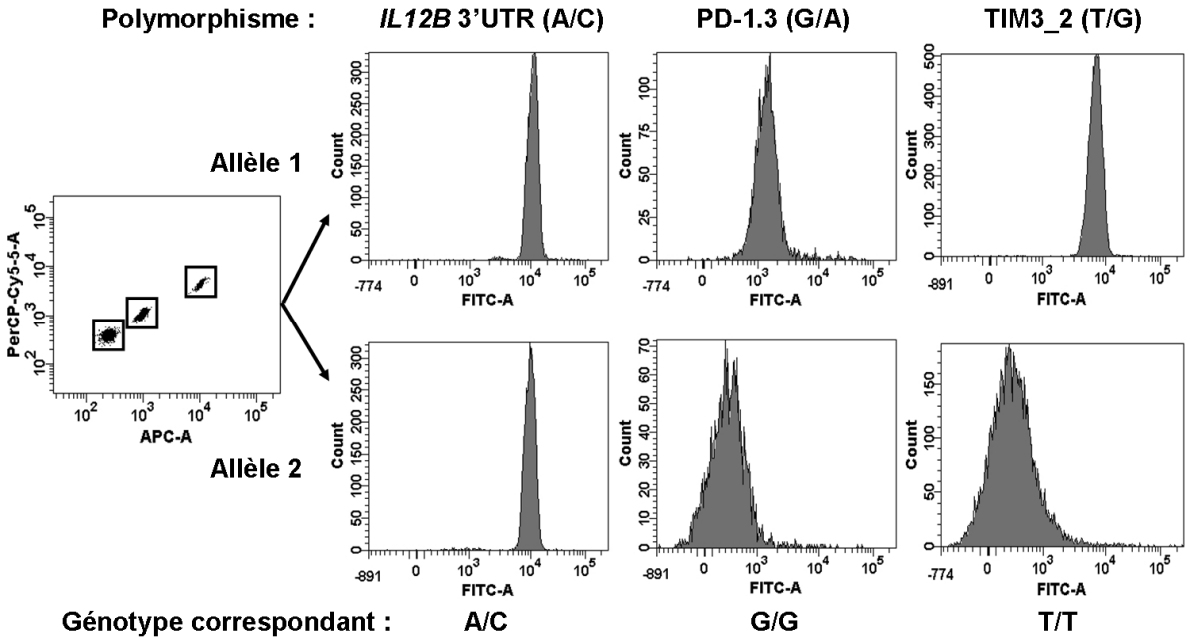


Figure 10. Exemple de résultat obtenu en génotypant un patient par OLA après le passage en cytométrie en flux.
Dans le graphe tout à gauche, les billes apparaissent selon leur fluorescence rouge-orange. Chaque type de billes étant associé à un SNP, nous fenêtrons sur chacun pour observer la présence ou non d'une fluorescence FITC associée dans les 2 tubes testant les 2 allèles du SNP. Suivant la position des pics et leur intensité moyenne de fluorescence, nous pouvons déterminer les génotypes.

Afin de tester cette technique, nous avons effectué le génotypage des 3 SNP chez 25 patients choisis au hasard parmi les patients transplantés rénaux au CHRU de Tours entre 1985 et 2005, puis nous avons cherché à identifier leurs différents génotypes. Pour chaque génotype de chacun des SNP, nous avons relevé les intensités moyennes de fluorescence (IMF) du FITC observées dans les 2 tubes et nous avons étudié pour chaque SNP les IMF de l'allèle commun en fonction de celles de l'allèle variant. Nous pouvons ainsi voir sur un graphe reprenant ces données qu'il est possible de déterminer visuellement et avec certitude le génotype des SNP pour tous nos patients. Ces derniers se positionnent en effet à différents quadrants des graphes suivant leurs IMF, et donc suivant leur génotype : en bas à droite pour les homozygotes communs, en haut à droite pour les hétérozygotes et en haut à gauche pour les homozygotes variants (Figure 11).

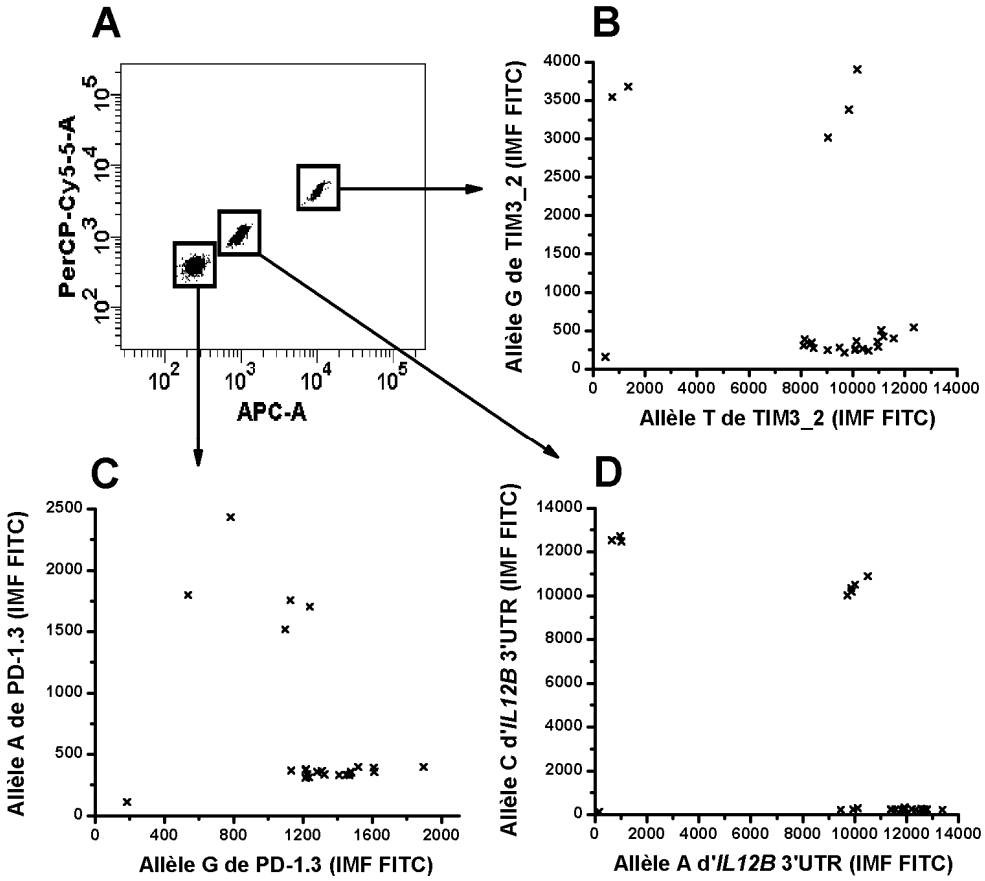


Figure 11. Détermination visuelle du génotype de 3 SNP génotypés simultanément chez 25 transplantés rénaux.
Les 3 SNP (*IL12B* 3'UTR, PD-1.3 et TIM3_2) ont été génotypés simultanément par OLA avec 3 types de billes et 3 couples ZipCode/cZipCodes différents. **A :** exemple représentatif de la discrimination des 3 types de billes en fonction de leur niveau de fluorescence rouge-orange. Chaque type est spécifique d'un SNP et est fenêtrée pour observer la fluorescence du FITC associée. **B à D :** graphes montrant, pour TIM3_2, PD-1.3 et *IL12B* 3'UTR respectivement, l'intensité moyenne de fluorescence du FITC dans le tube testant l'allèle commun en fonction de celle du tube testant l'allèle variant chez les 25 patients. La croix dans le coin en bas à gauche représente le témoin négatif de PCR (sans ADN).

Par ailleurs, en étudiant plus spécifiquement les IMF et en calculant les rapports IMF allèle commun/IMF allèle variant pour chaque génotype, nous pouvons voir que les 3 génotypes de chaque SNP ont des rapports significativement différents entre eux ($p < 0{,}001$ pour *IL12B* 3'UTR et $p = 0{,}003$ pour PD-1.3 ainsi que pour TIM3_2 ; Tableau 2).

Tableau 2. Intensités moyennes de fluorescence obtenues après le génotypage par OLA de 3 SNP chez 25 transplantés rénaux.

Génotype	IMF du FITC [a]					
	IL12B 3'UTR (rapport A/C)		PD-1.3 (rapport G/A)		TIM3_2 (rapport T/G)	
	A	C	G	A	T	G
Homozygotes pour l'allèle commun	11765 ± 1060	250 ± 26	1388 ± 187	354 ± 26	9956 ± 1230	326 ± 89
	(47 ± 6)		(3,9 ± 0,5)		(32 ± 8)	
Hétérozygotes	9993 ± 300	10392 ± 331	1155 ± 75	1660 ± 125	9686 ± 585	3436 ± 446
	(0,96 ± 0,01)		(0,70 ± 0,05)		(2,8 ± 0,2)	
Homozygotes pour l'allèle variant	885 ± 196	12581 ± 132	659 ± 173	2117 ± 449	1045 ± 432	3617 ± 95
	(0,07 ± 0,02)		(0,31 ± 0,02)		(0,3 ± 0,1)	
p [b]	< 0,001		0,003		0,003	

[a] Les intensités moyennes de fluorescence (IMF) du FITC sont présentées sous la forme de moyennes ± écarts-types pour chaque allèle, avec le rapport allèle commun/allèle variant entre parenthèses. [b] Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour chaque polymorphisme afin de tester la différence entre les rapports correspondants aux 3 génotypes.

Cette technique nous permet donc de discriminer visuellement et statistiquement les différents génotypes de 3 polymorphismes génotypés simultanément. C'est la première fois qu'elle est appliquée à des polymorphismes de gènes de l'immunité chez des transplantés rénaux. Elle comprend des manipulations de biologie moléculaire faciles à mettre en œuvre (PCR, ligation, hybridation) et s'accompagne de la sensibilité du cytomètre en flux, un appareil qui de plus est accessible pour tout laboratoire d'immunologie clinique. Cette technique prend de 5 à 7 h de travail, pour le génotypage de jusqu'à 96 patients avec un lecteur de plaques et pour un coût d'environ 1,5 dollars par patients quand on génotype 10 SNP en même temps (Lee *et al.*, 2004). Par ailleurs, le rendement de cette technique peut être assez important car il existe 100 types de billes différentes fournies par Luminex®, et de plus une soixantaine de couples ZipCode/cZipCode n'interagissant pas entre eux ont été déjà définis (Iannone *et al.*, 2000). Globalement, on pourrait ainsi, sur une série de manipulations, génotyper plus de 50 polymorphismes simultanément chez 96 patients. Cela est bien sûr loin du rendement pouvant être atteint par les techniques de micropuces, mais le coût est moindre et il n'est pas nécessaire d'avoir accès à une plateforme de puces à ADN.

Ce sera la première fois que cette méthode est utilisée pour des études d'association entre polymorphismes et événements cliniques.

AXE 1 : 3 articles publiés, 1 article soumis et des résultats en cours de rédaction pour soumission.

Suivant les événements cliniques, différentes populations de patients ont été étudiées, mais chacune concernait à la fois les polymorphismes *IL12B* 3'UTR et PD-1.3. Après le génotypage des patients, nous avons testé l'association des 2 polymorphismes sur plusieurs événements cliniques survenant après la transplantation. Les résultats obtenus ont donné lieu à 5 manuscrits.

Trois ont été publiés dans des revues internationales :

TW Hoffmann, JM Halimi, M Büchler, F Velge-Roussel, A Goudeau, A Al Najjar, JF Marliere, Y Lebranchu and C Baron. Association between a polymorphism in the human programmed death-1 (PD-1) gene and CMV infection after kidney transplantation. *Journal of Medical Genetics*, publié le 5 juillet 2009, 10.1136/jmg.2009.068841.

TW Hoffmann, JM Halimi, M Büchler, F Velge-Roussel, A Al Najjar, JF Marliere, Y Lebranchu and C Baron. Impact of a polymorphism in the IL-12p40 gene on the outcome of kidney transplantation. *Transplantation Proceedings* 2009; 41 (2) : 654-656.

TW Hoffmann, JM Halimi, M Büchler, F Velge-Roussel, A Goudeau, A Al Najjar, MD Boulanger, T Sqalli Houssaini, JF Marliere, Y Lebranchu and C Baron. Association between a polymorphism in the IL-12p40 gene and cytomegalovirus reactivation after kidney transplantation. *Transplantation* 2008; 85 (10) : 1406-1411.

Un autre a été soumis dans une revue internationale, *Clinical Transplantation* :

TW Hoffmann, JM Halimi, M Büchler, F Velge-Roussel, A Al Najjar, JF Marliere, Y Lebranchu and C Baron. No association between IL-12 and PD-1 gene polymorphisms and graft rejection, skin cancer or delayed graft function after kidney transplantation in a large cohort of patients.

Enfin, un dernier est en cours rédaction :

TW Hoffmann, JM Halimi, M Büchler, F Velge-Roussel, A Al Najjar, JF Marliere, Y Lebranchu and C Baron. The association between a polymorphism in the human PD-1 gene and kidney graft survival depends on CMV serological status before graft.

I. Le SNP *IL12B* 3'UTR est associé à l'infection à CMV après transplantation rénale.

Une première étude préliminaire a été menée sur *IL12B* 3'UTR et l'infection à CMV. Elle concernait 253 patients transplantés rénaux au CHRU de Tours entre 1995 et 2003 et a été rapportée dans *Transplantation Proceedings* (Hoffmann *et al.*, 2009b).

L'étude principale a été rapportée dans *Transplantation* (Hoffmann *et al.*, 2008) et montre l'association entre *IL12B* 3'UTR et l'infection à CMV sur une population plus large de 469 patients transplantés entre 1995 et 2005, génotypés par la méthode RFLP (voir partie précédente). L'année 1995 correspond dans notre centre au début de l'utilisation de l'antigénémie pp65 pour tester l'infection à CMV chez les patients.

Tous les détails cliniques concernant les patients, l'antigénémie CMV et les tests statistiques sont indiqués dans les articles afférents.

Des résultats supplémentaires, qui ne sont pas publiés dans les articles, sont aussi présentés. Pour ces résultats, les données continues ont été statistiquement comparées par le test de Mann-Whitney et les non-continues par le test du Chi2.

Malheureusement, à cause du faible nombre d'événements, nous n'avons pas pu tester correctement dans ces études l'incidence de la maladie à CMV en fonctions des génotypes. En effet, seulement 14 patients dans notre cohorte ont présenté une antigénémie associée à des symptômes digestifs et/ou pulmonaires. Ce faible effectif est possiblement du au traitement préemptif systématique utilisé en cas d'antigénémie positive.

I.1. Résumé des articles publiés et résultats complémentaires.

I.1.1. L'allèle C est un facteur de risque de réactivation du CMV.

Tout d'abord, sur une cohorte préliminaire de 253 transplantés rénaux, nous avons comparé la survenue de l'infection à CMV entre les porteurs de l'allèle *IL12B* 3'UTR C (hétérozygotes A/C et homozygotes C/C) et les patients ne l'ayant pas (homozygotes A/A). Après avoir vérifié que les caractéristiques cliniques de base n'étaient pas différentes entre ces 2 groupes, nous avons mis en évidence que l'allèle C était un facteur de risque significatif d'infection à CMV, le risque étant multiplié par près de 2 chez les porteurs de cet allèle (odds ratio, ou OR, = 1,77, p = 0,027). Par ailleurs, nous avons également testé sur cette cohorte l'influence de ce SNP sur la survie du greffon, le rejet aigu dans la première année post-transplantation et le DGF, mais aucune association n'a pu être mise en évidence (p = 0,768, 0,108 et 0,498 respectivement).

Nous avons élargi ce travail à une population plus importante de patients, comprenant 469 transplantés rénaux. Dans cette population, 60% des patients sont homozygotes communs (A/A), 36% sont hétérozygotes (A/C) et 4% sont homozygotes variants (C/C), ce qui donne une fréquence de l'allèle variant C de 22% environ. Nous avons vérifié que l'équilibre de Hardy-Weinberg était respecté, et que la fréquence de l'allèle C était similaire à celles rapportées dans d'autres études chez des contrôles caucasiens sains (Mueller *et al.*, 2004), ce qui suggère que ce SNP n'est pas associé aux maladies rénales menant à la transplantation. Après avoir vérifié que les caractéristiques cliniques de base n'étaient pas différentes entre les 2 groupes génotypiques, nous avons non seulement confirmé les résultats précédemment observés pour le CMV (OR = 1,51, p = 0,031), mais nous avons en plus mené une étude statistique multivariée et mis en évidence, après ajustement sur d'autres facteurs de risque d'infection à CMV (âge du receveur, sérologie CMV du receveur positive et utilisation du MMF), que l'allèle C était un facteur de risque indépendant (OR = 1,52, p = 0,043).

De plus, puisque cette population contient des patients ayant reçu un traitement prophylactique anti-CMV (D^+/R^- surtout) et d'autres n'ayant presqu'aucune chance de présenter une telle infection (D^-/R^-), nous avons décidé d'analyser la sous-population des patients séropositifs avant la transplantation (R^+) et n'ayant pas reçu de prophylaxie (n = 222), et cela afin de tester le risque spontané de réactivation/réinfection du CMV. D'ailleurs, ce phénomène sera nommé réactivation dans la suite de ce travail, dans un souci de simplicité et

car nous n'avions pas les moyens de vérifier si une infection chez les patients D^+/R^+ était due à une réactivation du virus ou à une réinfection par les particules virales du greffon. Nous avons ainsi observé que l'allèle C restait un facteur de risque d'infection à CMV dans cette sous-population avec un OR plus élevé (OR = 1,91, p = 0,021). Par ailleurs, l'allèle C est également un facteur de risque indépendant dans cette sous-population, après ajustement sur l'âge du receveur et l'utilisation du MMF (OR = 1,88, p = 0,028).

Il s'agit de résultats sur une large cohorte de patients transplantés. Cependant une cohorte de réplication sur une population indépendante permettrait de renforcer la validité du résultat. Nous envisageons donc à terme de constituer une cohorte de validation à partir de transplantés rénaux d'autres centres et d'y vérifier l'association entre *IL12B* 3'UTR et l'infection à CMV.

I.1.2. Hypothèse sur le lien pathogénique entre *IL12B* 3'UTR et l'infection à CMV (résultats non publiés).

Il reste à s'interroger sur le lien pathogénique entre ce polymorphisme et l'infection à CMV. L'allèle C d'*IL12B* 3'UTR a été associé à une déstabilisation de l'ARN_m de p40 et à une diminution de la production de cette protéine (Hirota *et al.*, 2005; Miteva et Stanilova, 2008; Morahan *et al.*, 2001; Stanilova et Miteva, 2005), ce qui, aux vues de l'implication de p40 dans les défenses anti-CMV (Ruzek *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2004), pourrait expliquer l'augmentation du risque d'infection à CMV chez les porteurs de cet allèle : ces derniers seraient moins à même de gérer efficacement la réactivation du virus et sa réplication se ferait suffisamment pour qu'on puisse observer une antigénémie systémique positive.

Nous avons repris les dossiers cliniques des patients transplantés entre 2004 et 2005 et, sur les 61 patients ayant présenté une antigénémie positive durant cette période, nous avons répertorié ceux dont l'antigénémie CMV s'était négativée spontanément (sans traitement spécifique, n = 26) ainsi que ceux l'ayant négativée après un traitement anti-CMV (n = 35). Nous avons ensuite analysé la fréquence du génotype A/A d'*IL12B* 3'UTR chez les 26 « négativeurs » spontanée et nous l'avons comparé à celle de l'ensemble de la cohorte (n = 469) ainsi qu'à celle dans la population des 35 « négativeurs » après traitement anti-CMV spécifique. Nous pouvons voir que le génotype A/A (protégeant contre l'infection à CMV) semble surreprésenté chez les « négativeurs » spontanés par rapport à l'ensemble de la cohorte (69% contre 60%, OR = 1,52, p = 0,334 ; Tableau 3) et aux « négativeurs » après traitement anti-CMV (69% contre 54%, OR = 1,89, p = 0,237 ; Tableau 3).

Tableau 3. Négativation spontanée de l'antigénémie CMV et génotype d'*IL12B* 3'UTR.

Génotype *IL12B* 3'UTR	Cohorte totale N = 469	Négativation après traitement anti-CMV N = 35	Négativeurs spontanés N = 26	Odds ratio [a] (*p*)	Odds ratio [b] (*p*)
A/A	280 (60%)	19 (54%)	18 (69%)	1,52 (0,334)	1,89 (0,237)

IC : intervalle de confiance. La fréquence du génotype A/A d'*IL12B* 3'UTR a été comparée avec le test du Chi2 entre les négativeurs spontanés et : [a] la cohorte totale ou [b] les patients ayant négativé après un traitement anti-CMV.

Bien qu'ils n'atteignent pas le seuil de significativité, probablement à cause des faibles effectifs, ces résultats préliminaires suggèrent que le génotype A/A serait un facteur de meilleure maitrise de l'infection à CMV, ce qui est en cohérence avec notre hypothèse sur le rôle du SNP dans cette maitrise. Ces résultats nous encouragent donc à reprendre les dossiers cliniques de plus de patients afin de confirmer l'association entre ce SNP et la négativation spontanée.

De plus, nous avons analysé le délai post-transplantation avant infection à CMV en fonction d'*IL12B* 3'UTR chez les patients séropositifs avant la greffe n'ayant pas reçu de prophylaxie et présentant une antigénémie positive (n = 128). Les porteurs de l'allèle C ne semblent pas être différents des non porteurs (médianes : 33 jours contre 36, $p = 0,578$; Figure 12).

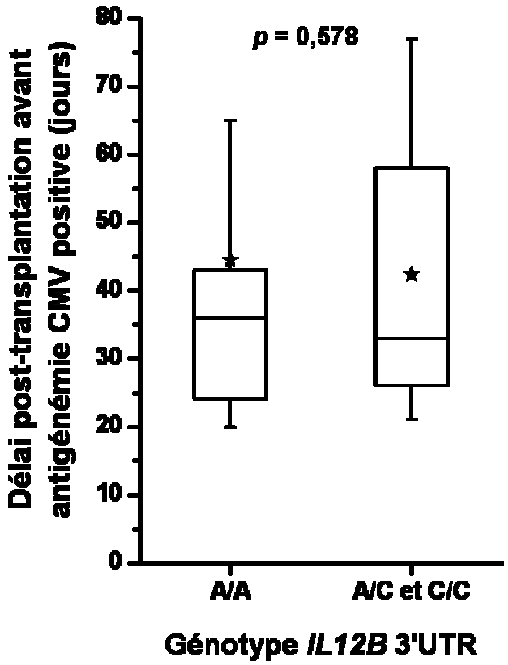


Figure 12. Influence du génotype du SNP *IL12B* 3'UTR sur le délai avant l'antigénémie CMV positive.
Dans notre cohorte de 469 patients, nous avons analysé le délai avant l'infection à CMV en fonction du génotype *IL12B* 3'UTR chez les 128 patients séropositifs avant la transplantation n'ayant pas reçu de prophylaxie anti-CMV et ayant présenté une antigénémie CMV positive. Les boîtes représentent les intervalles interquartiles, avec une ligne à l'intérieur pour la médiane, tandis que les pattes correspondent aux 10èmes et 90èmes centiles et que les étoiles représentent les moyennes. Les valeurs relevées ont été comparées entre les 2 groupes de patients (porteurs de C et non-porteurs) avec le test de Mann-Whitney.

Afin de clarifier le lien pathogénique entre *IL12B* 3'UTR et l'infection à CMV, il serait donc intéressant de mener une étude *in vitro* de l'effet du SNP sur la production des cytokines concernées par IL-12p40 (p40, IL-12p70 et IL-23) et sur la fonctionnalité lymphocytaire en réponse au CMV. La quantification de la réponse cellulaire T directement dirigée contre le CMV serait mesurée par cytométrie en flux. Brièvement, nous isolerions les PBMC de donneurs sains et de greffés rénaux séropositifs pour le CMV, dont nous aurions génotypé *IL12B* 3'UTR. Les cellules seraient incubées avec une solution d'antigènes du CMV ou avec des cellules dendritiques autologues immatures préalablement infectées par le CMV et nous quantifierions les 3 cytokines citées précédemment par ELISA (pour « Enzyme-linked immunosorbent assay ») afin de comparer les résultats entre les différents génotypes. Parallèlement, les cellules seraient marquées pour les antigènes CD4 ou CD8, puis incubées avec des anticorps anti-IFNγ afin de quantifier le nombre de cellules répondeuses

spécifiquement dirigées contre le CMV. Le niveau de réponse serait comparé en fonction du génotype. Enfin, nous étudierions également par cytométrie en flux l'impact du SNP sur l'activité cytotoxique des lymphocytes anti-CMV obtenus plus haut. Pour cela, nous mettrions en contact ces derniers avec des PBMC autologues infectées par le CMV et marquées avec une molécule fluorescente, le CFSE (pour « carboxyfluorescein succinimidyl ester »). Un anticorps anti-CD107 nous renseignerait sur la dégranulation des complexes perforine/granzyme, tandis que le marquage CFSE accompagné d'un autre marqueur fluorescent, le 7-AAD (pour « 7-aminoactinomycin D »), témoignerait de la mort des cellules cibles. Les niveaux de marquage seraient là aussi comparés entre les différents génotypes.

I.2. Articles publiés (pdf).

I.2.1. Résultats préliminaires (publiés dans *Transplantation Proceedings*).

Impact of a Polymorphism in the IL-12p40 Gene on the Outcome of Kidney Transplantation

T.W. Hoffmann, J.-M. Halimi, M. Büchler, F. Velge-Roussel, A. Al-Najjar, J.-F. Marliere, Y. Lebranchu, and C. Baron

ABSTRACT

A number of factors interfere with the outcome of renal transplantation. Revealing genetic factors that impact on graft outcome may have consequences for clinical practice. Interleukin-12 (IL-12), by stimulating interferon gamma (IFNγ) production, plays a crucial role in immune responses against both graft and viral agents. An A-to-C single nucleotide polymorphism (SNP) within the 3′-untranslated region (3′UTR) of the IL-12p40 gene has been reported to be both functionally and clinically relevant. Since the impact of this SNP on kidney graft outcome has never been reported, we investigated the impact of the 3′UTR polymorphism on clinical events after transplantation among 253 kidney recipients transplanted between 1995 and 2003. The polymorphism was genotyped using the restriction fragment length polymorphism method. Our results showed that the 3′UTR polymorphism affected neither graft survival ($P = .768$) nor the occurrence of delayed graft function (DGF; $P = .498$). C allele carriers in our study displayed more acute rejections in the first year than patients with the A/A genotype, but it did not reach statistical significance ($P = .108$). In contrast, the C allele appeared to be a significant risk factor for cytomegalovirus infection (odds ratio = 1.77; $P = .027$). In conclusion, *IL12B* 3′UTR polymorphism did not affect graft survival, DGF, or acute rejection episodes, but had an impact on the occurrence of cytomegalovirus infection.

AFTER TRANSPLANTATION, a number of donor-derived proteins are recognized as foreign antigens by the recipient immune system, resulting in acute rejection whereby grafted cells are rapidly and specifically killed by recipient immunity.[1] Immunosuppressive drugs are used to prevent this reaction, but such treatments are generally associated with increased risks for infection, neoplasia, and toxic effects. Some events such as acute rejection, ischemia-reperfusion injuries, cytomegalovirus (CMV) infection, and chronic nephropathy alter graft survival. The immune response established in the graft is complex, representing an important factor in these transplant injuries. The T-cell-mediated immune response is regulated through an intricate network of molecular signals, such as interleukin-12 (IL-12), which stimulates interferon gamma (IFNγ) production in T and natural killer (NK) cells, acting as a major actor in the balance between Th1-type and Th2-type immune responses.[2] IL-12 (IL-12p70) is composed of 2 subunits (p35 and p40) encoded by *IL12A* and *IL12B* genes located in 2 different chromosomes. A single nucleotide polymorphism (SNP) has recently been described in the 3′-untranslated region (3′UTR) of *IL12B* (rs3212227). This A-to-C substitution has been shown to reduce the stability of the p40 mRNA in transfected cell lines,[3] and to decrease the production of the IL-12p40 protein in stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC).[4] In addition, this SNP appears to be clinically relevant, since it has been found to be associated with multiple sclerosis[5] and psoriasis vulgaris.[6] However, the impact of this SNP on clinical events after organ transplantation has never been reported. Our study among a population of kidney graft recipients sought to examine whether this SNP in the IL-12p40

From the Université François Rabelais de Tours, EA4245 Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes (T.W.H., J.-M.H., M.B., F.V.-R., Y.L., C.B.), Tours, France and CHRU de Tours, Service de Néphrologie et Immunologie Clinique (J.-M.H., M.B., A.A.-N., J.-F.M., Y.L., C.B.), Tours, France.

This work was supported by a grant from the Société Francophone de Transplantation.

Address reprint requests to Dr Christophe Baron, Service de Néphrologie et Immunologie Clinique, CHRU de Tours, 37044 Tours Cedex 9, France. E-mail: baron@med.univ-tours.fr

0041-1345/09/$–see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2008.12.002

© 2009 by Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

gene had an impact on clinical events after kidney transplantation.

PATIENTS AND METHODS

Genotyping was performed on DNA samples from 253 Caucasian patients who had received a deceased-donor kidney transplantation between 1995 and 2003. Blood samples for DNA analysis from these patients were taken after obtaining signed informed consent. The patients were divided into 2 groups according to the presence versus absence of the A-to-C substitution. Most patients received induction with either antithymocyte globulin or anti-IL2R and immunosuppressive treatment based on a calcineurin inhibitor, azathioprine/mycophenolate mofetil, and steroids. CMV seronegative patients who had received an organ from a seropositive donor received CMV prophylaxis with either acyclovir, valacyclovir or gancyclovir. The 2 groups were not different concerning major baseline characteristics such as recipient age, HLA matching, graft rank, anti-HLA immunization, induction and immunosuppressive treatment, CMV prophylaxis, and CMV serological status before the graft.

Clinical data for each patient were extracted from the renal transplant database. We studied delayed graft function (DGF), acute rejection episodes in the first year, CMV infection, and graft survival. DGF was defined by dialysis in the first postoperative week; rejection episodes, by clinical diagnosis, namely, an elevation in serum creatinine levels by >20% compared with baseline, with a confirmation by biopsy according to Banff classification. CMV infection was defined as positive pp65 antigenemia (≥2 positive circulating leukocytes). Graft survival was calculated using Kaplan-Meier life-table analysis.

The SNP was genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Primers were designed to amplify a 421-bp region containing the 3′UTR polymorphism, with 5′-GGCATGAAATCCCTGAAACC-3′ as forward primer and 5′-TACATCCTGGCAGACAAACG-3′ as reverse primer. The obtained fragment was digested with 5 units of *Taq*I (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) for 1h40 at 65°C; the digestion product was loaded on a 2% agarose gel to obtain the genotype as deduced from the digestion profile. We used a 607-bp region of the *GAPDH* gene containing a *Taq*I restriction site as an internal control to assess the efficiency of the *Taq*I digestion.

Chi-square test was used to compare the occurrence of DGF, acute rejection episodes, and CMV infections between *IL12B* 3′UTR genotypes (presence or absence of the C allele), whereas log-rank test was used to compare graft survivals. $P < .05$ was considered significant.

RESULTS

Table 1 shows graft survival and the occurrence of DGF, acute rejection episodes, and CMV infections according to the presence or absence of the 3′UTR C allele. Mean graft survival was estimated to be 99 ± 4 months in C carriers and 102 ± 4 months in the A/A patients, indicating that the 3′UTR polymorphism did not affect graft survival (P = .768). Similar results were obtained concerning DGF (18% and 21%, respectively; P = .498). C allele carriers had more acute rejections in the first year than patients with the A/A genotype (35% and 26%, respectively), but it did not reach statistical significance (P = .108). In contrast, CMV infection was significantly more frequent among C carriers than the other group (50% and 36%, respectively; odds ratio [OR] = 1.77 [95% confidence interval 1.07–2.92]; P = .027).

DISCUSSION

We analyzed the relationship between the *IL12B* 3′UTR SNP and graft outcome. No significant association was revealed between this polymorphism and DGF, acute rejection in the first year, or graft survival, indicating that this polymorphism may not play a major role in these parameters. Concerning acute rejection, the P value was near significance (.108). The impact of the SNP on acute rejection might demand a larger cohort to be revealed.

Our findings revealed that the C allele of this SNP was associated with an increased risk for CMV infection after renal transplantation. Acute rejection was not a risk factor for CMV infection in our study (OR = 1.27; P = .387). In order to carry out a multivariate analysis, we plan to study a larger patient cohort.

The results of the present study addressed the question of the pathogenic link between the IL-12p40 gene polymorphism and CMV infection. This SNP has been shown to be functionally relevant since the C allele is associated with lower mRNA stability[3] and less production of the p40 polypeptide.[4] We suggest that this lower p40 expression in C carriers might explain the pathogenic link between the *IL12B* genotype and CMV replication. Indeed, direct activating roles of the p40/p40 homodimer have recently been reported, especially as an IFNγ stimulator in $CD8^+$ T cells and T-cell response initiator.[7] As both $CD8^+$ T cells and IFNγ have been shown to be major mediators of host

Table 1. Impact of *IL12B* 3′UTR Genotype on Graft Outcome in 253 Kidney Graft Recipients

Clinical Events	3′UTR Genotype		Odds Ratio (95% Confidence Interval)	*P*
	A/A (n = 141)	A/C and C/C (n = 112 [100 + 12])		
Graft survival (months)*	102 ± 4	99 ± 4	NA†	.768
Delayed graft function‡	30 (21%)	20 (18%)	0.80 (0.43–1.50)	.498
Acute rejection in the first year‡	36 (26%)	39 (35%)	1.56 (0.91–2.67)	.108
Positive CMV pp65 antigenemia‡	51 (36%)	56 (50%)	1.77 (1.07–2.92)	.027

*Graft survivals were expressed as mean values ± standard deviations by Kaplan-Meier life-table analysis and compared between 3′UTR genotypes by log-rank test.
†Not applicable.
‡The occurrence of delayed graft function, acute rejection episodes, and CMV infections was compared between 3′UTR genotypes by chi-square test.

defenses against CMV,[8,9] these experimental findings suggest that the level of p40 expression may play an important role during CMV infection. Finally, since the strategy to manage the risk for CMV infection in seropositive recipients remains a matter of debate, the description of a genetic risk factor might improve this management. Our results suggest that 3′UTR C allele carriers might greatly benefit from CMV prophylaxis.

REFERENCES

1. Benichou G: Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. Front Biosci 4:D476, 1999

2. Trinchieri G: Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat Rev Immunol 3:133, 2003

3. Morahan G, Huang D, Ymer SI, et al: Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory *IL12B* allele. Nat Genet 27:218, 2001

4. Stanilova S, Miteva L: Taq-I polymorphism in 3′UTR of the IL-12B and association with IL-12p40 production from human PBMC. Genes Immun 6:364, 2005

5. van Veen T, Crusius JB, Schrijver HM, et al: Interleukin-12p40 genotype plays a role in the susceptibility to multiple sclerosis. Ann Neurol 50:275, 2001

6. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, et al: A large-scale genetic association study confirms *IL12B* and leads to the identification of *IL23R* as psoriasis-risk genes. Am J Hum Genet 80:273, 2007

7. Cooper AM, Khader SA: IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. Trends Immunol 28:33, 2007

8. Presti RM, Pollock JL, Dal Canto AJ, et al: Interferon gamma regulates acute and latent murine cytomegalovirus infection and chronic disease of the great vessels. J Exp Med 188:577, 1998

9. Reddehase MJ, Mutter W, Munch K, et al: CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. J Virol 61:3102, 1987

I.2.2. Résultats principaux (publiés dans *Transplantation*).

CLINICAL TRANSPLANTATION

Association Between a Polymorphism in the IL-12p40 Gene and Cytomegalovirus Reactivation After Kidney Transplantation

Thomas W. Hoffmann,[1,2] Jean-Michel Halimi,[1,3] Mathias Büchler,[1,3] Florence Velge-Roussel,[1,2,4] Alain Goudeau,[5,6] Azmi Al Najjar,[3] Marie-Denise Boulanger,[7] Tarik Sqalli Houssaini,[8] Jean-Frédéric Marliere,[3] Yvon Lebranchu,[1,2,3] and Christophe Baron[1,2,3,9]

Background. Cytomegalovirus (CMV) infection is associated with a significant rate of morbidity after organ transplantation. The genetic factors influencing its occurrence have been little investigated. IL-12 plays a crucial role in anti-infectious immune responses, especially by stimulating IFNγ production. An A-to-C single nucleotide polymorphism (SNP) within the 3′-untranslated region of the IL-12p40 gene has been characterized and was reported to be both functionally and clinically relevant. However, the impact of this single nucleotide polymorphism on events after organ transplantation has never been reported.
Methods. In this study, we investigated the impact of the 3′-untranslated region polymorphism on the occurrence of CMV infection in 469 kidney recipients transplanted at the University Hospital of Tours between 1995 and 2005. The polymorphism was genotyped using the restriction fragment length polymorphism method and CMV infection was determined by pp65 antigenemia.
Results. Multifactorial Cox regression analysis demonstrated that the presence of the C allele was an independent risk factor for CMV infection (OR=1.52, P=0.043), the risk being even higher when study was restricted to patients with positive CMV serological status before the graft and who did not receive any CMV prophylaxis (OR=1.88, P=0.028).
Conclusions. This study identified a new genetic risk factor for CMV reactivation after kidney transplantation. The results of our study suggest that C carriers might especially benefit from CMV prophylaxis.

Keywords: IL-12p40, Genetic polymorphism, Cytomegalovirus infection, Kidney transplantation.

(*Transplantation* 2008;85: 1406–1411)

CMV infectionremains one of the most frequent infectious diseases after organ transplantation (*1*). This herpes virus infects most adults and remains latent throughout life. CMV infection in immunocompromised hosts such as transplant recipients is directly associated with a significant rate of morbidity (*2*), and indirect effects of CMV infection on patient and kidney graft survival have been increasingly recognized during recent years (*2–5*). CMV infection has also been associated with the risk of chronic allograft vasculopathy in both human (*3*, *6*, *7*) and experimental animal models (*8*). It is therefore important to prevent CMV infection after transplantation.

In response to infection, the host usually mobilizes both innate and adaptive immunity to ensure appropriate control of the infection. Innate immunity plays a crucial role in limiting early viral replication through activation of natural killer (NK) cells and IFNγ production (*9*, *10*). Specific immunity is mainly mediated by T lymphocytes, with $CD8^+$ T cells being primarily responsible for viral clearance of peripheral organs (*11*, *12*). Gammadelta T cells also participate in the early immune response to CMV (*13–15*), possibly through IFNγ synthesis (*15*). IL-12, derived from dendritic cells (DC) and macrophages, also play a central role in these processes (*16*, *17*).

IL-12 (IL-12p70) is composed of two subunits (p35 and p40) encoded by *IL12A* and *IL12B* genes located in two different chromosomes respectively (*18*). IL-12p70 is mainly

This work was supported by a grant from the Société Francophone de Transplantation.
[1] JE2448 Cellules Dendritiques et Greffes, UFR de Médecine, Université François Rabelais, Tours, France.
[2] Institut Fédératif de Recherche (IFR) 136, UFR de Médecine, Université François Rabelais, Tours, France.
[3] Service de Néphrologie et Transplantation Rénale, CHRU Bretonneau, Tours, France.
[4] UFR Sciences Pharmaceutiques, Université François Rabelais, Tours, France.
[5] INSERM ERI 19, UFR de Médecine, Université François Rabelais, Tours, France.
[6] Service de Bactériologie-Virologie, CHRU Bretonneau, Tours, France.
[7] Etablissement Français du Sang (EFS) de Loire Atlantique, Tours, France.
[8] Service de Néphrologie, CHU Hassan II, Fès, Morocco.
[9] Address correspondence to: Christophe Baron, M.D., Ph.D., Service de Néphrologie et Transplantation Rénale, CHRU de Tours, 37044 Tours cedex 9, France.
E-mail: baron@med.univ-tours.fr
Received 14 November 2007. Revision requested 11 December 2007.
Accepted 4 February 2008.
Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins
ISSN 0041-1337/08/8510-1406
DOI: 10.1097/TP.0b013e31816c7dc7

© 2008 Lippincott Williams & Wilkins

produced by macrophages and DC after encountering antigens (*19*). It binds to its high-affinity receptor composed of two polypeptides (β1 and β2) and stimulates IFNγ production in T and NK cells (*19*, *20*). In addition, IL-12p40 can also form a homodimer (IL-12p80) that interacts with the β1 subunit of the IL-12 receptor (*21*) and triggers complex and controversial effects on target cells (*21*). In the mouse p80 stimulates IFNγ production by $CD8^+$ T lymphocytes (*22*). In addition, recent findings have demonstrated that the p80 homodimer acted as a chemoattractant for macrophages (*23*) and promoted DC migration into lymph nodes to initiate T-cell responses (*24*). Finally, in combination with p19, p40 also forms IL-23, a recently discovered cytokine (*25*).

A single nucleotide polymorphism (SNP) has recently been described in the 3′-untranslated region (3′UTR) of *IL12B* (rs3212227) at nucleotide 16974 (GenBank accession no. AY008847), corresponding to position 1188 in mRNA (*26*, *27*). This A-to-C substitution has been shown to reduce the stability of the p40 mRNA in transfected cell lines (*28*), and to decrease the production of the IL-12p40 protein in stimulated peripheral blood monocyte cells (*29*). In addition, this SNP seems to be clinically relevant because it has been found to be associated with multiple sclerosis (*30*), type 1 diabetes mellitus (*31*), and psoriasis vulgaris (*32*). However, the impact of this SNP on clinical events after organ transplantation has never been reported.

Because p40 has been found in the composition of different cytokines involved in host defenses against pathogens (*19*), we decided to study the impact of this SNP on the occurrence of CMV infection after kidney transplantation. Few studies have been published to date on the relationship between genetic polymorphisms and the occurrence of CMV infection in allograft recipients, and only donor IL-10 and recipient TLR2 gene polymorphisms have been reported to be associated with the risk of CMV infection after transplantation (*33*, *34*). In this study, we investigated 469 kidney graft recipients and demonstrated for the first time that a polymorphism in the IL-12p40 gene was a risk factor for the occurrence of CMV infection after kidney transplantation.

PATIENTS AND METHODS

Patients and Study Design

We investigated the impact of the kidney recipients' *IL12B* 3′UTR genotype on the occurrence of CMV infection after kidney transplantation. Genotyping was performed on DNA samples from 469 white patients who had received a deceased-donor kidney transplantation at the University Hospital of Tours between 1995 and 2005. Blood samples for DNA analysis from these patients were taken after obtaining signed informed consent. Patients were divided into two groups according to the presence or absence of the A-to-C substitution. Concerning CMV serological status before graft and prophylaxis strategies, all patients who were seronegative for the CMV before the graft and received a kidney from a seropositive donor (D^+/R^-; n=104) received a prophylaxis for CMV. However, in five of these patients this prophylaxis had to be prematurely stopped because of drug intolerance. In addition, 26 seropositive recipients received a prophylaxis for CMV in the context of study protocols. As a whole, 125 patients received CMV prophylaxis with either acyclovir (16 patients), or valacyclovir (60 patients), or gancyclovir (10 patients) or valgancyclovir (39 patients). Most patients received quadruple sequential immunosuppression (calcineurin inhibitor, azathioprine, or mycophenolate mofetil (MMF), steroids and induction with either polyclonal antithymocyte globulins or anti-IL2R). Maintenance immunosuppressive therapy consisted of the combination of a calcineurin inhibitor and azathioprine or MMF with or without steroids. To assess the impact of this SNP on the spontaneous risk of CMV reactivation after transplantation, we carried out separate analysis in the subpopulation of patients who were seropositive for CMV before the graft and did not receive any CMV prophylaxis (n=222).

Diagnosis of Cytomegalovirus Infection

Between 1995 and 2005, regular screening of pp65 antigenemia was used to monitor CMV infection (once a week during the first 3 months, then every 2 weeks for 3 months and once a year thereafter). All data were registered in the renal transplant database available in our center. CMV infection after transplantation was defined as positive fluorescence for the pp65 antigen in circulating leukocytes (≥2 positive cells).

Characterization of 3′-Untranslated Region Genotypes

Genomic DNA was extracted from 2-mL whole blood samples using the QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. The SNP was genotyped by polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism. Primers were designed to amplify a region containing the 3′UTR polymorphism. The forward primer was 5′-GGCATGAAATCCCTGAAACC-3′ and the reverse primer was 5′-TACATCCTGGCAGACAAACG-3′. The PCR was performed in a Biorad MyCycler thermal cycler (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) under the following conditions: 95°C for 3 min, followed by 35 cycles at 95°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec; amplification was finished by heating for 5 min at 72°C. The 421-bp fragment obtained was digested with 5 units of *Taq*I (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) for 1 hr 40 min at 65°C and the digestion product was loaded on a 2% agarose gel. Amplicons from individuals without substitution (A/A genotype) appeared as a single 421-bp band after digestion, whereas homozygotes for the substitution (C/C) had two bands (269 and 152 bp). Heterozygotes (A/C) presented the three bands.

We used *GAPDH* gene amplification as an internal control of digestion to assess the efficiency of the *Taq*I digestion. A 607-bp region containing a *Taq*I restriction site was amplified with 5′-GGCTGGATGGAATGAAAG-3′ as forward primer and 5′-CCCTTACACGCTTGGATG-3′ as reverse primer. The PCR conditions were as follows: 95°C for 2 min, followed by 35 cycles at 95°C for 20 sec, 55°C for 20 sec, and 72°C for 30 sec; amplification was finished by heating for 2 min at 72°C. After digestion with 5 units of *Taq*I, *GAPDH* amplicons appeared as two bands on an agarose gel (449 and 158 bp), indicating complete digestion by *Taq*I.

Statistical Analysis

Results were expressed as means, standard deviations, and proportions. Chi-square and Mann-Whitney tests were

used to compare baseline characteristics between *IL12B* 3′UTR genotypes (presence or absence of the C allele). Logistic regression was used to identify risk markers for CMV infection, defined as the occurrence of CMV antigenemia within the first 6 months after transplantation. We used multivariate analyses (Cox regression) to assess whether the relationship between the 3′UTR genotype and CMV infection was independent, adjusting the effect on all variables significantly associated with CMV infection in the univariate analysis. The parameters entered into the models were acute rejection, use of MMF, human leukocyte antigen (HLA) AB- and DR-antigen matching, recipient CMV serology, donor CMV serology, CMV prophylaxis, recipient age, and use of antithymocyte globulins.

Analyses were performed using SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC), with risk ratios (RR, defined by the ratio between the frequency of CMV infection in C allele carriers and C allele non carriers' one) and odds ratios (OR). A *P* value less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Distribution of 3′-Untranslated Region Genotypes

The C allele frequency and the distribution of 3′UTR genotypes for the whole population (n=469) are shown in Table 1. The C allele frequency was 22%. The A/A genotype was present in 60% of patients, A/C genotype in 36%, and C/C genotype in 4%. This population was in Hardy-Weinberg equilibrium, which indicated that its genetic diversity was stable.

Among the 469 patients, we analyzed separately the subpopulation of patients who were seropositive for CMV before the transplantation and who did not receive any CMV prophylaxis after the graft (n=222). The distribution of genotypes in this subpopulation was not significantly different from the whole population's one: 56% were A/A and 44% were C carriers (P=0.338 in comparison with the whole population; χ^2 test).

Baseline Characteristics

The baseline characteristics and the donor/recipient CMV status of the two groups as defined by the presence or absence of the substitution are shown in Tables 2 and 3 for the whole population, respectively. There was no significant difference between the groups regarding pretransplantation data such as recipient and donor gender, recipient age, cause of end-stage renal disease, HLA matching, anti-HLA immunization, and graft rank. Importantly, matching between donors and recipients for CMV serological status was not different between the two groups (21% of D^+/R^- in the A/A group vs. 23% in the other, P=0.636). Donor age and mean cold ischemia time were slightly different between the two groups (45 years for the A/A group vs. 47 for the other, and 21 hr vs. 20 hr, respectively), but this did not reach statistical significance (P=0.069 and 0.071, respectively). Posttransplantation data analysis did not show any significant difference for immunosuppressive treatments, especially for antibody induction, neither for delayed graft function, acute rejection, or CMV prophylaxis.

TABLE 1. Distribution of *IL12B* 3′UTR genotypes in 469 kidney graft recipients

	Number tested	A/A, N (%)	A/C, N (%)	C/C, N (%)	C allele frequency
Kidney graft recipients	469	280 (60)	169 (36)	20 (4)	22%

TABLE 2. Clinical data for 469 kidney graft recipients according to *IL12B* 3′UTR genotype

	3′UTR genotype		
Clinical data[a]	A/A (N=280)	A/C and C/C (N=189)	P^b
Recipient age (yr)	47±13	48±14	0.328
Recipient gender (female)	106 (38%)	72 (38%)	0.958
Donor age (yr)	45±15	47±15	0.069
Donor gender (female)	100 (36%)	75 (40%)	0.383
Cause of renal disease			
Diabetes	13 (5%)	12 (6%)	0.420
Polycystic kidney	44 (16%)	37 (20%)	0.278
Glomerulonephritis	48 (17%)	33 (17%)	0.929
IgA nephropathy	38 (14%)	23 (12%)	0.658
Others	137 (49%)	84 (44%)	0.340
Cold ischemia time (hr)	21±7	20±8	0.071
HLA matching			
AB	0.9±1.0	0.9±1.0	0.476
DR	0.6±0.6	0.7±0.7	0.151
Graft rank >1	37 (13%)	21 (11%)	0.391
Anti-HLA immunization (positive)			
I	41 (15%)	27 (14%)	0.914
II	37 (13%)	21 (11%)	0.497
Induction treatment			
Antithymocyte globulins	161 (58%)	114 (60%)	0.543
Anti-IL2R	96 (34%)	59 (31%)	0.488
Immunosuppressive treatment			
Mycophenolate mofetil	233 (83%)	152 (80%)	0.439
Calcineurin inhibitors	269 (96%)	182 (96%)	0.901
Delayed graft function	54 (19%)	29 (15%)	0.273
Acute rejection in the first year	81 (29%)	58 (31%)	0.682
CMV prophylaxis	77 (28%)	48 (25%)	0.613

[a] Results are expressed as percentages and means±SD.
[b] Chi-square test was used to compare categorical data and Mann-Whitney *U* test was used to compare numeric factors.

© 2008 Lippincott Williams & Wilkins

TABLE 3. Donor/recipient CMV serological status and prophylaxis according to *IL12B* 3′UTR genotype

CMV serological status and prophylaxis[a]	3′UTR genotype A/A (N=280)	3′UTR genotype A/C and C/C (N=189)	P^b
D^-R^- (no prophylaxis)	76 (27%)	41 (22%)	0.181
D^+R^- (prophylaxis)	60 (21%)	44 (23%)	0.636
$D^{+/-}R^+$	144 (51%)	104 (55%)	0.444
Prophylaxis	20 (7%)	6 (3%)	0.102
No prophylaxis	124 (44%)	98 (52%)	0.107

[a] D/R indicates donor/recipient and +/− indicates positive/negative CMV serological status before the transplantation.
[b] Chi-square test was used to compare frequencies.

The C Allele of the 3′-Untranslated Region Polymorphism as a Risk Factor for Cytomegalovirus Infection

Univariate analysis shown in Table 4 indicated that the C allele was associated with an increased risk of CMV infection in the whole population (OR=1.51 [95% CI: 1.04–2.20], P=0.031, RR=1.28). When this analysis was restricted to seropositive patients who did not receive CMV prophylaxis (n=222), the C allele was also a risk factor for CMV reactivation (OR=1.91 [95% CI: 1.10–3.30], P=0.021, RR=1.31) (Table 4). The median duration between transplantation and the first positive CMV antigenemia result was not significantly different between C carriers and the others for both the whole population (39 vs. 39 days, P=0.958; Mann-Whitney test) and the subpopulation who did not receive any CMV prophylaxis (33 vs. 36 days, P=0.578).

We also looked for other risk factors that might be significantly associated with CMV infection in our transplantation center. We analyzed several factors such as use of MMF, matching for HLA DR- and AB-antigens, use of antithymocyte globulins, occurrence of acute rejection, donor/recipient CMV serology (positive donor/negative recipient or positive recipient serology), CMV prophylaxis treatment, and recipient age. Only use of MMF, donor/recipient CMV serology, and recipient age were significantly associated with CMV infection in univariate analysis in the whole population (Table 5).

Multivariate analyses showed that the C allele retained its significant effect on the occurrence of CMV infection (Table 6). Furthermore, after adjustment for these factors simultaneously, the C allele also retained its impact on CMV infection (OR=1.52 [95% CI: 1.01–2.27], P=0.043 for the whole population and OR=1.88 [95% CI: 1.07–3.32], P=0.028 for the seropositive patients who did not receive CMV prophylaxis; Table 6). Patients carrying the C allele of the *IL12B* 3′UTR polymorphism were therefore identified as having an independent and increased risk of CMV reactivation.

TABLE 5. Other risk factors for CMV infection in the whole population (n=469): univariate analysis

	Odds ratio	95% CI	P^a
Use of mycophenolate mofetil (yes/no)	2.14	1.26–3.62	0.005
HLA AB matching (per 1 match)	1.12	0.85–1.47	0.761
HLA DR matching (per 1 match)	1.21	0.83–1.77	0.253
Use of antithymocyte globulins (yes/no)	1.43	0.98–2.10	0.062
Acute rejection (yes/no)	1.20	0.80–1.79	0.377
Positive donor CMV serology and negative recipient CMV serology (yes/no)	1.68	1.09–2.61	0.020
Positive recipient serology (yes/no)	3.95	2.65–5.88	<0.0001
CMV prophylaxis (yes/no)	1.36	0.90–2.06	0.143
Recipient age (per year)	1.02	1.01–1.03	0.007

[a] The occurrence of CMV infection was analyzed by logistic regression according to certain clinical parameters.
CI, confidence interval.

DISCUSSION

In this study we investigated the 3′UTR polymorphism of the IL-12p40 gene (an A-to-C substitution at position 1188 in the mRNA) in kidney transplant patients. We found that the frequency of this SNP (22%) in kidney transplant patients was similar to the frequency reported by others in healthy white populations (*35*). This suggested that this substitution was not associated with the occurrence of kidney disease leading to transplantation. We then analyzed the relationship between this SNP and the occurrence of CMV infection in a large cohort of transplanted patients, and found that the C allele of this SNP was an independent risk factor of developing CMV infection, particularly in recipients with positive CMV serological status. Unfortunately, we were not able to carry out a study on an independent patient sample to assess the replication of the association. However, these preliminary results suggest for the first time that the 3′UTR C allele might be a risk factor for CMV reactivation.

TABLE 4. Patients with CMV infection according to *IL12B* 3′UTR genotype

Populations	3′UTR genotype A/A	3′UTR genotype A/C and C/C	Odds ratio (95% CI)	P^a
Whole population (N=469)	101/280 (36%)	87/189 (46%)	1.51 (1.04–2.20)	0.031
Subpopulation restricted to the seropositive patients without CMV prophylaxis (N=222)	63/124 (51%)	65/98 (66%)	1.91 (1.10–3.30)	0.021

[a] CMV infections were compared by logistic regression.
CI, confidence interval.

TABLE 6. The C allele as a risk factor for CMV infection: multivariate analysis

	Odds ratio	95% CI	P^a
Adjustment for single parameters in the whole population (n=469)			
Use of mycophenolate mofetil (yes/no)	1.56	1.06–2.28	0.023
Positive recipient CMV serology (yes/no)	1.50	1.01–2.24	0.044
Recipient age (per year)	1.49	1.02–2.18	0.038
Adjustment for single parameters in the subpopulation restricted to the seropositive patients without CMV prophylaxis (n=222)			
Use of mycophenolate mofetil (yes/no)	1.95	1.12–3.42	0.019
Recipient age (per year)	1.84	1.06–3.20	0.031
Adjustment for multiple parameters[b]			
Whole population	1.52	1.01–2.27	0.043
Subpopulation	1.88	1.07–3.32	0.028

[a] The occurrence of CMV infection was compared between *IL12B* 3′UTR genotypes (presence or absence of the C allele) by Cox regression multivariate analysis.

[b] Multiparameter analyses were performed on the whole population with adjustment for use of mycophenolate mofetil, positive recipient CMV serology and recipient age simultaneously, and on the subpopulation with adjustment for use of mycophenolate mofetil and recipient age simultaneously.

CI, confidence interval.

We defined active CMV infection by positive pp65 antigenemia since this test was used between 1995 and 2005 to monitor viral replication in our center. More sensitive techniques of CMV detection have since been introduced, such as amplification of the viral DNA in the blood by quantitative PCR (*36*). However, the strategy used in the present study should not have affected the results because all patients were monitored according to the same assay, the specificity of which is high (95% when using quantitative real-time PCR as the reference) (*36*). Furthermore, although positive PCR usually precedes positive antigenemia, only few patients with a positive PCR result remain negative for antigenemia (*36*). As all patients in our study were longitudinally analyzed, we considered that antigenemia was an accurate method to monitor CMV infection.

The results of the present study address the question of the pathogenic link between IL-12p40 gene polymorphism and CMV reactivation. The 3′UTR polymorphism of the IL-12p40 gene has been shown to be functionally relevant because the C allele is associated with lower mRNA stability (*28*), and lower production of the p40 polypeptide (*29*). We suggest that this lower p40 expression in C carriers might explain the pathogenic link between the *IL12B* genotype and CMV replication. The net effect of a decrease in p40 production on the immune response is difficult to assess for many reasons. First, this polypeptide is present in the composition of at least three different cytokines: IL-12p70 (p35/p40 dimer), IL-23 (p19/p40 dimer), and IL-12p80 (p40 homodimer). Second, p40 is produced in excess when compared with p35 (*21*). It is therefore not clear whether a decrease in p40 synthesis leads to a decrease in IL-12p70 production. Third, by competing with IL-12p70 for binding to the IL-12 receptor, IL-12p80 has certain antagonist effects with IL-12p70 in rodents (*37*). However, in humans the p40 homodimer has lower binding affinity for the IL-12 $\beta1/\beta2$ receptor when compared with IL-12p70 (*19*). The direct activating role of IL-12p40/p80 has recently been revealed (*21*). In mice, p80 directly stimulates IFNγ production by $CD8^+$ T cells (*22*), and both $CD8^+$ T cells and IFNγ have been shown to be major mediators of host defenses against CMV (*10–12*). In addition, recent findings have demonstrated that p80 acts as a chemoattractant for macrophages (*23*) and promotes DC migration into lymph nodes to initiate T-cell responses (*24*). Furthermore, CMV infection in mice is specifically accompanied by a dramatic increase in p40 production (*17*, *38*), and a recent study demonstrated that overexpression of p40 in mouse DC resulted in a strong increase in NK cell activity and IFNγ production by these cells (*39*). Interestingly, these authors showed that this was not mediated by a direct effect of p40/p80 on NK cells but rather by some other factor secreted by overexpressing p40-DC. They suggested that this factor might be the heterodimer p19/p40 (IL-23). Both IL-23 and IL-12 have similar effects on IFNγ production and IL-23 has been reported to promote the activation of Th17 $CD4^+$ T cells which produce IL-17 to set up neutrophil-mediated inflammation (*25*). IL-23 has also been reported to play an important role in several infectious diseases (*25*), but to date no findings have been reported regarding the role of IL-23 in immune defense against CMV. Taken together, these experimental findings suggest that the level of p40 expression might play an important role in induction of IFNγ synthesis during CMV infection, thus providing a pathogenic link between IL-12p40 gene polymorphism and risk of CMV infection.

Unfortunately, the incidence of CMV disease (defined by positive antigenemia associated with organ involvement) according to genotype could not be reliably assessed in this study because of the small number of patients who developed symptomatic infection. This low incidence was because of the preemptive treatment used in our center.

Finally, the findings of the present study might contribute to improve the management of the risk of CMV infection after transplantation. Systematic drug prevention of CMV primoinfection in kidney graft recipients is currently widely accepted. However, strategies to prevent reactivation of CMV remain a subject of debate. Our results together with the search for other genetic polymorphisms associated with an increased risk of CMV infection might help to stratify the risk of CMV infection according to genetic polymorphisms to better adapt the strategy of prevention in transplanted patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all the staff of the Nephrology and Transplantation Department of the CHRU of Tours. The authors also thank Doreen Raine for editing the English language.

REFERENCES

1. Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, et al. A prospective study of the natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal allograft recipients. *Transplantation* 2000; 70: 1166.

© 2008 Lippincott Williams & Wilkins

2. Brennan DC. Cytomegalovirus in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 848.
3. Humar A, Gillingham KJ, Payne WD, et al. Association between cytomegalovirus disease and chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68: 1879.
4. Sagedal S, Hartmann A, Nordal KP, et al. Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int* 2004; 66: 329.
5. Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, et al. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2002; 2: 850.
6. Hussain T, Burch M, Fenton MJ, et al. Positive pretransplantation cytomegalovirus serology is a risk factor for cardiac allograft vasculopathy in children. *Circulation* 2007; 115: 1798.
7. Potena L, Holweg CT, Chin C, et al. Acute rejection and cardiac allograft vascular disease is reduced by suppression of subclinical cytomegalovirus infection. *Transplantation* 2006; 82: 398.
8. Lautenschlager I, Soots A, Krogerus L, et al. Effect of cytomegalovirus on an experimental model of chronic renal allograft rejection under triple-drug treatment in the rat. *Transplantation* 1997; 64: 391.
9. Lee SH, Webb JR, Vidal SM. Innate immunity to cytomegalovirus: The Cmv1 locus and its role in natural killer cell function. *Microbes Infect* 2002; 4: 1491.
10. Presti RM, Pollock JL, Dal Canto AJ, et al. Interferon gamma regulates acute and latent murine cytomegalovirus infection and chronic disease of the great vessels. *J Exp Med* 1998; 188: 577.
11. Lucin P, Pavic I, Polic B, et al. Gamma interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. *J Virol* 1992; 66: 1977.
12. Reddehase MJ, Mutter W, Munch K, et al. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J Virol* 1987; 61: 3102.
13. Halary F, Pitard V, Dlubek D, et al. Shared reactivity of V{delta}2(neg){gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 2005; 201: 1567.
14. Lafarge X, Merville P, Cazin MC, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* 2001; 184: 533.
15. Ninomiya T, Takimoto H, Matsuzaki G, et al. Vgamma1+ gammadelta T cells play protective roles at an early phase of murine cytomegalovirus infection through production of interferon-gamma. *Immunology* 2000; 99: 187.
16. Carr JA, Rogerson JA, Mulqueen MJ, et al. The role of endogenous interleukin-12 in resistance to murine cytomegalovirus (MCMV) infection and a novel action for endogenous IL-12 p40. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 1145.
17. Orange JS, Biron CA. Characterization of early IL-12, IFN-alphabeta, and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 1996; 156: 4746.
18. Sieburth D, Jabs EW, Warrington JA, et al. Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. *Genomics* 1992; 14: 59.
19. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 133.
20. Magram J, Connaughton SE, Warrier RR, et al. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 1996; 4: 471.
21. Cooper AM, Khader SA. IL-12p40: An inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol* 2007; 28: 33.
22. Piccotti JR, Chan SY, Li K, et al. Differential effects of IL-12 receptor blockade with IL-12 p40 homodimer on the induction of CD4+ and CD8+ IFN-gamma-producing cells. *J Immunol* 1997; 158: 643.
23. Ha SJ, Lee CH, Lee SB, et al. A novel function of IL-12p40 as a chemotactic molecule for macrophages. *J Immunol* 1999; 163: 2902.
24. Khader SA, Partida-Sanchez S, Bell G, et al. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med* 2006; 203: 1805.
25. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 521.
26. Hall MA, McGlinn E, Coakley G, et al. Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immune-mediated disease. *Genes Immun* 2000; 1: 219.
27. Huang D, Cancilla MR, Morahan G. Complete primary structure, chromosomal localisation, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit. *Genes Immun* 2000; 1: 515.
28. Morahan G, Huang D, Ymer SI, et al. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory *IL12B* allele. *Nat Genet* 2001; 27: 218.
29. Stanilova S, Miteva L. *Taq*-I polymorphism in 3′UTR of the *IL-12B* and association with IL-12p40 production from human PBMC. *Genes Immun* 2005; 6: 364.
30. van Veen T, Crusius JB, Schrijver HM, et al. Interleukin-12p40 genotype plays a role in the susceptibility to multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50: 275.
31. Windsor L, Morahan G, Huang D, et al. Alleles of the *IL12B* 3′UTR associate with late onset of type 1 diabetes. *Hum Immunol* 2004; 65: 1432.
32. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, et al. A large-scale genetic association study confirms *IL12B* and leads to the identification of *IL23R* as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 273.
33. Alakulppi NS, Kyllonen LE, Salo HM, et al. The impact of donor cytokine gene polymorphisms on the incidence of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl Immunol* 2006; 16: 258.
34. Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, et al. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1315.
35. Mueller T, Mas-Marques A, Sarrazin C, et al. Influence of interleukin 12B (*IL12B*) polymorphisms on spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2004; 41: 652.
36. Yakushiji K, Gondo H, Kamezaki K, et al. Monitoring of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation: Comparison of an antigenemia assay and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 599.
37. Heinzel FP, Hujer AM, Ahmed FN, et al. In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. *J Immunol* 1997; 158: 4381.
38. Ruzek MC, Miller AH, Opal SM, et al. Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med* 1997; 185: 1185.
39. Sun W, He X, Guo Z, et al. IL-12p40-overexpressing immature dendritic cells induce T cell hyporesponsiveness in vitro but accelerate allograft rejection in vivo: Role of NK cell activation and interferon-gamma production. *Immunol Lett* 2004; 94: 191.

II. Le SNP PD-1.3 est associé à l'infection à CMV après transplantation rénale.

Ces résultats ont donné lieu à un article publié dans *Journal of Medical Genetics* (Hoffmann *et al.*, 2009a).

Cette étude concerne la même population que celle d'*IL12B* 3'UTR : 469 patients transplantés entre 1995 et 2005 et génotypés par la méthode RFLP (voir partie précédente). Tous les détails cliniques concernant les patients, l'antigénémie CMV et les tests statistiques sont indiqués dans les articles.

Des résultats supplémentaires, qui ne sont pas dans l'article, sont aussi présentés. Pour ces résultats, les données continues ont été statistiquement comparées par le test de Mann-Whitney et les non-continues par le test du Chi2.

II.1. Résumé de l'article et résultats complémentaires.

II.1.1. L'allèle A est un facteur de risque de réactivation du CMV.

Dans cette population de 469 transplantés rénaux, 76% sont homozygotes commun (G/G), 22% sont hétérozygotes (G/A) et 2% sont homozygotes variants (A/A), ce qui donne une fréquence de l'allèle variant A de 13% environ. Nous avons vérifié que l'équilibre de Hardy-Weinberg était respecté, et que la fréquence de l'allèle A était similaire à celles rapportées dans d'autres études chez des contrôles sains caucasiens (Ferreiros-Vidal *et al.*, 2007), ce qui suggère que ce SNP n'est pas associé aux maladies rénales menant à la transplantation.

Nous avons comparé la survenue de l'infection à CMV entre les porteurs de l'allèle PD-1.3 A (G/A et A/A) et ceux ne l'ayant pas (G/G) avec une analyse statistique univariée puis multivariée. Après avoir vérifié que les caractéristiques cliniques de base n'étaient pas différentes entre ces 2 groupes, il est ainsi apparu que les porteurs de l'allèle A présentaient plus d'infection à CMV que les autres patients, ce résultat n'étant significatif que pour la

sous-population des 222 patients R^+ n'ayant pas reçu de prophylaxie anti-CMV (OR = 1,38, p = 0,141 pour la population totale et OR = 2,60, p = 0,006 pour les R^+ sans prophylaxie). Ceci montre une forte association entre PD-1.3 et la réactivation du CMV. De plus, nous avons mené une étude multivariée sur la sous-population des R^+ sans prophylaxie et nous avons montré, après ajustement sur d'autres facteurs de risque de réactivation du CMV (âge du receveur, utilisation du MMF et de l'ATG, survenue d'un rejet aigu, et présence de l'allèle *IL12B* 3'UTR C), que l'allèle A était un facteur de risque indépendant d'infection à CMV (OR = 2,54, p = 0,010).

Mais les résultats les plus intéressants ont été observés en combinant les études d'*IL12B* 3'UTR et de PD-1.3 chez les patients R^+ sans prophylaxie. En effet, les patients n'ayant aucun des 2 facteurs de risques sont particulièrement protégés contre l'infection à CMV par rapport aux porteurs d'*IL12B* 3'UTR sans PD-1.3 A (OR = 2,38, p = 0,006) et aux porteurs de PD-1.3 A indépendamment d'*IL12B* 3'UTR (OR = 3,76, p = 0,0003). Par ailleurs, il semble que l'effet de PD-1.3 A l'emporte sur celui d'*IL12B* 3'UTR C vu que le pourcentage d'infection à CMV chez les porteurs de PD-1.3 A est similaire que ces derniers aient ou pas l'allèle C (72% et 76% respectivement). Nous avons donc mis en évidence chez les patients R^+ trois populations différentes dans le risque d'infection à CMV : des patients à faible risque (43%, ceux qui ne portent aucun des 2 facteurs de risques), une population intermédiaire (64%, les porteurs d'*IL12B* 3'UTR sans PD-1.3 A) et des patients à très haut risque (74%, les porteurs de PD-1.3 A indépendamment d'*IL12B* 3'UTR). D'ailleurs, le risque d'infection à CMV chez ces derniers est presque le même que celui des transplantés rénaux les plus à risque, les D^+/R^- (80%), ce qui justifierait une extension des traitements prophylactiques à ce groupe de patients. En effet, les stratégies de prise en charge du CMV chez les R^+ sont encore sujettes à débat. Un tel ajustement des traitements chez ces patients en fonction des marqueurs génétiques permettrait de réduire de 35% le nombre d'infections à CMV par rapport au traitement préemptif, tout en n'augmentant que de 10% le nombre de patients traités, mais il réduirait également de 80% le nombre de traitements inutiles (traiter des patients qui n'auraient pas présenté d'infection à CMV) par rapport à la prophylaxie universelle.

Cependant, il n'est pas encore établi si l'antigénémie est un marqueur sensible et spécifique des effets indirects chroniques que peut avoir le CMV sur le greffon. Des études ont détecté de très faibles niveaux de réplication du virus dans certains tissus avec lésions inflammatoires (Soderberg-Naucler, 2006), suggérant le concept d'une micro-infection locale pouvant promouvoir de telles lésions. La réponse immune du receveur en réponse à l'antigénémie

pourrait être plus importante que l'antigénémie elle-même, et il serait alors intéressant d'évaluer comment les porteurs de l'allèle A de PD-1.3 gèrent les lésions chroniques associées au CMV.

Il s'agit de résultats sur une large cohorte de patients transplantés. Cependant une cohorte de réplication sur une population indépendante permettrait de renforcer la validité du résultat. Nous envisageons donc à terme de constituer une cohorte de validation à partir de transplantés rénaux d'autres centres et d'y vérifier l'association entre PD-1.3 et l'infection à CMV.

Nous commençons également à mettre en place un projet avec Vaincre La Mucoviscidose, où nous testerons l'influence d'*IL12B* 3'UTR et PD-1.3 sur l'infection à CMV chez des transplantés pulmonaires de 3 grands centres de transplantation français.

II.1.2. Hypothèse sur le lien pathogénique entre PD-1.3 et la réactivation du CMV (résultats non publiés).

Le lien pathogénique entre PD-1.3 et l'infection à CMV est plus compliqué que pour *IL12B* 3'UTR. En effet, l'allèle A a été rapporté comme diminuant l'expression et l'activité de PD-1 dans des cellules de patients atteints de sclérose en plaques ou de lupus (Bertsias *et al.*, 2009; Kroner *et al.*, 2005), ce qui entraînerait donc une activation plus importante de la réponse immunitaire, et potentiellement de celle antivirale. Ceci semble en contradiction avec les résultats que nous avons obtenus sur PD-1.3 et la réactivation du CMV (Hoffmann *et al.*, 2009a). Cependant, si on considère qu'une forte réponse immunitaire peut déclencher la sortie de latence du CMV (Asadullah *et al.*, 1999; Heininger *et al.*, 2001; Söderberg-Nauclér, 2008; von Müller *et al.*, 2007), nous pouvons expliquer comment l'allèle A de PD-1.3 peut être un facteur de risque de réactivation du CMV chez les patients R^+ sans prophylaxie. En contrepartie, cette hypothèse impliquerait que les porteurs de A maîtrisent mieux l'infection une fois qu'elle s'est déclarée, puisqu'ils auraient une réponse immunitaire plus activée.

Tout comme pour *IL12B* 3'UTR, nous avons repris pour le moment les dossiers cliniques des patients transplantés entre 2004 et 2005 et, sur les 61 patients ayant présenté une antigénémie positive durant cette période, nous avons répertorié ceux dont l'antigénémie CMV s'était négativée spontanément (n = 26) ainsi que ceux l'ayant négativée après un traitement anti-CMV (n = 35). Nous pouvons voir que le génotype G/G (protégeant contre l'infection à CMV) semble sous-représenté chez les « négativeurs » spontanés par rapport à l'ensemble de

la cohorte (62% contre 76%, OR = 0,51, p = 0,099 ; Tableau 4) et aux « négativeurs » après traitement anti-CMV (62% contre 83%, OR = 0,33, p = 0,061 ; Tableau 4).

Tableau 4. Négativation spontanée de l'antigénémie CMV et génotype de PD-1.3.

Génotype de PD-1.3	Cohorte totale N = 469	Négativation après traitement anti-CMV N = 35	Négativeurs spontanés N = 26	Odds ratio [a] (p)	Odds ratio [b] (p)
G/G	356 (76%)	29 (83%)	16 (62%)	0,51 (0,099)	0,33 (0,061)

IC : intervalle de confiance. La fréquence du génotype G/G de PD-1.3 a été comparée avec le test du Chi2 entre les négativeurs spontanés et : [a] la cohorte totale ou [b] les patients ayant négativé après un traitement anti-CMV.

Bien qu'ils n'atteignent pas le seuil de significativité (notons les très faibles effectifs), ces résultats préliminaires suggèrent que le génotype G/G serait un facteur de moins bonne maitrise de l'infection à CMV une fois que le virus se réplique. Ceci est donc en cohérence avec l'hypothèse pathogénique formulée précédemment : l'allèle variant A de PD-1.3, en déclenchant une réponse immunitaire forte, serait un facteur de sortie de latence du virus, mais serait aussi associé à une meilleure capacité du système immunitaire à diminuer la réplication virale. Ces résultats nous encouragent ainsi à reprendre les dossiers cliniques de plus de patients afin de confirmer l'association entre ce SNP et la négativation spontanée.

Par ailleurs, lorsque nous observons le délai avant l'antigénémie CMV positive chez les 128 patients séropositifs avant la greffe ayant présenté une infection à CMV, nous ne pouvons voir aucune différence significative entre les porteurs de l'allèle A et les non porteurs (médianes : 37 jours contre 33, p = 0,091 ; Figure 13).

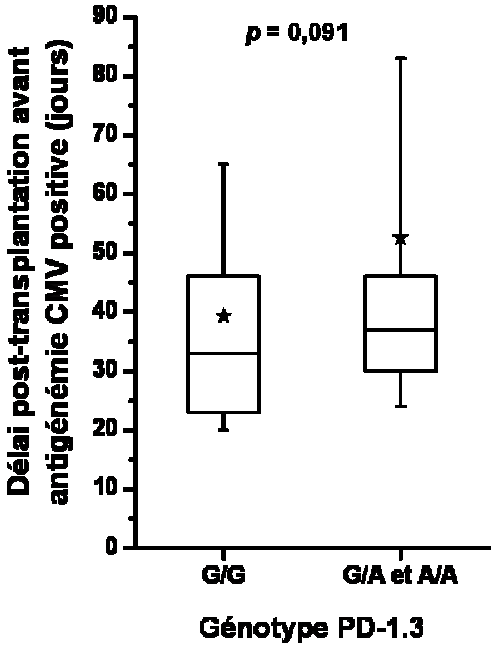


Figure 13. Influence du génotype du SNP PD-1.3 sur le délai avant l'antigénémie CMV positive. Dans notre cohorte de 469 patients, nous avons analysé le délai avant l'infection à CMV en fonction du génotype de PD-1.3 chez les 128 patients séropositifs avant la transplantation n'ayant pas reçu de prophylaxie anti-CMV et ayant présenté une antigénémie CMV positive. Les boîtes représentent les intervalles interquartiles, avec une ligne à l'intérieur pour la médiane, tandis que les pattes correspondent aux 10èmes et 90èmes centiles et que les étoiles représentent les moyennes. Les valeurs relevées ont été comparées entre les 2 groupes de patients (porteurs de C et non-porteurs) avec le test de Mann-Whitney.

Le lien pathogénique entre PD-1.3 et la réactivation du CMV reste incertain, mais il semble intéressant d'approfondir cette étude par des travaux *in vitro* notamment, d'autant plus que les traitements immunosuppresseurs pourraient influencer l'impact fonctionnel de PD-1.3. Une possibilité serait d'étudier *in vitro* l'effet de PD-1.3 sur l'expression de PD-1 et sur la fonctionnalité lymphocytaire en réponse au CMV. La quantification de la réponse cellulaire T directement dirigée contre le CMV serait mesurée par cytométrie en flux. Brièvement, nous isolerions les PBMC de donneurs sains et de greffés rénaux séropositifs pour le CMV, dont nous aurions génotypé PD-1.3. Les cellules seraient incubées avec une solution d'antigènes du CMV ou avec des cellules dendritiques autologues immatures préalablement infectées par le CMV. Elles seraient ensuite marquées pour les antigènes CD4 ou CD8, puis incubées avec des anticorps anti-PD-1 et anti-IFNγ afin de déterminer l'expression de PD-1 et de quantifier le nombre de cellules répondeuses spécifiquement dirigées contre le CMV. Le niveau de réponse serait comparé en fonction du génotype de PD-1.3. De plus, nous étudierions

également par cytométrie en flux l'impact de PD-1.3 sur l'activité cytotoxique des lymphocytes anti-CMV obtenus plus haut en utilisant, comme pour *IL12B* 3'UTR, des PBMC autologues infectées par le CMV et marquées au CFSE, ainsi qu'un anticorps anti-CD107 et le marqueur 7-AAD. Les niveaux de marquage seraient là aussi comparés entre les différents génotypes.

II.2. Article publié dans *Journal of Medical Genetics* (pdf).

Association between a polymorphism in the human programmed death-1 (PD-1) gene and CMV infection after kidney transplantation.

Thomas W. Hoffmann[1,3], Jean-Michel Halimi[1,2,3], Mathias Büchler[1,2,3], Florence Velge-Roussel[1,3], Alain Goudeau[4], Azmi Al-Najjar[2], Jean-Frédéric Marliere[2], Yvon Lebranchu[1,2,3] and Christophe Baron[1,2,3,*]

[1] Université François Rabelais de Tours, EA 4245 Cellules Dendritiques Immunomodulation et Greffes, UFR de Médecine, Tours, France; [2] CHRU de Tours, Service de Néphrologie et Immunologie Clinique, Tours, France; [3] IFR 136, Infectiologie et Vaccinologie, Tours, France; [4] CHRU de Tours, Service de Bactériologie-Virologie, Tours, France.

*Corresponding author: Dr Christophe Baron (MD/PhD), Service de Néphrologie et Immunologie Clinique, CHRU de Tours, 37044 Tours cedex 9, France.

Phone: (+33) 0247473592. Fax: (+33) 0234378901.

E-mail: baron@med.univ-tours.fr

Keywords: programmed death-1, genetic polymorphism, cytomegalovirus infection, kidney transplantation.

Word count: 2984.

ABSTRACT

Background. Cytomegalovirus (CMV) infection is the most frequent infectious disease following organ transplantation. Strategies to prevent this infection remain matter of debate, and discovering genetic risk factors might assist in adapting preventive strategies. By inhibiting IFNγ production, programmed death 1 (PD-1) has a crucial role in anti-CMV immune response. A SNP within intron 4 of the gene (rs11568821), called PD-1.3, has recently been reported to be clinically relevant in several immune disorders. However, its association with CMV infection has never been reported.

Methods. In this study, we investigated the risk of CMV infection according to PD-1.3 genotype in 469 kidney graft recipients transplanted between 1995 and 2005.

Results. We found that the A allele was associated with the risk of CMV infection in seropositive patients who did not receive CMV prophylaxis (OR=2.60, p=0.006). Multivariate analysis including other risk factors for CMV infection showed that this allele was independently associated with CMV infection (OR=2.54, p=0.010). Interestingly, combined analysis of PD-1.3 with the *IL12B* 3'UTR SNPs (previously shown to be associated with CMV infection) revealed that patients with the PD-1.3 A allele had a much higher risk of CMV infection compared to those having neither risk allele (OR=3.76, p=0.0003).

Conclusion. This study identified a new genetic risk factor for CMV infection after kidney transplantation and suggests that an adjustment of CMV prophylaxis based on genetic markers would merit further investigation.

INTRODUCTION

Cytomegalovirus (CMV) infection, the most frequent infection occurring in transplant patients is both directly and indirectly associated with a significant rate of morbidity.[1] CMV has been reported to have effects on kidney graft survival[1] and is suspected of being a cause of chronic allograft dysfunction in both human transplantation[2, 3] and experimental animal models.[4] Different strategies have been proposed for the management of CMV. One consists of deferring treatment until clinical signs are evident, another is to treat patients prior to detectable viral replication (referred to as prophylaxis), and the third is to treat CMV viremia before the patient becomes symptomatic (referred to as pre-emptive).[5] The prescription of drug prophylaxis to patients exposed to a high risk of symptomatic CMV disease (such as primary infection in D^+/R^- recipients) is widely accepted. However, the strategy for seropositive recipients (R^+) remains a matter of debate. In the latter group, a consensus has emerged on the benefit of treating with an antiviral agent before clinical evidence of CMV. However, the superiority of prophylaxis over pre-emptive strategies has not yet been clearly demonstrated, since it is still unclear whether asymptomatic CMV infection can affect long-term graft survival.[6] In addition, since only some of the R^+ patients will develop CMV infection, universal prevention in these patients raises concerns due to the high cost, the side effects associated with oral valgancyclovir and the possible development of drug resistance.[7] The genetic risk factors of CMV infection are currently poorly understood. Our group has recently reported that a polymorphism in the recipient IL-12p40 gene is associated with an increased risk of CMV infection after kidney transplantation.[8] Unraveling new genetic polymorphisms associated with CMV infection might improve our understanding of the mechanisms leading to viral replication and provide opportunities to test new genetically- targeted prophylaxis strategies.

CMV can persist throughout the lifetime of a host at specific sites, such as in hematopoietic progenitors and monocytes, in the absence of any detectable production of infectious viruses (state of latency). Clinical[9, 10] and experimental[11] studies have shown that inflammation initiates viral replication through NF-kappaB-dependent activation of the CMV IE1/2 enhancer/promoter, which is crucial for productive viral infection.[12] In an immunocompetent host, such reactivation events are generally well controlled through activation of NK cells, $CD8^+$ and γδ T cells.[13-15] However, in immunosuppressed transplant patients, dissemination of the virus can become uncontrolled and lead to high levels of morbidity, but the active mechanisms involved in the maintenance of latency are not clear.

In transplant settings, it has been shown that reactivation can be initiated by depleting antilymphocyte antibody treatments, by an alloimmune response[11, 16] or by ischemia/reperfusion.[17] The release of inflammatory mediators in these circumstances appears to have a crucial role. Taken together, these results demonstrate that the strength of an ongoing immune response appears to be a determining factor in initiating the reactivation of CMV.

The membrane-associated molecule PD-1 (programmed death-1), expressed on activated lymphocytes, has a crucial role in regulating the immune responses either directly by inhibiting both TCR signaling and cytokine production[18] in effector T cells or indirectly via its expression on regulatory T cells (Treg).[19] Furthermore, PD-1 has been shown to regulate immune-mediated tissue injuries during viral infection,[20, 21] and its expression on peripheral blood lymphocytes correlates with CMV viremia in transplant patients.[22]

A G-to-A single-nucleotide polymorphism (SNP) at nucleotide 7809 (GenBank accession. AF363458) was recently described in intron 4 of the PD-1 gene and called PD-1.3 (rs11568821).[23] This substitution impairs the function of PD-1[24, 25] and has been reported to be associated with several autoimmune diseases such as lupus,[23] and multiple

sclerosis.[25] However, at our knowledge, only one study was reported about the impact of PD-1.3 on kidney graft outcome.[26]

In the study presented here, we report that PD-1.3 is strongly and independently associated with the occurrence of CMV infection in a cohort of 469 kidney graft recipients.

PATIENTS AND METHODS

Patients and study design

DNA samples from 469 patients were included in this study after obtaining signed informed consent. All had received a deceased-donor kidney transplantation at the University Hospital of Tours between 1995 and 2005. The population was divided into 2 groups according to the presence or absence of the G-to-A substitution and the occurrence of CMV infection was analyzed in each group for comparison.

Most patients (91%) had received quadruple sequential immunosuppression, including steroids, a calcineurin inhibitor, azathioprine/mycophenolate mofetil (MMF), and induction with either polyclonal antithymocyte globulins or anti-IL2R. Maintenance immunosuppressive therapy after the sixth month included a calcineurin inhibitor and azathioprine or MMF, with or without steroids.

All patients who were seronegative for CMV before the graft and who received a kidney from a seropositive donor (D^+/R^- ; n=104) received prophylaxis for CMV, but prophylaxis had to be prematurely withdrawn for 5 of these patients because of drug intolerance. In addition, 26 seropositive recipients also received prophylaxis for CMV in the context of study protocols. A total of 125 patients received CMV prophylaxis, 16 with acyclovir, 60 with valacyclovir, 10 with gancyclovir and 39 with valgancyclovir. The D^-/R^- patients (n=117) did not receive CMV prophylaxis. Finally, 222 patients who were seropositive for CMV prior to transplantation (R^+) did not receive any CMV prophylaxis after transplantation. Since the

whole population included patients who received drug prophylaxis for CMV and patients who were D^-/R^-, and in order to assess the association of PD-1.3 with the CMV exit from latency, we analyzed this latter subpopulation of 222 R^+ patients separately.

Diagnosis of CMV infection

Between 1995 and 2005, pp65 antigenemia was used to monitor CMV once a week during the first three months, then every 2 weeks during the next three months and once a year thereafter. CMV infection was defined by positive fluorescence for the pp65 antigen (Argene, Verniolle, France) in more than 2 nuclei among 150000 circulating leucocytes, within the first 6 months after transplantation. All data were recorded on the renal transplant clinical database in our center.

Characterization of PD-1.3 genotypes

Genomic DNA was extracted from blood samples using the QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. We used a restriction fragment length polymorphism method to characterize the SNP since the G-to-A substitution creates a *Pst*I restriction site. Briefly, forward primer 5'-CCAGGCAGCAACCTCAATC-3' and reverse primer 5'-GTCCCCCTCTGAAATGTCC-3' were used in the PCR to amplify a region of *PDCD1* containing the SNP. The PCR was performed in a Biorad MyCycler thermal cycler (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) using the following cycling pattern: initial hold at 95°C for 3 min; 35 cycles of 95°C for 30 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 30 sec; and a final extension step of 5 min at 72°C. Amplicons obtained (331 bp) were digested with 5 units of *Pst*I (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) for 1h40 at 37°C. After migration of digestion products on a 2% agarose gel, one 331-bp band corresponded to individuals without substitution (G/G), whereas two bands (276 and 55 bp)

corresponded to homozygotes for the substitution (A/A). Heterozygotes (G/A) presented the three bands. *GAPDH* gene amplification was used as an internal control in order to assess the efficiency of the *Pst*I digestion. A 607-bp region of the *GAPDH* gene containing a *Pst*I restriction site was amplified with 5'-GGCTGGATGGAATGAAAG-3' as forward primer and 5'-CCCTTACACGCTTGGATG-3' as reverse primer, and with following cycling pattern: initial hold at 95°C for 2 min; 35 cycles of 95°C for 20 sec, 55°C for 20 sec and 72°C for 30 sec; and a final extension step of 2 min at 72°C. Amplicons were digested with 5 units of *Pst*I and appeared as two bands (406 and 201 bp) on the agarose gel if digestion was complete.

In addition, we combined the analysis of PD-1.3 with that of the *IL12B* 3'UTR SNP which was recently reported to be associated with the risk of CMV infection. Genotyping of this SNP was carried out as previously described.[8]

Statistical analysis

Results were expressed in tables as means, standard deviations and percentages. We used chi-square and Mann-Whitney U tests when appropriate to compare baseline characteristics between PD-1.3 genotypes (presence or absence of the A allele). Then we used logistic regression to assess whether PD-1.3 was associated with CMV infection. We also used Cox regression as multivariate analysis to assess the independence of the relationship, adjusting the effect on all the other variables significantly associated with CMV infection in an univariate logistic regression analysis. Analyses were performed using XLSTAT 2007 (Addinsoft, Paris, France) and SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), with a p value < 0.05 considered as significant.

RESULTS

Distribution of PD-1.3 genotypes

Seventy-six percent of the 469 patients were homozygous G/G, 22% were heterozygous G/A and 2% were homozygous for the substitution (A/A), giving an A allele frequency of 12.9% (Table 1). The Hardy-Weinberg equilibrium was respected. The genotype distribution in the subpopulation of seropositive patients who did not receive CMV prophylaxis (n=222, Table 1) was not significantly different from that of the whole population (76% were G/G and 24% were A carriers, p=0.982; chi-square test).

Table 1. Distribution of PD-1.3 genotypes in kidney graft recipients.

Kidney graft recipients	Number tested	G/G N (%)	G/A N (%)	A/A N (%)	A allele frequency
Whole population	469	356 (76)	105 (22)	8 (2)	12.9%
CMV seropositive recipients without anti-CMV prophylaxis	222	168 (76)	51 (23)	3 (1)	12.8%

Baseline characteristics

The baseline characteristics of the two groups defined according to the presence or absence of the PD-1.3 A allele are shown in Table 2 for the 469 kidney recipients. No significant differences were observed regarding recipients' and donors' gender and age, cold ischemia time, HLA matching, anti-HLA immunization, graft rank or delayed graft function (DGF). No significant differences were found in terms of immunosuppressive regimen, especially polyclonal antibody induction, acute rejection or CMV prophylaxis. Importantly, the pregraft CMV serological status of recipients was not significantly different in the two groups (52%

were R^+ in the G/G group versus 56% in the A carriers, p=0.482). Similarly, matching between donors and recipients for CMV serological status was not significantly different (23% were D^+/R^- in the G/G group versus 19% in the A carriers, p=0.427). Finally, the distribution of the C allele of the *IL12B* 3'UTR SNP (a genotype recently reported to be associated with CMV infection) was not different in the two groups (39% vs 45%, p=0.229).

Table 2. Clinical data of 469 kidney graft recipients according to PD-1.3 genotype.

Clinical data [a]	PD-1.3 genotype		p [b]
	G/G N = 356	G/A & A/A N = 113	
Recipient age (years)	47 ± 14	49 ± 13	0.266
Recipient gender (female)	134 (38%)	44 (39%)	0.804
Donor age (years)	46 ± 15	47 ± 15	0.498
Donor gender (female)	135 (38%)	40 (35%)	0.629
Cold ischemia time (h)	20 ± 8	20 ± 7	0.967
HLA matching			
AB	1.0 ± 1.0	0.8 ± 0.9	0.103
DR	0.6 ± 0.7	0.6 ± 0.7	0.653
Graft rank >1	49 (14%)	9 (8%)	0.103
Anti-HLA immunization (positive)			
I	54 (15%)	14 (12%)	0.465
II	45 (13%)	13 (12%)	0.749
Induction treatment			
Antithymocyte globulins	208 (58%)	67 (59%)	0.871
Anti-IL2R	119 (33%)	36 (32%)	0.757
Immunosuppressive treatment			
Mycophenolate mofetil	291 (82%)	94 (83%)	0.727
Calcineurin inhibitors	343 (96%)	108 (96%)	0.709
Delayed graft function	65 (18%)	18 (16%)	0.572
Acute rejection in the first year	110 (31%)	29 (26%)	0.288
IL12B 3'UTR polymorphism genotype (C carriers)	138 (39%)	51 (45%)	0.229
CMV prophylaxis	97 (27%)	28 (25%)	0.605
CMV serological status before graft [c]			
D^+R^-	82 (23%)	22 (19%)	0.427
$D^{+/-}R^+$	185 (52%)	63 (56%)	0.482
D^-R^-	89 (25%)	28 (25%)	0.962

[a] Results are expressed as percentages and means ± standard deviation; [b] Chi-square test was used to compare categorical data and Mann-Whitney U test was used to compare numeric factors; [c] D/R

indicates donor/recipient and $^{+/-}$ indicates positive/negative CMV serological status before transplantation.

The PD-1.3 A allele as a risk factor for CMV infection

Univariate logistic regression analysis of the whole population showed that CMV infection occurred in 46% of the A carriers compared to 36% in the others (OR=1.38 [95% CI: 0.90-2.11], p=0.141, Table 3). Since the whole population included patients who received drug prophylaxis for CMV and patients who were D^-/R^-, we analyzed the subpopulation of seropositive patients who did not receive any CMV prophylaxis separately (n=222) and found that the A allele was significantly associated with CMV infection in this supopulation (74% vs 52%, OR=2.60 [95% CI: 1.32-5.13], p=0.006; Table 3). The median duration between transplantation and the first positive CMV antigenemia was 33 days for the A allele group compared to 37 for the other group (p=0.091).

In order to assess the risk of true CMV reactivation, we also analyzed the rates of CMV infection in the subgroup of seropositive patients who received an organ from seronegative donors (n = 130 patients). Interestingly, in those patients, the PD-1.3 A allele was also a significant risk factor of CMV reactivation (69% vs 46%, OR = 2.53, p = 0.024).

Table 3. Patients with CMV infection according to PD-1.3 genotype.

Populations	PD-1.3 genotype		Odds ratio [95% CI]	p [a]
	G/G	G/A & A/A		
Whole population N = 469	136 / 356 (38%)	52 / 113 (46%)	1.38 [0.90-2.11]	0.141
Subpopulation restricted to seropositive patients without CMV prophylaxis N = 222	88 / 168 (52%)	40 / 54 (74%)	2.60 [1.32-5.13]	0.006

CI: confidence interval.
[a] CMV infections were compared by logistic regression.

In order to carry out multivariate analysis, we analyzed whether other risk factors were significantly associated with CMV infection in this subgroup of seropositive patients without anti-CMV drug prophylaxis. Using univariate analysis, we found that the use of MMF, recipient age and the C allele of the *IL12B* 3'UTR SNP were significantly associated with CMV infection (Table 4). Treatment with antithymocyte globulins reached near significance (OR=1.6, [95% CI: 0.92-2.76], p=0.094, Table 4). Multivariate analysis after adjustment for these 4 parameters simultaneously showed that the A allele retained its significant effect on the occurrence of CMV infection (OR=2.54 [95% CI: 1.25-5.15], p=0.010; Table 4). The PD1.3 A allele was therefore identified as an independent risk factor for CMV infection in seropositive recipients without prophylaxis.

Table 4. Other risk factors for CMV infection in the subpopulation restricted to seropositive patients without CMV prophylaxis (n = 222) and multivariate analysis assessing the PD-1.3 A allele as an independent risk factor for CMV infection.

	Odds ratio	95% CI	*p*
Other potential risk factors for CMV infection [a]:			
Use of mycophenolate mofetil (yes/no)	3.06	1.39-6.71	0.005
Use of antithymocyte globulins (yes/no)	1.60	0.92-2.76	0.094
Acute rejection (yes/no)	1.20	0.80-1.79	0.377
Recipient age (per year)	1.02	1.00-1.05	0.032
IL12B 3'UTR C allele (yes/no)	1.91	1.10-3.30	0.021
Impact of the PD-1.3 A allele on CMV infection after adjustment for multiple parameters [b]	2.54	1.25-5.15	0.010

CI: confidence interval.
[a] The occurrence of CMV infection was compared between some parameters by logistic regression.
[b] Multiparameter analyses were performed by Cox regression multivariate analysis with adjustment for use of mycophenolate mofetil, use of antithymocyte globulins, recipient age and *IL12B* 3'UTR genotype simultaneously.

Combined analysis of PD1.3 and IL12B 3'UTR SNP in the risk of CMV infection

We have previously reported that the C allele of the *IL12B* 3'UTR SNP was associated with CMV infection[8] and, as PD-1.3 and *IL12B* SNPs are independent risk factors, we decided to carry out a combined analysis of PD-1.3 and *IL12B* 3'UTR SNP in the risk of CMV infection in the subpopulation of seropositive patients who did not receive CMV prophylaxis. We used logistic regression to compare different combinations of PD-1.3/*IL12B* 3'UTR genotypes. Interestingly, we found that the group with the PD-1.3 A allele, regardless of the *IL12B* allele, were at very high risk of CMV infection compared to patients with neither of the two risk alleles (74% vs 43%, OR=3.76 [95% CI: 1.83-7.76], p=0.0003; Table 5). It is of note that patients without the PD-1.3 A allele but with the 3'UTR C allele had an intermediate risk of CMV infection compared to patients having neither of the two risk alleles (64% vs 43%, OR=2.38 [95% CI: 1.28-4.44], p=0.006; Table 5).

Table 5. Patients with CMV infection according to PD-1.3 genotype in combination with the *IL12B* A/C 3'UTR polymorphism.

Populations	. PD-1.3 genotype . *IL12B* 3'UTR genotype . PD-1.3 G/G . 3'UTR A/A	. PD-1.3 G/G . 3'UTR C	PD-1.3 A carriers	OR[a] [95% CI] (p value)	OR[b] [95% CI] (p value)
CMV seropositive recipients without prophylaxis N=222	41 / 95 (43%)	47 / 73 (64%)	40 / 54 (74%)	2.38 [1.28-4.44] (p = 0.006)	3.76 [1.83-7.76] (p = 0.0003)

CI: confidence interval.
Logistic regression was used to compare CMV infections between patients having neither risk allele (first column) and [a] patients with the PD-1.3 G/G genotype and the *IL12B* 3'UTR C allele (second column) or [b] patients with the PD-1.3 A allele independently of 3'UTR genotype (third column).

DISCUSSION

In this study we investigated the association between an SNP in the PD-1 gene (PD-1.3, rs11568821) and the occurrence of CMV infection in kidney transplant patients. First we found that the frequency of this SNP in kidney transplant patients was similar to the frequency reported by others in healthy Caucasian populations.[27] This suggests that kidney disease leading to transplantation is not associated with PD-1.3 genotype. Multivariate analysis adjusted on several other risk factors for CMV infection revealed an independent association between PD-1.3 SNP and CMV infection in CMV-seropositive recipients who did not receive CMV prophylaxis. It should be noted that we were not able to assess reliably the association between PD-1.3 and the occurrence of CMV disease since only 13 patients developed symptomatic CMV infection, probably because of the early pre-emptive strategy adopted in our center.

The results of this study address the question of the pathogenic link between the polymorphism of the PD-1 gene and CMV reactivation. Very few studies have analyzed the effects of PD-1.3 on the function of the protein. It has been reported that the A allele could impair the PD-1 inhibitory effect,[24, 25] as the substitution disrupts binding of the Runx1 transcription factor. Factors governing CMV reactivation are still under intensive investigation. CMV reactivation has been reported during inflammatory diseases in non-immunosuppressed patients[9, 10] and previous studies have shown that the transcription factor NF-kappaB is a key mediator of TNF-alpha- and IE1-dependent stimulation of the CMV IE1/2 enhancer/promoter activity, which is crucial for initiation of viral gene expression during reactivation from latency as well as for productive infection.[12] These findings together support the hypothesis that an ongoing immune response might promote viral reactivation. Therefore, a defect in the negative regulation of effector T cells in PD-1.3 A

allele carriers might increase inflammatory mediators during the early immune events after transplantation, which might increase the likelihood of CMV reactivation. Alternatively, a modified expression of PD-1 on regulatory T cells (Treg) might contribute to the risk of virus reactivation. Indeed, several studies have shown that increased Treg activity might promote chronic infections with HCV or HIV [28]. In addition, a recent study reported that PD-1 upregulation decreased both the function and the expansion of Treg in HCV infected patients.[19] Therefore a decreased expression of PD-1 on Treg might favor Treg function and promote CMV chronic infection. However, the role of Treg in the management of CMV is poorly understood. Analyzing the impact of PD-1.3 on the production of viral particles during an alloreactive response in an MLR (mixed lymphocyte reaction) assay might help to understand the functional relevance of this polymorphism and to establish a causal relationship.

Since the strategy of CMV prevention in R^+ recipients is still not firmly established, unraveling genetic risk factors associated with CMV reactivation might provide opportunities to test genetically-targeted prophylaxis strategies. We have previously reported that a SNP localized in the 3'UTR region of the IL-12p40 gene is associated with CMV reactivation.[8] As PD-1.3 and *IL12B* 3'UTR SNP were independent risk factors, we carried out a combined analysis of the impact of these two SNP on the risk of CMV reactivation. This analysis allowed us to stratify the R^+ population into 3 groups having significantly different risks of CMV infection (low, intermediate and high). These results suggest that further exploring genetic risk factors of CMV infection might help to optimize the ratio benefit/ risk of drug prophylaxis. The two major options are universal prophylaxis and pre-emptive therapy. Each approach has advantages and disadvantages in terms of efficacy, costs, and side effects.[29, 30] If prevention of antigenemia is the main goal, and assuming that the odds ratios would be confirmed by other studies, simulations could be designed to evaluate a genetically-targeted

prophylaxis strategy. For example a model in which drug prophylaxis would be provided only to seropositive patients with the PD-1.3 A allele (the group with the highest risk of CMV reactivation), while G/G patients would receive pre-emptive therapy. This hypothetical genetic model would reduce the number of CMV infections by 35% compared to a pre-emptive strategy, while increasing the number of patients who would receive anti-viral drugs by only 10%. Furthermore, compared to universal prophylaxis, the genetics-based strategy would reduce the number of useless treatments by 80%. However, it remains to be established whether antigenemia is a sensitive and specific marker of chronic indirect effects of CMV on the graft itself. Several studies have supported the concept of local microinfection that might have an important role in promoting vascular inflammatory damages.[31] In this respect, it is possible that the strength of the recipient's immune response elicited by the CMV might be more important than antigenemia itself for the outcome of the graft. It would therefore be interesting to evaluate how PD-1.3 A carriers deal with any chronic effects associated with CMV.

In conclusion, this study identified an association between CMV infection in seropositive patients after kidney transplantation and the PD-1.3 SNP, which suggests that adjustment of CMV prophylaxis based on genetic markers calls for further investigation.

Acknowledgments: The authors thank all the staff of the Nephrology and Clinical Immunology Department and the Bacteriology-Virology Department of the CHRU of Tours. The authors also thank the Etablissement Français du Sang (EFS) Centre-Atlantique for DNA samples, Professor Tarik Sqalli Houssaini for CMV data, and Doreen Raine for editing the English language.

Funding: This work was supported by grants from the Société Francophone de Transplantation and Vaincre La Mucoviscidose.

Competing interests: none (all authors).

Patient consent: obtained.

The Corresponding Author has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, an exclusive licence (or non-exclusive for government employees) on a worldwide basis to the BMJ Publishing Group Ltd and its Licensees to permit this article (if accepted) to be published in Journal of Medical Genetics and any other BMJPGL products to exploit all subsidiary rights, as set out in our licence.

REFERENCES

1 Brennan DC. Cytomegalovirus in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2001;**12**:848-55.

2 Humar A, Gillingham KJ, Payne WD, Dunn DL, Sutherland DE, Matas AJ. Association between cytomegalovirus disease and chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1999;**68**:1879-83.

3 Hussain T, Burch M, Fenton MJ, Whitmore PM, Rees P, Elliott M, Aurora P. Positive pretransplantation cytomegalovirus serology is a risk factor for cardiac allograft vasculopathy in children. *Circulation* 2007;**115**:1798-805.

4 Lautenschlager I, Soots A, Krogerus L, Kauppinen H, Saarinen O, Bruggeman C, Ahonen J. Effect of cytomegalovirus on an experimental model of chronic renal allograft rejection under triple-drug treatment in the rat. *Transplantation* 1997;**64**:391-8.

5 Puius YA, Snydman DR. Prophylaxis and treatment of cytomegalovirus disease in recipients of solid organ transplants: current approach and future challenges. *Curr Opin Infect Dis* 2007;**20**:419-24.

6 Sagedal S, Hartmann A, Rollag H. The impact of early cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients. *Clin Microbiol Infect* 2005;**11**:518-30.

7 Khoury JA, Storch GA, Bohl DL, Schuessler RM, Torrence SM, Lockwood M, Gaudreault-Keener M, Koch MJ, Miller BW, Hardinger KL, Schnitzler MA, Brennan DC. Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2006;**6**:2134-43.

8 Hoffmann TW, Halimi JM, Buchler M, Velge-Roussel F, Goudeau A, Najjar AA, Boulanger MD, Houssaini TS, Marliere JF, Lebranchu Y, Baron C. Association

between a polymorphism in the IL-12p40 gene and cytomegalovirus reactivation after kidney transplantation. *Transplantation* 2008;**85**:1406-11.

9 Asadullah K, Prosch S, Audring H, Buttnerova I, Volk HD, Sterry W, Docke WD. A high prevalence of cytomegalovirus antigenaemia in patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis: an association with systemic tumour necrosis factor alpha overexpression. *Br J Dermatol* 1999;**141**:94-102.

10 Heininger A, Jahn G, Engel C, Notheisen T, Unertl K, Hamprecht K. Human cytomegalovirus infections in nonimmunosuppressed critically ill patients. *Crit Care Med* 2001;**29**:541-7.

11 Söderberg-Nauclér C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 1997;**91**:119-26.

12 Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2006;**87**:1763-79.

13 Lafarge X, Merville P, Cazin MC, Berge F, Potaux L, Moreau JF, Dechanet-Merville J. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* 2001;**184**:533-41.

14 Lee SH, Webb JR, Vidal SM. Innate immunity to cytomegalovirus: the Cmv1 locus and its role in natural killer cell function. *Microbes Infect* 2002;**4**:1491-503.

15 Presti RM, Pollock JL, Dal Canto AJ, O'Guin AK, Virgin HWt. Interferon gamma regulates acute and latent murine cytomegalovirus infection and chronic disease of the great vessels. *J Exp Med* 1998;**188**:577-88.

16 Hummel M, Zhang Z, Yan S, DePlaen I, Golia P, Varghese T, Thomas G, Abecassis MI. Allogeneic transplantation induces expression of cytomegalovirus immediate-early genes in vivo: a model for reactivation from latency. *J Virol* 2001;**75**:4814-22.

17 Kim SJ, Varghese TK, Zhang Z, Zhao LC, Thomas G, Hummel M, Abecassis M. Renal ischemia/reperfusion injury activates the enhancer domain of the human cytomegalovirus major immediate early promoter. *Am J Transplant* 2005;**5**:1606-13.

18 Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 2007;**8**:239-45.

19 Franceschini D, Paroli M, Francavilla V, Videtta M, Morrone S, Labbadia G, Cerino A, Mondelli MU, Barnaba V. PD-L1 negatively regulates CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest* 2009;**119**:551-64.

20 Benedict CA, Loewendorf A, Garcia Z, Blazar BR, Janssen EM. Dendritic cell programming by cytomegalovirus stunts naive T cell responses via the PD-L1/PD-1 pathway. *J Immunol* 2008;**180**:4836-47.

21 Maier H, Isogawa M, Freeman GJ, Chisari FV. PD-1:PD-L1 interactions contribute to the functional suppression of virus-specific CD8+ T lymphocytes in the liver. *J Immunol* 2007;**178**:2714-20.

22 Sester U, Presser D, Dirks J, Gartner BC, Kohler H, Sester M. PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus- specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *Am J Transplant* 2008;**8**:1486-97.

23 Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, Brookes AJ, Tentler D, Kristjansdottir H, Grondal G, Bolstad AI, Svenungsson E, Lundberg I, Sturfelt G, Jonssen A, Truedsson L, Lima G, Alcocer-Varela J, Jonsson R,

Gyllensten UB, Harley JB, Alarcon-Segovia D, Steinsson K, Alarcon-Riquelme ME. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 2002;**32**:666-9.

24 Bertsias GK, Nakou M, Choulaki C, Raptopoulou A, Papadimitraki E, Goulielmos G, Kritikos H, Sidiropoulos P, Tzardi M, Kardassis D, Mamalaki C, Boumpas DT. Genetic, immunologic, and immunohistochemical analysis of the programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009;**60**:207-18.

25 Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Maurer M, Wiendl H. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2005;**58**:50-7.

26 Haimila K, Turpeinen H, Alakulppi NS, Kyllonen LE, Salmela KT, Partanen J. Association of genetic variation in inducible costimulator gene with outcome of kidney transplantation. *Transplantation* 2009;**87**:393-6.

27 Ferreiros-Vidal I, D'Alfonso S, Papasteriades C, Skopouli FN, Marchini M, Scorza R, Migliaresi S, Sebastiani GD, Endreffy E, Mavromati M, Kappou-Rigatou I, Ruzickova S, Dostal C, Schmidt RE, Witte T, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe. *Genes Immun* 2007;**8**:138-46.

28 Mellor AL, Munn DH. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nat Rev Immunol* 2008;**8**:74-80.

29 Fishman JA, Emery V, Freeman R, Pascual M, Rostaing L, Schlitt HJ, Sgarabotto D, Torre-Cisneros J, Uknis ME. Cytomegalovirus in transplantation - challenging the status quo. *Clin Transplant* 2007;**21**:149-58.

30 Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *J Clin Virol* 2006;**35**:474-7.

31 Soderberg-Naucler C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med* 2006;**259**:219-46.

III. Etude des autres événements cliniques et des SNP *IL12B* 3'UTR et PD-1.3.

Nous avons étudié l'impact des 2 polymorphismes sur 3 autres événements cliniques fréquents suite à une transplantation rénale : le rejet aigu dans la première année post-transplantation, le DGF et le cancer de la peau. Ces résultats ont donné lieu à un manuscrit soumis à *Clinical Transplantation* en août 2009, dont une traduction en français est présentée ci-dessous (le pdf du manuscrit en anglais est dans l'Annexe 3).

Nous avons également testé l'association entre le SNP *IL12B* 3'UTR et la survie du greffon, ainsi que celle du patient.

III.1. Organisation de l'étude.

Cette étude concerne une population consécutive de 834 patients transplantés rénaux entre 1985 et 2005 au CHRU de Tours, les patients ayant perdu précocement leur greffon (dans les 4 premiers jours post-transplantation) n'ayant pas été inclus dans cette cohorte. La plupart des patients ont reçu une immunosuppression initiale qui associait des glucocorticoïdes, un anti-calcineurine, l'azathioprine ou le MMF, et une induction avec de l'ATG ou de l'anti-IL-2R. Le traitement immunosuppresseur de maintenance, après le sixième mois, inclut un anti-calcineurine ainsi que de l'azathioprine ou du MMF, avec ou sans des glucocorticoïdes. Nous avons génotypé ces patients avec la méthode RFLP (voir partie précédente)

Les données cliniques de chaque patient ont été obtenues à partir de la base de données du service, avec le 31 décembre 2007 comme date de fin d'observation. Le DGF est défini par une dialyse au cours de la première semaine post-opératoire. Les épisodes de rejet aigu dans la première année post-transplantation sont quant à eux déterminés par diagnostic clinique (élévation du taux de créatinine sérique de plus de 20% par rapport au taux de base), avec une confirmation par biopsie selon la classification de Banff, et ne concernent que les receveurs ayant conservé leur greffon au moins 1 an (n = 801). La survie du greffon, du patient ainsi que la survie à l'événement « cancer de la peau après transplantation rénale » sont calculées avec le modèle de Kaplan-Meier, qui fournit entre autres la survie moyenne du greffon (ou

« espérance de vie » du greffon) au sein de chaque groupe. Nous avons considéré la perte du greffon de 2 façons : soit il s'agit du retour en dialyse ou de la mort du patient avec greffon fonctionnel, on étudie alors la survie globale du greffon ; soit il s'agit strictement du retour en dialyse et dans ce cas on étudie la survie du greffon avec mort censurée.

Nous avons utilisé le test du Chi2 pour comparer la survenue du DGF et du rejet aigu entre les génotypes (présence ou absence de l'allèle variant), ainsi que le test du log-rank pour comparer les différentes survies étudiées. Un *p* inférieur à 0,05 est considéré comme significatif.

III.2. Résultats et discussion.

III.2.1. Distribution des génotypes et caractéristiques de base des patients.

Sur les 834 patients de notre population, pour *IL12B* 3'UTR, 58% sont homozygotes commun (A/A), 37% sont hétérozygotes (A/C) et 5% sont homozygotes variants (C/C), ce qui donne une fréquence de l'allèle variant C de 24% environ (Tableau 5). En ce qui concerne PD-1.3, 75% sont homozygotes commun (G/G), 23% sont hétérozygotes (G/A) et 2% sont homozygotes variants (A/A), la fréquence de l'allèle variant A étant de 13% environ (Tableau 5). L'équilibre de Hardy-Weinberg est respecté pour les 2 SNP. La fréquence des allèles variant 3'UTR C et PD-1.3 A est similaire à celle rapportée dans d'autres études chez des contrôles sains caucasiens (Ferreiros-Vidal *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2004), ce qui suggèrerait que les 2 SNP ne sont pas associés aux maladies rénales menant à la transplantation.

Tableau 5. Distribution des génotypes d'*IL12B* 3'UTR et PD-1.3 chez 834 transplantés rénaux.

	Génotypes *IL12B* 3'UTR				Génotypes PD-1.3			
	A/A	A/C	C/C	Fréquence de l'allèle C	G/G	G/A	A/A	Fréquence de l'allele A
834 transplantés rénaux	479 (58%)	312 (37%)	43 (5%)	24%	630 (75%)	191 (23%)	13 (2%)	13%

Une fois la distribution des génotypes connue et pour chacun des 2 SNP, nous avons séparé les patients en 2 groupes suivant la présence ou l'absence de l'allèle variant et nous les avons comparés concernant les principales caractéristiques cliniques de base (Tableau 6).

Tableau 6. Caractéristiques cliniques de base de 834 transplantés rénaux en fonction d'*IL12B* 3'UTR et PD-1.3.

Données cliniques [a]	Génotype *IL12B* 3'UTR			Génotype PD-1.3		
	A/A N = 479	A/C et C/C N = 355	*p* [b]	G/G N = 630	G/A et A/A N = 204	*p* [b]
Temps d'observation (mois)	96 ± 66	97 ± 59	0,420	95 ± 64	100 ± 62	0,216
Age du receveur (années)	44 ± 15	45 ± 15	0,320	44 ± 15	45 ± 15	0,559
Sexe du receveur (femmes)	177 (37%)	135 (38%)	0,751	229 (36%)	83 (41%)	0,266
Age du donneur (années)	40 ± 16	42 ± 16	0,106	41 ± 16	40 ± 17	0,614
Sexe du donneur (femmes)	162 (34%)	131 (37%)	0,357	228 (36%)	65 (32%)	0,260
Maladie initiale						
Diabète	18 (4%)	19 (5%)	0,269	31 (5%)	6 (3%)	0,233
Glomérulopathie	83 (17%)	54 (15%)	0,415	111 (18%)	26 (13%)	0,102
Néphropathie à IgA	52 (11%)	35 (10%)	0,641	61 (10%)	26 (13%)	0,214
Autres	258 (54%)	187 (53%)	0,734	342 (54%)	103 (50%)	0,345
Temps d'ischémie froide (h)	22 ± 8	21 ± 9	0,131	22 ± 8	22 ± 8	0,273
Incompatibilité HLA						
AB	2,7 ± 1,0	2,7 ± 1,0	0,586	2,7 ± 1,0	2,8 ± 1,0	0,470
DR	1,2 ± 0,7	1,2 ± 0,7	0,780	1,2 ± 0,7	1,3 ± 0,7	0,783
Rang de greffe >1	47 (10%)	43 (12%)	0,290	71 (11%)	19 (9%)	0,434
Immunisation anti-HLA positive						
I	82 (17%)	58 (16%)	0,765	109 (17%)	31 (15%)	0,484
II	77 (16%)	36 (10%)	0,013	85 (13%)	28 (14%)	0,933
Traitement d'induction						
ATG	332 (69%)	252 (71%)	0,602	441 (70%)	143 (70%)	0,979
Anti-IL-2R	108 (23%)	75 (21%)	0,624	140 (22%)	43 (21%)	0,732
Traitement immunosuppresseur						
MMF	280 (58%)	197 (55%)	0,393	363 (58%)	114 (56%)	0,663
Anti-calcineurines	465 (97%)	342 (96%)	0,551	612 (97%)	195 (96%)	0,276

[a] Les données cliniques sont présentées en pourcentages ou en moyennes ± écarts-type. [b] Nous avons utilisé le test du Chi2 pour comparer les paramètres non-continus et le test de Mann-Whitney pour les paramètres continus.

Pour les 2 SNP, nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les 2 groupes génotypiques concernant les principales données de pré-greffe telles que l'âge du receveur et

du donneur, le sexe du receveur et du donneur, les maladies initiales, le temps d'ischémie froide, l'incompatibilité HLA, le rang de greffe et l'immunisation anti-HLA. Il apparaît toutefois qu'il y a moins d'immunisation anti-HLA II chez les porteurs de l'allèle 3'UTR C (10% contre 16%, $p = 0,013$). De plus, nous n'avons également pas pu montrer de différence entre les 2 groupes concernant les principales caractéristiques post-transplantation, telles que le traitement immunosuppresseur et le temps d'observation.

III.2.2. Les polymorphismes *IL12B* 3'UTR et PD-1.3 ne sont pas associés avec le rejet aigu, le DGF et le cancer de la peau.

Nous avons testé l'influence des SNP *IL12B* 3'UTR et PD-1.3 sur le rejet aigu, le DGF et le cancer de la peau, chez 834 transplantés rénaux. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'association entre ces polymorphismes et la survenue du rejet aigu dans la première année post-transplantation ($p = 0,954$ et 0,820 respectivement ; Tableau 7), ou du DGF ($p = 0,484$ et 0,193 respectivement ; Tableau 7). De même, les courbes de survie à l'événement cancer de la peau n'ont pas montré de différence significative entre les 2 groupes (Figure 14), que ce soit pour *IL12B* 3'UTR ($p = 0,557$) ou pour PD-1.3 ($p = 0,546$).

Tableau 7. Survenue du DGF et du rejet aigu en fonction d'*IL12B* 3'UTR et de PD-1.3.

Evénement clinique	Génotype *IL12B* 3'UTR		Génotype PD-1.3		Odds ratio [a] [IC 95%]	p [a]	Odds ratio [b] [IC 95%]	p [b]
	A/A	A/C et C/C	G/G	G/A et A/A				
DGF (n = 834)	91 / 479 (19%)	68 / 355 (19%)	119 / 630 (19%)	40 / 204 (20%)	1,01 [0,71-1,43]	0,954	1,05 [0,70-1,56]	0,820
Rejet aigu à 1 an (n = 801)	133 / 457 (29%)	108 / 344 (31%)	189 / 604 (31%)	52 / 197 (26%)	1,12 [0,82-1,51]	0,484	0,79 [0,55-1,13]	0,193

IC : intervalle de confiance. Pour *IL12B* 3'UTR ([a]) et PD-1.3 ([b]), la fréquence du DGF (pour « Delayed Graft Function », défini par une dialyse dans la 1ère semaine post-opératoire) et du rejet aigu dans la première année a été comparée entre les porteurs de l'allèle variant et les non-porteurs avec le test du Chi2.

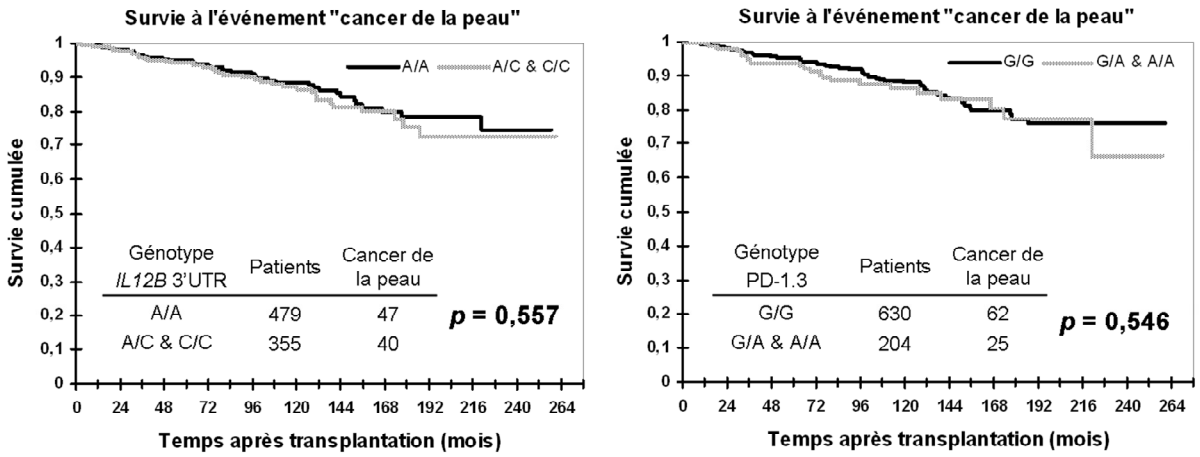


Figure 14. Survie à l'événement « cancer de la peau » en fonction des SNP *IL12B* 3'UTR et PD-1.3 chez 834 transplantés rénaux.
Pour *IL12B* 3'UTR (à gauche) et PD-1.3 (à droite), nous avons établi les courbes de survie avec une analyse de Kaplan-Meier et comparé par un test de log-rank les porteurs de l'allèle variant (C ou A, courbe grise) avec les non-porteurs (A/A ou G/G, courbe noire). Les effectifs au sein des groupes génotypiques et le nombre de cancers de la peau correspondants sont également indiqués.

Les résultats sur le rejet aigu et le DGF confirment ce que nous avions déjà observé pour *IL12B* 3'UTR dans une étude préliminaire concernant une petite partie des 834 patients (Hoffmann *et al.*, 2009b). Mise à part cela, il s'agit de la première étude rapportée sur ce polymorphisme et les 3 événements cliniques cités plus haut, donc il n'y a pas de comparaison possible. Cependant, notre cohorte fait partie des plus grandes en transplantation rénale, ce qui lui confère une certaine fiabilité. En ce qui concerne PD-1.3, il s'agit de la première étude rapportée sur le cancer de la peau, mais une autre équipe a déjà publié des résultats sur le rejet aigu et le DGF (Haimila *et al.*, 2009), que les nôtres viennent confirmer. Nos résultats peuvent avoir de l'importance car, s'il est vrai qu'il y a un grand nombre d'études génétiques sur le rejet aigu, très peu d'études concernent le polymorphisme génétique du receveur dans des gènes de l'immunité et le DGF (Haimila *et al.*, 2009; Kamoun *et al.*, 2008) ou le cancer de la peau (Alamartine *et al.*, 2003). Il serait donc très intéressant de mener des études combinées de plusieurs polymorphismes dans le même gène (haplotypes) ou dans des gènes différents afin de mettre en évidence plus facilement des marqueurs du devenir du greffon.

L'ensemble de ces résultats donne lieu à un manuscrit que nous avons récemment soumis dans *Clinical Transplantation*.

III.2.3. *IL12B* 3'UTR n'est pas associé à la survie du greffon rénal ou du patient.

Parallèlement, nous avons comparé la survie du greffon rénal (survie globale ou avec mort censurée) entre les porteurs de l'allèle C (n = 355) et les non-porteurs (n = 479). L'analyse de Kaplan-Meier n'a pas pu mettre en évidence de différence significative de survie du greffon entre les porteurs de l'allèle C et les non-porteurs, que la mort soit censurée (197 ± 6 mois contre 196 ± 5, p = 0,515 ; Figure 15) ou pas (176 ± 6 mois contre 178 ± 5, p = 0,722 ; Figure 15). De même, *IL12B* 3'UTR ne semble pas être associé à la survie du patient (217 ± 6 mois contre 225 ± 4, p = 0,746 ; Figure 15).

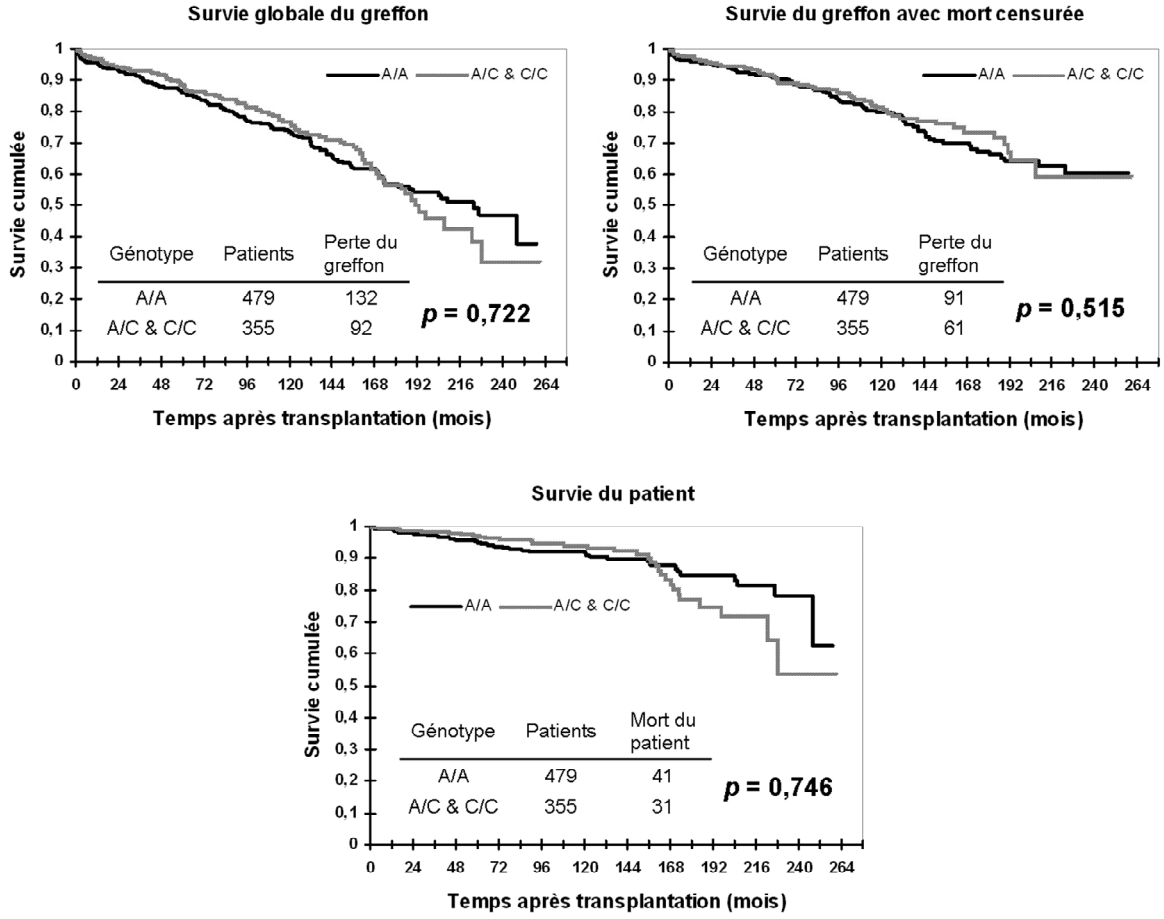


Figure 15. Survie du greffon et du patient en fonction du SNP *IL12B* 3'UTR chez 834 transplantés rénaux.
Nous avons établi les courbes de survie avec une analyse de Kaplan-Meier et comparé par un test de log-rank les survies des porteurs de l'allèle C (A/C & C/C, courbe grise) avec celles des non-porteurs (A/A, courbe noire). Nous avons étudié la survie globale du greffon (en haut à gauche), la survie du greffon avec mort censurée (en haut à droite), ainsi que la survie du patient (en bas). Les effectifs au sein des 2 groupes génotypiques et le nombre de pertes ou de morts correspondants sont également indiqués.

Il semble donc que, malgré son association avec l'infection à CMV, ce SNP n'ait pas d'influence sur la survie du greffon, comme le laissait entendre l'absence d'association avec le rejet aigu et le DGF (voir Tableau 7). L'augmentation du risque d'infection à CMV pourrait être trop faible (OR = 1,52) pour avoir un impact sur la survie du greffon ou alors l'antigénémie à CMV pourrait avoir un trop faible impact sur la survie du greffon dans notre centre, voire ne pas en avoir. Il s'agit de la première étude rapportée d'association entre *IL12B* 3'UTR et la survie du greffon en transplantation rénale, mais le fait qu'elle concerne un grand nombre de patients (834) lui confère une certaine fiabilité.

De même, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'association entre le SNP et la survie du patient, mais on peut remarquer un important décrochement entre les 2 courbes de survie après 168 mois, où les porteurs de l'allèle C semblent survivre moins bien. D'ailleurs, il est apparu d'après l'analyse de Kaplan-Meier que les centiles 25% de morts étaient de 185 mois pour les porteurs de C et 248 mois pour les autres patients, ce qui signifie que la mort de 25% des patients a été observée 5 ans plus tôt dans le groupe des porteurs de C. De plus, cette même analyse, associée à un test du Chi2, a montré que la survie du patient à 15 ans post-transplantation et à 20 ans était significativement plus faible pour le groupe des porteurs de l'allèle C par rapport à l'autre groupe (77,1% contre 84,5%, OR = 1,62, p = 0,007, et 53,8% contre 78,1%, OR = 3,06, p < 0,0001, respectivement). *IL12B* 3'UTR pourrait donc intervenir sur la survie à long terme du patient, potentiellement via son association avec l'infection à CMV, mais pas via le cancer de la peau (une cause majeure de mort du patient) vu les résultats de la partie précédente (voir Figure 14). Nous envisageons donc à cours terme de constituer une cohorte de patients ayant survécu longtemps après transplantation rénale (au moins 15 ans) afin de confirmer ces résultats.

IV. PD-1.3 et survie du greffon (manuscrit en cours de rédaction).

Nous avons testé l'association de PD-1.3 avec la survie du greffon dans une population consécutive de 834 patients transplantés rénaux. Rappelons que nous n'avons pas mis en évidence d'association entre ce SNP et le rejet aigu ou le DGF (voir III), bien que ces évènements soient de puissants facteurs de risque de perte du greffon (Halloran et al., 1988; Lindholm et al., 1993; Whittaker et al., 1973). Cependant d'autres facteurs peuvent influencer la survie du greffon, comme l'exposition au risque de réplication du CMV (Humar *et al.*, 1999; Hussain *et al.*, 2007; Lautenschlager *et al.*, 1997; Potena *et al.*, 2006; Sagedal *et al.*, 2005). Par ailleurs, nos résultats antérieurs suggèrent que PD-1.3 joue un rôle dans le rapport entre l'hôte et le virus CMV (Hoffmann *et al.*, 2009a). Cependant les mécanismes précis de l'action du CMV sur la fonction des greffons sont encore partiellement incompris et l'approche clinique pour mesurer l'impact du CMV reste incomplète.

Dans ce manuscrit, nous rapportons que l'allèle A de PD-1.3 est associé à une meilleure survie du greffon rénal et que cet effet est lié à l'exposition au CMV.

IV.1. Patients et méthodes.

Cette étude a été menée sur une population consécutive de 834 patients transplantés rénaux entre 1985 et 2005, dont les caractéristiques cliniques ont été décrites précédemment (voir III.1 et III.2.1).

Par ailleurs, nous avons génotypé le SNP PD-1.3 chez ces patients avec la méthode RFLP, comme cela a été décrit précédemment (voir les méthodes de génotypage, p. 58). Nous avons ensuite divisé les patients en 2 groupes selon la présence (n = 204) ou l'absence (n = 620) de l'allèle variant A.

Pour chacun des 2 groupes de patients, la survie du greffon et celle du patient ont été calculées à l'aide du modèle de Kaplan-Meier, qui fournit entre autres la survie moyenne du

greffon (ou « espérance de vie » du greffon), et nous les avons comparées entre les groupes avec le test du log-rank. Nous avons considéré la perte du greffon de 2 façons : soit il s'agit du retour en dialyse ou de la mort du patient avec greffon fonctionnel, on étudie alors la survie globale du greffon ; soit il s'agit strictement du retour en dialyse et dans ce cas on étudie la survie du greffon avec mort censurée. Par ailleurs, lorsque cela s'avérait nécessaire, nous avons comparé le risque de perte du greffon entre les 2 groupes de patients par une régression de Cox.

IV.2. Résultats

IV.2.1. L'allèle A est un facteur protecteur indépendant contre la perte du greffon

Après avoir vérifié que les caractéristiques de base des patients n'étaient pas différentes entre les 2 groupes définis par la présence (n = 204) ou l'absence (n = 630) de l'allèle variant A (Tableau 6), les courbes de survie ont montré que les porteurs de l'allèle A avaient une meilleure survie du greffon avec mort censurée que les autres patients (219 ± 7 mois contre 192 ± 4, $p = 0,019$; Figure 16). En revanche, pour la survie globale, la tendance est la même mais n'atteint pas la significativité statistique (191 ± 7 mois contre 174 ± 4, $p = 0,091$; Figure 16). Par ailleurs, il n'y a pas d'effet statistiquement significatif du SNP sur la survie du patient (225 ± 7 mois contre 223 ± 4, $p = 0,650$; Figure 16), ce qui explique certainement pourquoi l'association avec la survie globale du greffon n'est pas significative.

De plus, les centiles 25% de perte du greffon avec mort censurée (délai après lequel 25% des patients sont retournés en dialyse) sont de 192 mois pour les porteurs de A contre 132 mois pour les autres. Notons aussi que la survie à 10 ans du greffon avec mort censurée est significativement supérieure pour ce même groupe par rapport à l'autre groupe (86,7% contre 78,6%, OR = 1,79, $p = 0,010$).

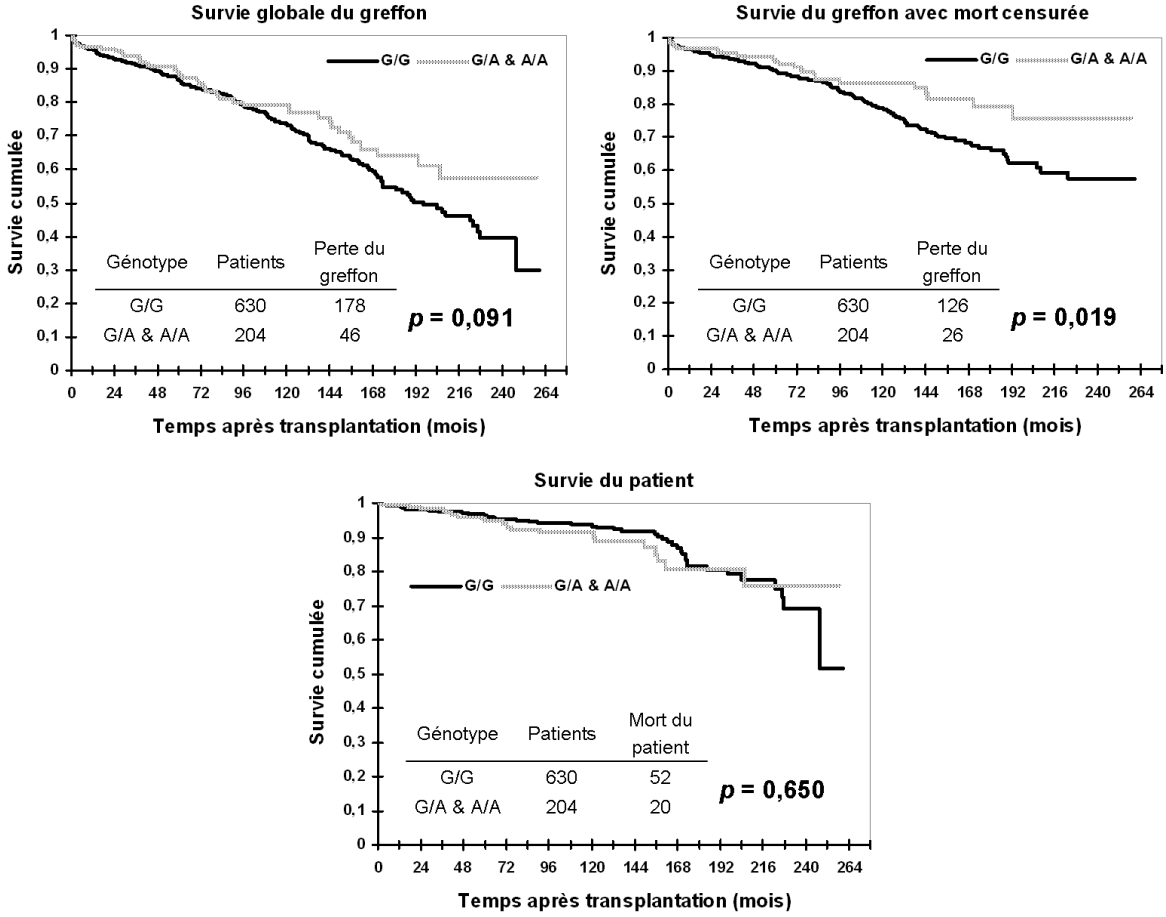


Figure 16. Survie du greffon et du patient en fonction du SNP PD-1.3 chez 834 transplantés rénaux.
Nous avons établi les courbes de survie avec une analyse de Kaplan-Meier et comparé par un test de log-rank les survies des porteurs de l'allèle A (G/A & A/A, courbe grise) avec celles des non-porteurs (G/G, courbe noire). Nous avons étudié la survie globale du greffon (en haut à gauche), la survie du greffon avec mort censurée (en haut à droite), ainsi que la survie du patient (en bas). Les effectifs au sein des 2 groupes génotypiques et le nombre de pertes ou de morts correspondants sont également indiqués.

Suite à ces résultats, nous nous sommes tout particulièrement intéressés au retour en dialyse des patients. A l'aide d'une analyse univariée en régression de Cox, nous avons montré que l'allèle A était un facteur protecteur contre le retour en dialyse (OR = 0,61, p = 0,020 ; Tableau 8), les porteurs de A ayant ainsi près de 2 fois moins de risque de présenter cet événement. Par ailleurs, dans une analyse multivariée et après ajustement sur d'autres facteurs influençant la survie du greffon (le rejet aigu, l'âge du receveur, le sexe du donneur, le rang de greffe, le DGF, l'utilisation de l'ATG et l'immunisation anti-HLA I avant la transplantation), l'association significative de PD-1.3 avec la perte du greffon est maintenue (OR = 0,59, p = 0,020 ; Tableau 8).

Tableau 8. L'allèle A de PD-1.3 est un facteur protecteur indépendant contre la perte du greffon avec mort censurée.

Analyse	Régression de Cox	Odds ratio [95% IC]	*p* [a]
Porteurs de PD-1.3 A	Univariée	0,61 [0,40-0,93]	0,020
contre Non porteurs	Multivariée : ajustement sur plusieurs paramètres simultanément [b]	0,59 [0,38-0,92]	0,020

IC : intervalle de confiance. [a] Nous avons utilisé la régression de Cox pour comparer le risque de perte du greffon chez 834 transplantés rénaux entre les porteurs de l'allèle variant A (G/A ou A/A) et les non porteurs (G/G). [b] L'analyse multivariée s'est effectuée en ajustant simultanément sur le rejet aigu, l'âge du receveur, le sexe du donneur, le rang de greffe, le DGF, l'utilisation de l'ATG et l'immunisation anti-HLA I avant la transplantation.

L'ajustement a été fait sur des critères qui sont localement significativement associés à une meilleure survie de greffon (Tableau 9): le rejet aigu, l'âge du receveur, le sexe du donneur, le rang de greffe, le DGF, l'utilisation de l'ATG et l'immunisation anti-HLA I avant la transplantation.

Tableau 9. Autres paramètres pouvant affecter la survie du greffon avec mort censurée chez 834 transplantés rénaux dans le centre de Tours (étude univariée).

Paramètres cliniques	Odds ratio [95% IC]	*p*
Rejet aigu (oui/non)	2,09 [1,52-2,87]	**< 0,0001**
Age du receveur (par année)	0,99 [0,98-1,00]	**0,012**
Age du donneur (par année)	1,00 [0,99-1,01]	0,875
Sexe du donneur (femme/homme)	1,52 [1,10-2,10]	**0,011**
Rang de greffe (>1/1)	1,64 [1,06-2,54]	**0,026**
DGF (oui/non)	1,70 [1,19-2,43]	**0,004**
Utilisation du MMF (oui/non)	1,02 [0,70-1,50]	0,917
Utilisation de l'ATG (oui/non)	2,03 [1,16-3,57]	**0,013**
Immunisation anti-HLA I prégreffe (oui/non)	2,37 [1,69-3,31]	**< 0,0001**
Immunisation anti-HLA II prégreffe (oui/non)	1,38 [0,93-2,05]	0,114

IC : intervalle de confiance. Nous avons testé le risque de perte du greffon en fonction de plusieurs paramètres cliniques par régression de Cox.

Ces résultats font de l'allèle A de PD-1.3 un facteur protecteur indépendant contre le retour en dialyse, mais nécessiteront cependant d'être vérifiés sur une cohorte de validation.

IV.2.2. L'effet de PD-1.3 est lié au statut sérologique CMV du donneur.

Nous avons tout d'abord vérifié qu'il n'y avait pas de différence entre les porteurs de A et les non porteurs concernant les principaux paramètres liés au CMV tels que la sérologie donneur/receveur avant la transplantation et la prophylaxie anti-CMV (Tableau 10).

Tableau 10. Caractéristiques liés au CMV de 834 transplantés rénaux en fonction de PD-1.3.

Données cliniques	Génotype PD-1.3		
	G/G N = 630	G/A & A/A N = 204	*p* [a]
Statut sérologique CMV avant la transplantation [b]			
D^+	266 (42%)	87 (43%)	0,915
D^-/R^-	184 (29%)	54 (26%)	0,452
D^+/R^-	140 (22%)	45 (22%)	0,961
D^-/R^+	180 (29%)	63 (31%)	0,528
D^+/R^+	126 (20%)	42 (21%)	0,856
Prophylaxie anti-CMV	155 (25%)	46 (23%)	0,551

[a] Nous avons utilisé le test du Chi2 pour comparer les paramètres liés au CMV entre les 2 groupes génotypiques. [b] D/R signifie donneur/receveur et +/- indique un statut sérologique CMV positif/négatif.

Puis nous avons étudié l'association entre PD-1.3 et le retour en dialyse en fonction du statut sérologique CMV du donneur. Nous voyons que le lien statistique entre PD-1.3 et la survie du greffon est très significatif dans le groupe D^+ (230 ± 10 mois pour les porteurs de A contre 176 ± 7 pour les autres, $p = 0,004$; Figure 17), mais qu'il ne se retrouve pas dans le groupe D^- (201 ± 8 mois contre 201 ± 5, $p = 0,617$; Figure 17).

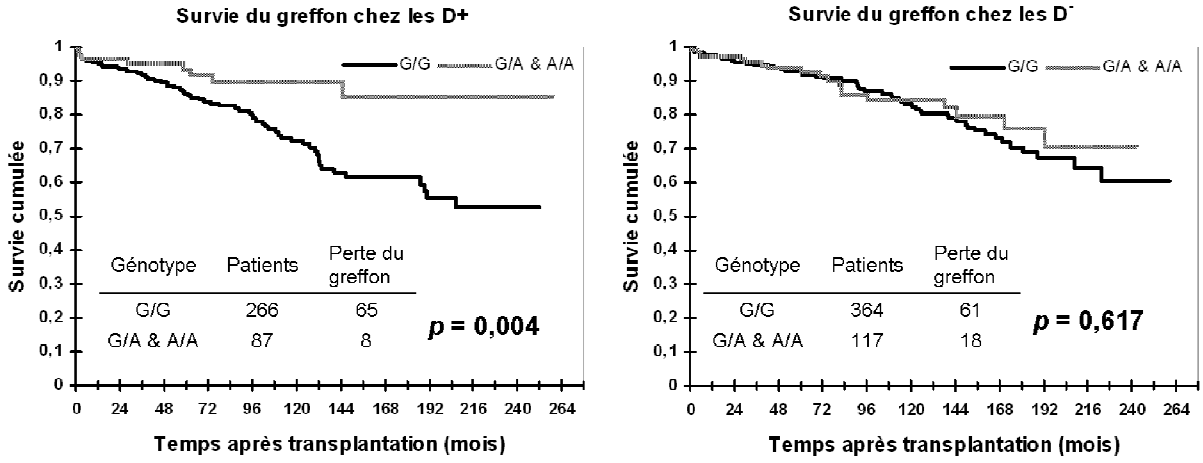


Figure 17. Influence du statut sérologique CMV du donneur sur l'association de PD-1.3 avec la survie du greffon.
Les courbes de survie avec mort censurée ont été établies chez les patients D^+ (à gauche) et chez les D^- (à droite) avec une analyse de Kaplan-Meier, et nous avons comparé les survies des porteurs de l'allèle A (G/A & A/A, courbe grise) avec celles des non-porteurs (G/G, courbe noire) par un test de log-rank. Les effectifs au sein des 2 groupes génotypiques et le nombre de pertes de greffon correspondantes sont également indiqués.

Cependant, l'absence d'association chez les patients D^- pourrait être due à la présence des D^-/R^-, qui ont très peu de risque de présenter une réplication virale. Par ailleurs, le groupe D^+ contient des patients D^+/R^-, qui reçoivent une prophylaxie anti-CMV. Nous avons donc étudié l'association entre PD-1.3 et le retour en dialyse dans les 4 groupes établis en fonction du statut sérologique CMV donneur/receveur : D^-/R^-, D^-/R^+, D^+/R^- et D^+/R^+. Nous avons ainsi mis en évidence qu'il n'y avait aucune différence significative de survie du greffon entre les porteurs de A et les non-porteurs chez les patients D^-/R^- (188 ± 11 mois contre 201 ± 7, p = 0,870 ; Figure 18), et de même dans le groupe de patients D^-/R^+ (191 ± 11 mois contre 193 ± 7, p = 0,580 ; Figure 18).

Par contre, dans le groupe des patients D^+, nous voyons que c'est parmi les D^+/R^+ que l'association entre PD-1.3 et le retour en dialyse est la plus forte (184 ± 9 mois pour les porteurs de A contre 157 ± 9 pour les autres, p = 0,001 ; Figure 18). Notons que chez les D^+/R^-, l'association n'est pas significative mais il subsiste une tendance allant dans le même sens (218 ± 16 mois contre 187 ± 9, p = 0,454 ; Figure 18).

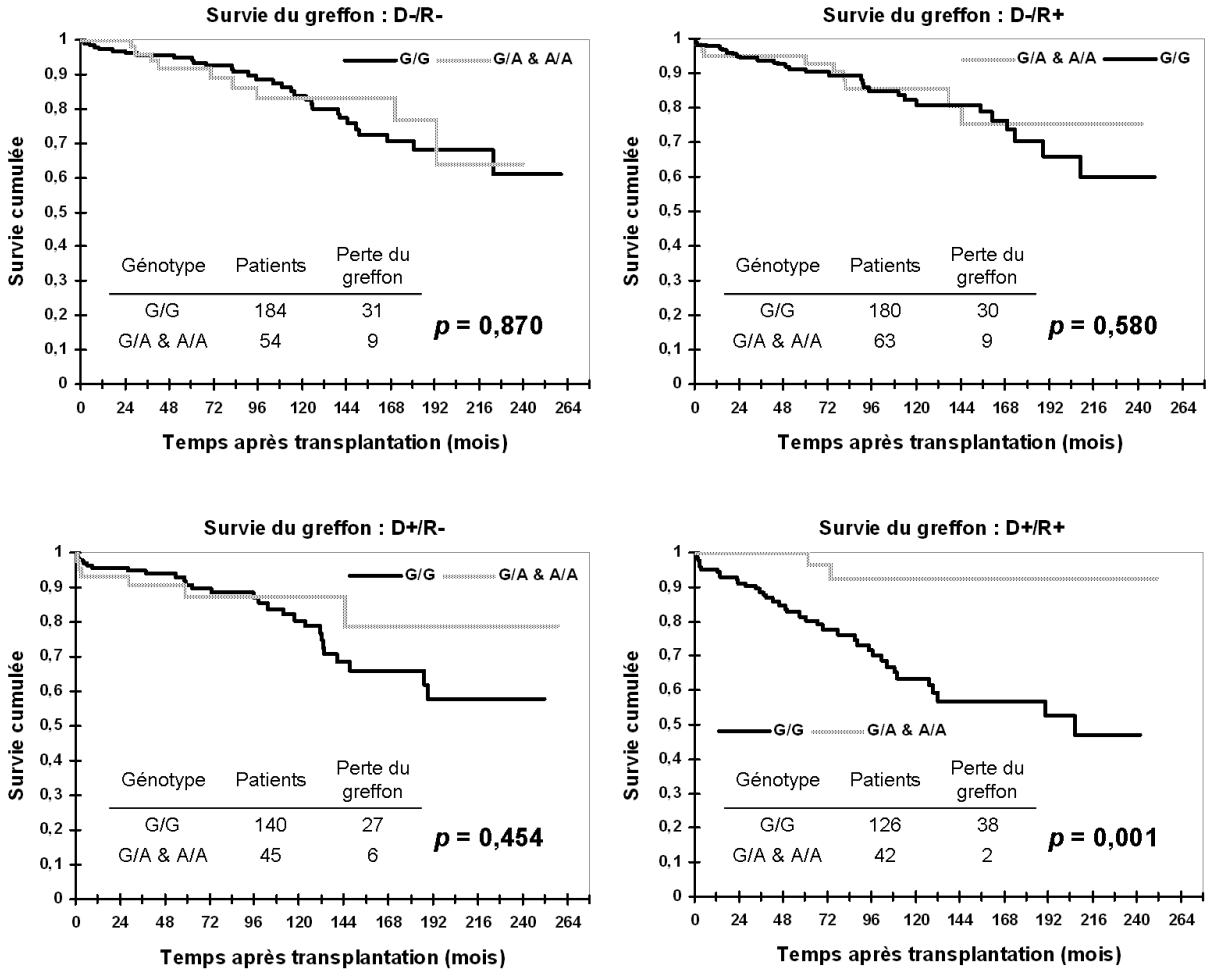


Figure 18. Association entre la survie du greffon et PD-1.3 en fonction du statut sérologique CMV donneur/receveur avant la transplantation.
Nous avons établi avec une analyse de Kaplan-Meier les courbes de survie du greffon avec mort censurée chez les patients D^-/R^- (en haut à gauche), D^-/R^+ (en haut à droite), D^+/R^- (en bas à gauche) et D^+/R^+ (en bas à droite), et comparé par un test de log-rank les survies des porteurs de l'allèle A (G/A & A/A, courbe grise) avec celles des non-porteurs (G/G, courbe noire). Les effectifs au sein des 2 groupes génotypiques et le nombre de pertes du greffon correspondantes sont également indiqués.

IV.3. Discussion.

Ce travail a mis en évidence une association entre le SNP PD-1.3 et la survie du greffon rénal. En fait, à ce jour, très peu de polymorphismes ont été associés à la survie du greffon en transplantation rénale, et concernaient pour la plupart des gènes de cytokines telles que l'IL-6, IFNγ et IL-10 (Krüger et al., 2008). Notre étude est la première qui associe un polymorphisme dans le gène d'une molécule de coinhibition et la survie du greffon rénal. Notons qu'une équipe finlandaise a étudié l'association de PD-1.3 (entre autres SNP) avec le DGF et le rejet aigu (Haimila et al., 2009), mais cette étude n'a rapporté aucun résultat concernant la survie.

La méthodologie de cette étude ne permettait pas d'analyser l'effet de l'allèle variant A de PD-1.3 sur un quelconque événement post-transplantation puisque les patients hétérozygotes (G/A) ont été rassemblés dans le même groupe d'analyse que les homozygotes communs (G/G), ce groupe ayant ensuite été comparé avec les homozygotes variants (A/A). Or, dans cette population finlandaise, la fréquence de l'allèle variant A est très faible (0,3% de A/A, soit seulement 2 patients pour l'ensemble de la cohorte !).

Nos résultats posent la question de la nature du lien associant PD-1.3 et la survie du greffon. L'absence de lien entre ce SNP et le rejet aigu ou le DGF (voir III) suggère que l'effet de PD-1.3 sur la survie du greffon ne serait pas lié à ces événements. Par ailleurs, notre analyse montre que l'association de PD-1.3 avec la survie est restreinte au groupe de patients recevant un greffon d'un donneur séropositif pour le CMV (D^+, Figure 17 et Figure 18), ce qui suggère que l'effet du SNP sur la survie pourrait être lié à une réplication virale *in situ* dans le greffon différente entre les 2 groupes (porteurs de A et non-porteurs).

Plusieurs études supportent le concept de micro-infection locale du CMV (réplication virale de faible niveau et limitée à certaines zones de certains tissus, sans réactivation systémique) qui pourrait être responsable de lésions vasculaires inflammatoires, notamment par l'intermédiaire des cellules immunitaires infectées qui sécrètent plus de cytokines pro-inflammatoires sous l'induction virale (Soderberg-Naucler, 2006). Par ailleurs, d'autres études ont rapporté qu'une allostimulation en elle-même provoquait une réactivation du virus *in vitro* (Söderberg-Nauclér *et al.*, 1997) et qu'une expression des gènes du CMV dans le greffon était observée après transplantation rénale allogénique dans un modèle murin (Hummel *et al.*, 2001). Il a également été rapporté que PD-1 jouait un rôle important dans les défenses anti-CMV et dans la gestion de la réplication du virus (Benedict *et al.*, 2008; Sester *et al.*, 2008). Nous pourrions alors émettre l'hypothèse que la réponse alloimmune *in situ* post-transplantation joue un rôle dans la réplication locale du CMV et que PD-1.3 pourrait affecter cette dernière.

Nous avons vu que l'allèle variant A de PD-1.3, associé à une meilleure survie, était aussi un facteur de risque de réactivation systémique du virus (antigénémie positive). Dans les centres utilisant une stratégie préemptive (basée sur l'antigénémie) comme à Tours, un grand nombre de patients porteurs de l'allèle A vont donc recevoir un traitement anti-CMV. Or, plusieurs travaux ont montré que le traitement par le gancyclovir prévenait les lésions de rejet chronique chez le rat (Lemström *et al.*, 1994a; Lemström *et al.*, 1994b), et plus récemment

qu'il augmentait la survie du greffon rénal chez l'homme (Kliem *et al.*, 2008). Ainsi, ces observations pourraient expliquer la meilleure survie du greffon chez les porteurs de l'allèle A. Par contre, le groupe des homozygotes communs G/G, présentant moins de réplication systémique, a été nettement moins traité (stratégie du centre préemptive), mais l'absence de réplication systémique n'implique pas l'absence de réactivation locale dans le greffon (concept de micro-infection). Ce groupe de patients pourrait donc présenter une réplication non contrôlée du virus *in situ* (comme le suggèrent notamment nos résultats de négativation spontanée), puis secondairement des lésions chroniques, d'où une moins bonne survie du greffon. Cet effet de l'infection du greffon par le CMV est d'ailleurs aussi suggéré par une analyse de l'ensemble de notre base de données montrant un impact indépendant de la sérologie du donneur sur la survie du greffon (données non montrées).

Nous nous sommes aussi intéressés aux pertes de greffon par rejet chronique afin de mieux comprendre la nature du lien entre PD-1.3, le CMV et la survie du greffon, bien que ce soit un événement difficile à affirmer de manière indiscutable. Nous avons ainsi repris les dossiers cliniques des 152 patients étant retournés en dialyse, et nous avons relevé la cause de l'échec de greffe. Parmi ces patients, la majorité ont été biopsiés à un moment donné de la dégradation de leur fonction rénale : lorsque cette biopsie montrait des lésions de rejet chronique prédominant au moment de la dégradation de fonction et que les autres causes avaient été exclues (récidive de la maladie initiale, thrombose vasculaire, causes urologiques), le diagnostic de perte par rejet chronique a été retenu. Cependant, il est clair que nous ne pouvons pas exclure une participation toxique des anti-calcineurines dans les lésions chroniques. A titre indicatif, et avec toutes les limites précitées, nous trouvons des résultats qui nous paraissent intéressants à rapporter dans cette thèse : les porteurs de l'allèle A ont significativement 2,5 fois moins de risque de perdre leur greffon à cause d'un rejet chronique que les autres patients (OR = 0,40, p = 0,032), ce qui est en cohérence avec nos hypothèses précédentes sur le rôle du CMV.

Pour conclure, il se pourrait donc le SNP PD-1.3 n'ait pas d'effet propre sur la survie du greffon, mais plutôt que cette association soit liée à une plus forte fréquence de traitement anti-CMV dans le groupe des porteurs de l'allèle A, ce qui permettrait de mieux contrôler la réplication virale locale**.** Une perspective à ce travail serait donc de vérifier cela en effectuant à nouveau une étude multivariée de l'association entre PD-1.3 et la survie du greffon, avec cette fois un ajustement sur le traitement anti-CMV : une disparition de l'association précédemment observée après cet ajustement confirmerait l'absence d'effet propre de PD-1.3

sur la survie du greffon. Dans le cas contraire, il est possible que l'allèle variant A, du fait de la plus forte réponse immune (Bertsias *et al.*, 2009; Kroner *et al.*, 2005), puisse directement permettre de mieux gérer les conséquences de la réplication virale. Il serait alors intéressant de déterminer dans une étude prospective si PD-1.3 est associé au rejet chronique en tant qu'événement clinique sur des biopsies systématiques séquentielles rapportant le grade et le type des lésions selon Banff 2007, qui permet de mieux analyser la part immunologique des néphropathies chronique du greffon. Il faudrait là aussi effectuer une étude multivariée avec un ajustement sur le traitement anti-CMV.

AXE 2 : résultats préliminaires non publiés portant sur les polymorphismes des gènes codant AIF-1, Lyp, TIM-1 et TIM-3

Dans ces travaux préliminaires, nous avons testé l'association entre ces 4 polymorphismes génétiques et divers événements cliniques reflétant le devenir du greffon rénal et du patient.

Nous avons ainsi observé dans des études univariées que les SNP *AIF1* +899 et Lyp R620W étaient associés respectivement au cancer de la peau après transplantation rénale et au DGF. De plus, nous avons associé le SNP TIM3_2 à la primo-infection du CMV. L'ensemble de ces résultats demande à être confirmé par des études multivariées. Enfin, nous n'avons montré aucune association significative entre l'insertion/délétion TIM1_5 et les événements cliniques étudiés.

I. Patients et méthodes.

L'ensemble des études concerne des patients transplantés rénaux au CHRU de Tours. Les patients ayant perdu précocement leur greffon (dans les 4 premiers jours post-transplantation) n'ont pas été inclus dans ces cohortes car leur perte est associée à des événements non immunologiques. La plupart des patients ont reçu une immunosuppression initiale qui associait des glucocorticoïdes, un anti-calcineurine, l'azathioprine ou le MMF, et une induction avec de l'ATG ou de l'anti-IL-2R. Le traitement immunosuppresseur de maintenance, après le sixième mois, inclut un anti-calcineurine ainsi que de l'azathioprine ou du MMF, avec ou sans des glucocorticoïdes.

I.1. Schéma des études.

I.1.1. *AIF1* +899 et Lyp R620W.

L'étude du SNP *AIF1* +899 concerne une population de 652 patients consécutifs transplantés entre 1985 et 2003. Celle de Lyp R620W inclut les mêmes patients plus les transplantés de 2004 et 2005, portant ainsi le nombre de patients à 840.

Nous avons génotypé ces 2 SNP ensemble avec une technique détaillée précédemment : l'OLA associée au cytomètre en flux. Les sondes et les amorces utilisées sont précisées dans le Tableau 11. Pour chaque SNP, la cohorte correspondante a été divisée en 2 groupes en fonction de la présence ou l'absence de l'allèle variant (A pour *AIF1* +899 et T pour Lyp R620W), puis nous avons comparé la survenue de plusieurs événements cliniques post-transplantation entre les 2 groupes.

Tableau 11. Oligonucléotides utilisés pour le génotypage par OLA d'*AIF1* +899 et de Lyp R620W.

Oligonucléotides (5'→3')	Polymorphismes	
	AIF1 +899 (G/A)	Lyp R620W (C/T)
Amorces de PCR	GCATCCCCTCTAGCTCCTTA	CCTTGAATGAACAAGTGTCAACTTT
	CAGGGACATGATATCTGGGG	GCCTCAATGAACTCCTCAAACT
Sondes-pièges [a, b]	**GATGATCGACGAGACACTCTCGC CA**ATGGCGATATTGGTGAGAAAC/T	**CGGTCGACGAGCTGCCGCGCAAGA T**CAATAAATGATTCAGGTGTCCG/A
Sonde reportrice (5' phosphate et 3' FITC)	GGGTGATTTGCGG	TACAGGAAGTGGAGGG
Oligonucléotide couplé aux billes [a] (5' amine)	CAGGCCAAGTAACTTCTTCG**TGGCG AGAGTGTCTCGTCGATCATC**	CAGGCCAAGTAACTTCTTCG**ATCTTG CGCGGCAGCTCGTCGACCG**

[a] Les séquences des ZipCodes et cZipCodes sont en gras, respectivement dans les séquences des sondes-pièges et des oligonucléotides couplés aux billes. [b] Les nucléotides testant les différents allèles sont soulignés dans les séquences des sondes-pièges.

I.1.2. TIM1_5.

Nous avons menée cette étude sur une population de 555 patients consécutifs transplantés entre 1995 et 2005. Le génotypage de cette délétion/insertion de 15-18 pb a été faite par PCR puis migration sur un gel d'agarose pour une discrimination des génotypes en fonction de la taille des bandes. Pour chaque patient, nous avons amplifié par PCR une région contenant le polymorphisme avec un couple d'amorces précédemment rapporté dans la littérature (Li *et al.*, 2006) : 5'-TCCAGCCTGAGGCTCTTGTTT-3' comme amorce sens et 5'-ATGCTCATTGTTGTTGGAACAG-3' comme amorce antisens (voir l'annexe 2 pour le protocole). Après migration des produits de PCR sur un gel d'agarose 3% et une révélation au BET, la taille des bandes obtenues nous permet de déterminer le génotype du patient (Figure 19) : une bande de 186 pb correspond à un patient homozygote pour la délétion (del/del) et une bande de 201-204 pb à un homozygote pour l'insertion (ins/ins), tandis qu'un hétérozygote présente les 2 bandes (del/ins). Nous avons ensuite comparé la survenue de plusieurs événements cliniques post-transplantation entre les 3 génotypes.

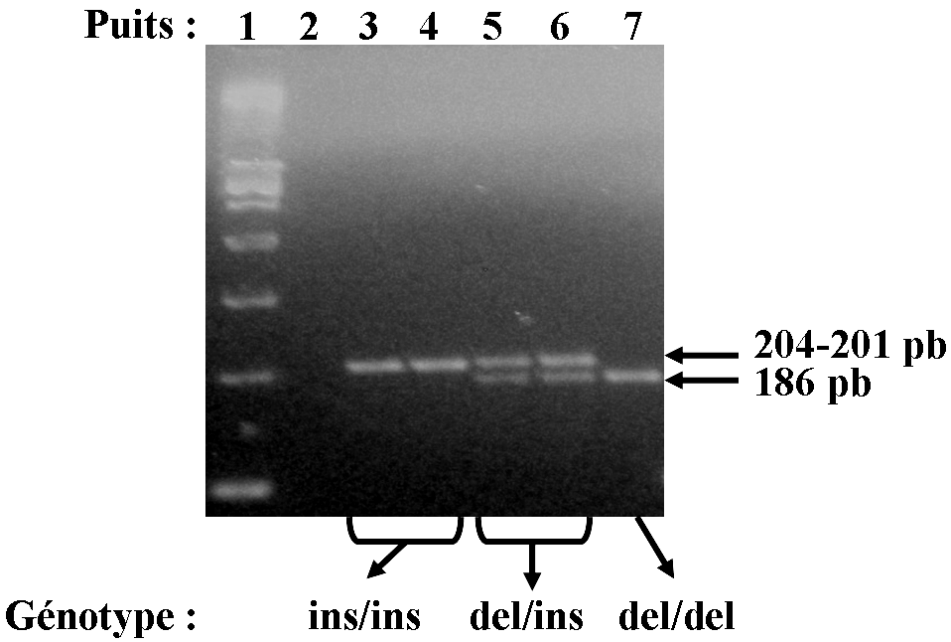


Figure 19. Détermination des génotypes de TIM1_5 par électrophorèse.
Après amplification du polymorphisme par PCR et migration sur gel d'agarose 3%, la taille des bandes obtenue permet de déterminer le génotype des patients. 1 : marqueur de taille 100 pb ; 2 : témoin négatif de PCR (sans ADN) ; 3 à 7 : produits de PCR de 5 patients et les génotypes associés.

I.1.3. TIM3_2.

Nous avons menée cette étude sur une population de 558 patients consécutifs transplantés entre 1994 et 2005. Parmi eux, 128 patients (dont 107 D^+/R^- et 21 R^+) ont reçu un traitement prophylactique anti-CMV avec de l'acyclovir (17 patients), du valacyclovir (57 patients), du gancyclovir (17 patients) ou du valgancyclovir (37 patients).

Nous avons effectué le génotypage des patients avec une technique décrite précédemment : le test de l'allèle par ligation (OLA) couplé à la cytométrie en flux. Nous avons utilisé pour cela des oligonucléotides eux-aussi présentés précédemment (Tableau 1). Nous avons ensuite comparé la survenue de plusieurs événements cliniques post-transplantation entre les 2 groupes génotypiques définis selon la présence ou l'absence de l'allèle variant G (T/G ou G/G et T/T respectivement).

I.2. Evénements cliniques étudiés.

Les données cliniques de chaque patient ont été extraites à partir de la base de données du service de transplantation. Nous avons étudié le DGF, le rejet aigu dans la première année, l'infection à CMV, le cancer de la peau, ainsi que la survie du greffon et du patient, le suivi des patients s'arrêtant au 31 décembre 2007.

Le DGF a été défini par une dialyse dans les 7 premiers jours post-transplantation puis par une reprise de fonction du greffon. Les épisodes de rejet aigu dans la première année ont été déterminés par un diagnostic clinique (élévation de la concentration sérique en créatinine supérieure à 20% en comparaison avec l'état de base), avec une confirmation par biopsie selon la classification de Banff 2007, et n'ont été étudiés que chez les patients ayant conservé un greffon fonctionnel pendant au moins un an. L'infection asymptomatique à CMV a été définie par une fluorescence positive de l'antigène pp65 dans plus de 2 leucocytes circulants sur 150000 testés au cours des 6 premiers mois post-transplantation : elle ne concernait donc pas les patients transplantés avant 1995. Enfin, la survie à l'événement « cancer de la peau » ainsi que la survie du greffon et du patient ont été calculées avec le modèle d'analyse de Kaplan-Meier, donnant entre autres résultats la survie moyenne du greffon (ou « espérance de vie » du greffon) au sein des groupes de patients étudiés. Tout comme précédemment, nous avons différencié la survie du greffon globale (mort du patient et retour en dialyse sont considérés comme une perte du greffon) ainsi que celle avec mort censurée.

I.3. Analyses statistiques.

Nous avons utilisé le test de Mann-Whitney ou de Kruskall-Wallis pour comparer les variables continues, le test du Chi2 pour celles non continues, et nous avons comparé les survies avec le test du log-rank. Nous avons fait ces analyses avec le logiciel XLSTAT 2007 (Addinsoft) et considéré un *p* inférieur à 0,05 comme significatif.

II. Le SNP *AIF1* +899 en transplantation rénale.

II.1. Distribution des génotypes.

Sur les 652 patients de notre population, 79% sont homozygotes commun (G/G), 18% sont hétérozygotes (G/A) et 3% sont homozygotes variants (A/A), ce qui donne une fréquence de l'allèle variant A de 12,3% environ (Tableau 12). L'équilibre de Hardy-Weinberg est respecté. La fréquence de l'allèle A est similaire à celles rapportées dans d'autres études chez des contrôles sains caucasiens (Alkassab *et al.*, 2007; Otieno *et al.*, 2007), ce qui suggère que ce SNP n'est pas associé aux maladies rénales menant à la transplantation.

Tableau 12. Distribution des génotypes d'*AIF1* +899 chez 652 transplantés rénaux et chez des contrôles sains caucasiens de 2 autres études.

Populations	Génotypes			Fréquence de l'allèle A	*p* [a]
	G/G	G/A	A/A		
652 transplantés rénaux	512 (79%)	120 (18%)	20 (3%)	12,3%	
582 contrôles sains (Alkassab *et al.*, 2007)	450 (77%)	122 (21%)	10 (2%)	12,2%	0,970
97 contrôles sains (Otieno *et al.*, 2007)	76 (78%)	18 (19%)	3 (3%)	12,4%	0,977

[a] La fréquence de l'allèle variant A est comparée entre notre population de 652 transplantés rénaux et chacune des 2 populations de contrôles sains par un test du Chi2.

II.2. Caractéristiques de base des patients.

Une fois la distribution des génotypes connue, nous avons séparé les patients en 2 groupes suivant la présence (n = 140) ou l'absence (n = 512) de l'allèle variant A, que nous avons comparés concernant les principales caractéristiques cliniques de base (Tableau 13). Nous n'avons ainsi pas mis en évidence de différence entre ces 2 groupes concernant les principales données de prégreffe telles que l'âge du receveur et du donneur, le sexe du receveur, les maladies initiales, l'incompatibilité HLA AB, le rang de greffe et l'immunisation anti-HLA. Il

semblerait cependant que les porteurs de l'allèle A aient plus de donneurs de sexe féminin (44% contre 35%, $p = 0,043$), plus de diabète comme maladie initiale (6% contre 3%, $p = 0,059$), un temps d'ischémie froide moins long (23 ± 8 heures contre 21 ± 8, $p = 0,056$) et une plus grande incompatibilité HLA DR (1,2 ± 0,7 contre 1,1 ± 0,7, $p = 0,096$). De plus, nous n'avons également pas pu montrer de différence entre les 2 groupes pour les principales caractéristiques post-transplantation telles que le traitement immunosuppresseur et le temps d'observation, même s'il apparaît que les porteurs de A ont plus reçu d'anti-calcineurines (99% contre 96%, $p = 0,042$).

Tableau 13. Caractéristiques cliniques de base de 652 transplantés rénaux en fonction d'*AIF1* +899.

Données cliniques [a]	Génotype *AIF1* +899		p [b]
	G/G N = 512	G/A et A/A N = 140	
Temps d'observation (mois)	112 ± 62	119 ± 59	0,165
Age du receveur (années)	44 ± 15	44 ± 15	0,898
Sexe du receveur (femmes)	193 (38%)	63 (45%)	0,117
Age du donneur (années)	39 ± 15	39 ± 15	0,931
Sexe du donneur (femmes)	179 (35%)	62 (44%)	0,043
Maladie initiale			
Diabète	13 (3%)	8 (6%)	0,059
Polykystose rénale	75 (15%)	18 (13%)	0,591
Glomérulopathie	92 (18%)	29 (21%)	0,459
Néphropathie à IgA	53 (10%)	14 (10%)	0,903
Autres	279 (54%)	71 (51%)	0,427
Temps d'ischémie froide (h)	23 ± 8	21 ± 8	0,056
Incompatibilité HLA			
AB	2,7 ± 1,0	2,7 ± 0,9	0,432
DR	1,2 ± 0,7	1,1 ± 0,7	0,096
Rang de greffe >1	58 (11%)	16 (11%)	0,974
Immunisation anti-HLA (positive)			
I	90 (18%)	29 (21%)	0,395
II	72 (14%)	23 (16%)	0,482
Traitement d'induction			
Globulines anti-lymphocytaires	422 (82%)	116 (83%)	0,904
Anti-IL-2R	41 (8%)	11 (8%)	0,953
Traitement immunosuppresseur			
Azathioprine	257 (50%)	81 (58%)	0,108
Mycophénolate mofétil	244 (48%)	61 (44%)	0,391
Anti-calcineurines	490 (96%)	139 (99%)	0,042

[a] Les données cliniques sont présentées en pourcentages ou en moyennes ± écarts-type. [b] Nous avons utilisé le test du Chi2 pour comparer les paramètres non-continus et le test de Mann-Whitney pour les paramètres continus.

En cas d'association entre *AIF1* +899 et un des événements étudiés, les caractéristiques pour lesquelles il y a une différence entre les 2 groupes proche de la significativité ou l'atteignant devraient être incluses dans l'étude multivariée qui suivrait.

II.3. *AIF1* +899 et le devenir du greffon rénal.

II.3.1. Pas de lien statistique avec le rejet aigu, le DGF, l'infection à CMV et la survie du greffon ou du patient.

Nous avons étudié l'association entre ce SNP et plusieurs événements cliniques post-transplantation. Nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les porteurs de A et les autres patients concernant le DGF (21% contre 21%, p = 0,998 ; Tableau 14), le rejet aigu dans la première année (30% contre 29%, p = 0,808 ; Tableau 14) et l'infection à CMV (37% contre 38%, p = 0,817 pour le total des patients et 59% contre 53%, p = 0,501 pour les 189 R^+ n'ayant pas reçu de prophylaxie anti-CMV ; Tableau 14).

Tableau 14. Incidence de 3 événements cliniques post-transplantation en fonction d'*AIF1* +899.

Evénements cliniques		Génotype *AIF1* +899		Odds ratio [IC 95%]	p [a]
		G/G	G/A et A/A		
DGF [b]		106 / 512 (21%)	29 / 140 (21%)	1,00 [0,63-1,58]	0,998
Rejet aigu dans la 1ère année [c]		142 / 492 (29%)	41 / 137 (30%)	1,05 [0,70-1,59]	0,808
Antigénémie CMV positive [d]	Total	123 / 320 (38%)	30 / 81 (37%)	0,94 [0,57-1,56]	0,817
	R^+ sans prophylaxie	83 / 157 (53%)	19 / 32 (59%)	1,30 [0,61-2,79]	0,501

IC : intervalle de confiance. [a] L'incidence des événements cliniques a été comparée entre les porteurs de l'allèle variant A et les autres patients avec le test du Chi2. [b] Le DGF (pour « Delayed Graft Function », défini par une dialyse dans la 1ère semaine post-opératoire) a été étudié sur la totalité de notre cohorte (652 patients). [c] Nous n'avons étudié le rejet aigu dans la première année que chez les patients ayant conservé un greffon fonctionnel pendant au moins un an (n = 629). [d] L'étude de l'antigénémie CMV concerne les patients transplantés entre 1995 et 2003 dans leur totalité (n = 401) ou seulement les R^+ n'ayant pas reçu de prophylaxie anti-CMV (n = 189).

De plus, des résultats similaires ont été obtenus pour la survie du greffon et du patient (Figure 20). Nous n'avons en effet pas montré d'association entre le génotype d'*AIF1* +899 et la survie globale du greffon (187 ± 8 mois pour les porteurs de A contre 180 ± 5 pour les autres patients, $p = 0{,}185$), la survie avec mort censurée (200 ± 7 mois contre 205 ± 5, $p = 0{,}514$) ou la survie du patient (232 ± 6 mois contre 224 ± 4, $p = 0{,}167$).

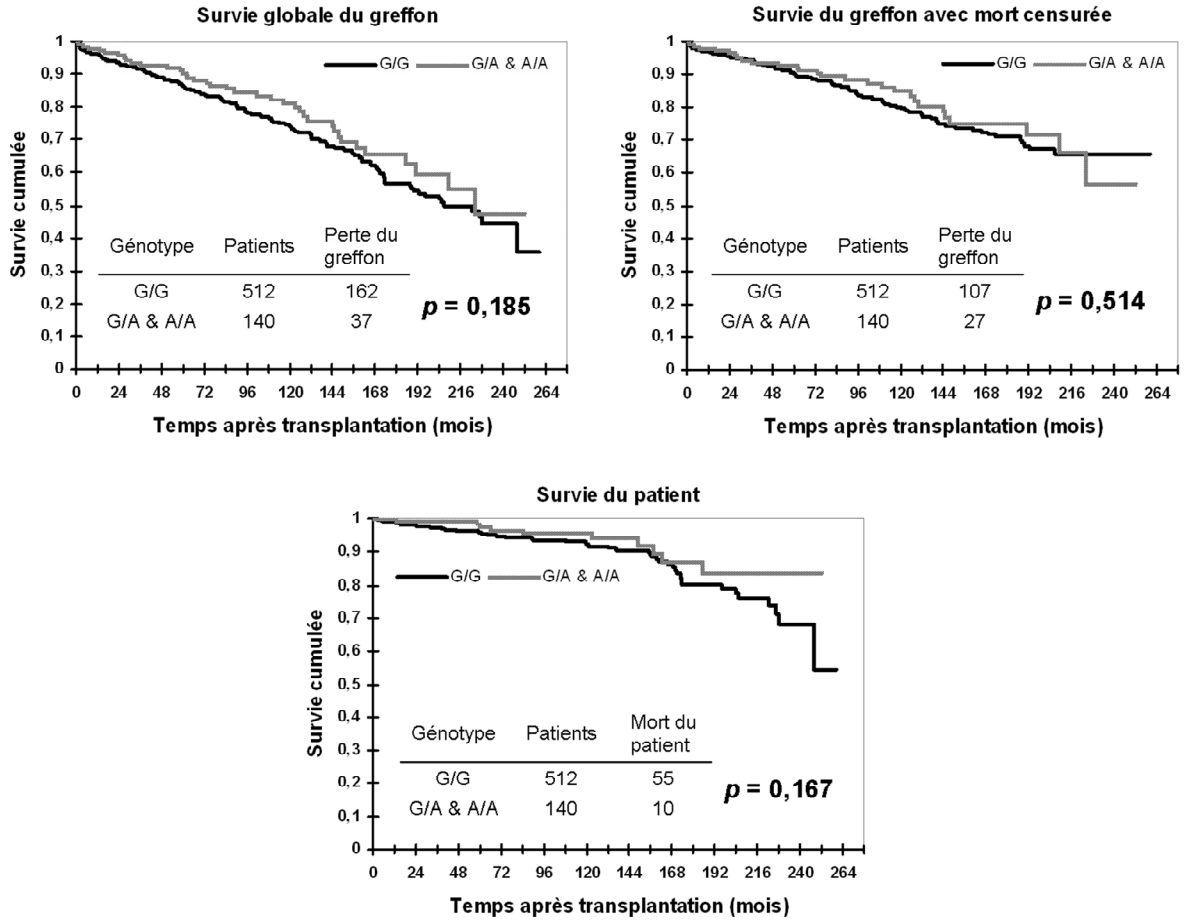


Figure 20. Survie du greffon et du patient en fonction du SNP *AIF1* +899 chez 652 transplantés rénaux.
Nous avons établi les courbes de survie avec une analyse de Kaplan-Meier et comparé par un test de log-rank les survies des porteurs de l'allèle A (G/A & A/A, courbe grise) avec celles des non-porteurs (G/G, courbe noire). Nous avons étudié la survie globale du greffon (en haut à gauche), la survie du greffon avec mort censurée (en haut à droite), ainsi que la survie du patient (en bas). Les effectifs au sein des 2 groupes génotypiques et le nombre de pertes ou de morts correspondants sont également indiqués.

II.3.2. L'allèle A d'*AIF1* +899 est un facteur de risque de cancer de la peau après transplantation rénale.

Par contre, nous avons mis en évidence que les porteurs de A avaient une moins bonne survie à l'événement « cancer de la peau » que les autres patients (197 ± 8 mois contre 226 ± 4, p = 0,019 ; Figure 21). L'allèle variant A pourrait donc être un facteur de risque de cancer de la peau après transplantation rénale, ce qui ferait de ce SNP le second polymorphisme d'un gène de l'immunité rapporté comme étant associé au cancer de la peau après transplantation rénale, avec un SNP concernant l'IL-10 (Alamartine *et al.*, 2003).

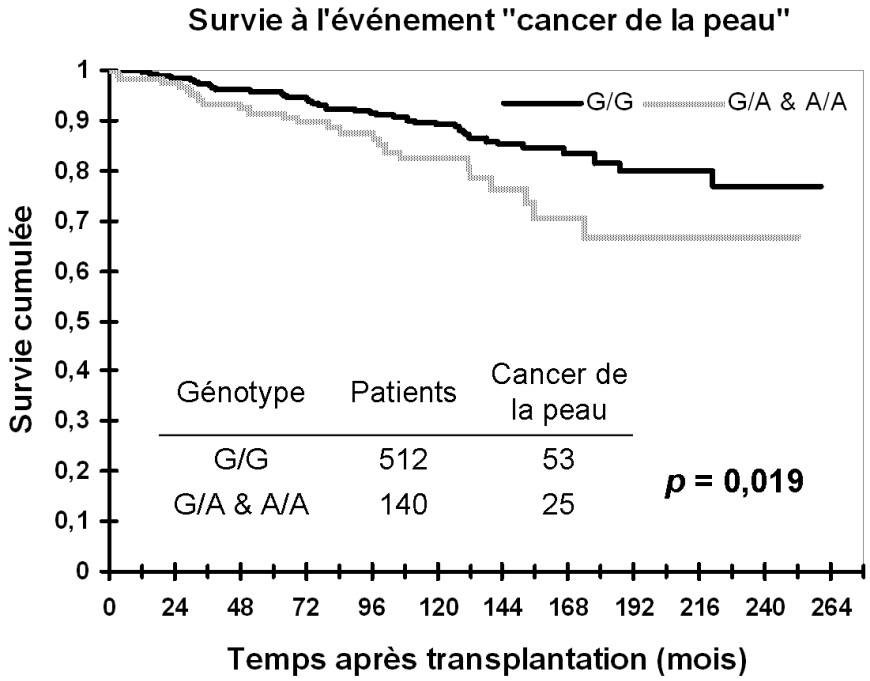


Figure 21. Survie à l'événement « cancer de la peau » en fonction du SNP *AIF1* +899 chez 652 transplantés rénaux.
Nous avons établi les courbes de survie avec une analyse de Kaplan-Meier et comparé par un test de log-rank les porteurs de l'allèle A (G/A & A/A, courbe grise) avec les non-porteurs (G/G, courbe noire). Les effectifs au sein des 2 groupes génotypiques et le nombre de cancers de la peau correspondants sont également indiqués.

Pour vérifier ces résultats, il faut tout d'abord déterminer si l'allèle A est un facteur de risque indépendant, et cela par une étude multivariée. Les principaux facteurs confondants potentiels, c'est-à-dire les facteurs qui pourraient être les acteurs réels de l'effet observé avec le SNP car eux-mêmes facteurs de risque de cancer de la peau, sont l'utilisation

d'azathioprine (Dantal et Pohanka, 2007), la polykystose rénale comme maladie initiale (Otley *et al.*, 2005), l'âge du receveur et le phototype. Comme nous avons pu le voir auparavant, il n'y a pas de différence significative entre les porteurs de A et les autres patients pour les 3 premiers facteurs (Tableau 13), même si il pourrait y avoir une tendance concernant l'azathioprine, mais il faudra tout de même les inclure dans l'étude multivariée. Par ailleurs, il est nécessaire pour valider ces résultats de constituer une cohorte de validation et d'y vérifier si l'allèle A est toujours un facteur de risque de cancer de la peau.

Ces résultats soulèvent également la question du lien moléculaire entre *AIF1* +899 et le cancer de la peau. L'impact fonctionnel de ce SNP reste encore inconnu, mais comme l'allèle A a été mis en évidence comme facteur de risque de sclérodermie (Otieno *et al.*, 2007) et que l'expression d'AIF-1 est augmentée dans les lésions causées par cette pathologie (Del Galdo *et al.*, 2006), nous pouvons supposer que l'allèle augmente l'expression et/ou l'activité d'AIF-1, d'où une plus grande intensité de la réponse immunitaire. Mais comment expliquer dans ce cas un risque augmenté de cancer de la peau ? En effet, les patients devraient alors avoir de meilleures défenses anti-tumorales. Une hypothèse serait que cette suractivation d'AIF-1 monopolise les acteurs immunitaires dans une réponse inflammatoire autre que celle anti-tumorale. Par ailleurs, les traitements immunosuppresseurs pourraient influencer l'impact fonctionnel du SNP et ainsi causer en partie les résultats obtenus. Il apparaît donc nécessaire de tester *in vitro* l'impact fonctionnel d'*AIF1* +899 sur l'expression et l'activité d'AIF-1. Une possibilité serait d'isoler les macrophages de contrôles sains et de transplantés rénaux, puis de tester en fonction du génotype l'expression transcriptionnelle et protéique d'AIF-1, respectivement par PCR quantitative en temps réel et par ELISA, après divers signaux activateurs. Nous étudierions également l'activité d'AIF-1 en dosant par ELISA la production d'IL-12 et d'IL-6 par les macrophages. De plus, sur des PBMC de donneurs sains et de transplantés rénaux, nous pourrions tester par cytométrie en flux l'activité anti-tumorale des LT $CD8^+$ (CFSE/7-AAD et anti-CD107) en contact avec des cellules cancéreuses autologues.

III. Le SNP Lyp R620W en transplantation rénale.

III.1. Distribution des génotypes.

Sur les 840 patients de notre population, 85% sont homozygotes commun (C/C), 13% sont hétérozygotes (C/T) et 2% sont homozygotes variants (T/T), ce qui donne une fréquence de l'allèle variant T de 8,2% environ (Tableau 15). L'équilibre de Hardy-Weinberg est respecté. La fréquence de l'allèle T est similaire à celles rapportées dans d'autres études chez des contrôles sains caucasiens (Michou *et al.*, 2007; Orozco *et al.*, 2005), ce qui suggère que ce SNP n'est pas associé aux maladies rénales menant à la transplantation.

Tableau 15. Distribution des génotypes de Lyp R620W chez 840 transplantés rénaux et chez des contrôles sains caucasiens de 2 autres études.

Populations	Génotypes			Fréquence de l'allèle T	*p* [a]
	C/C	C/T	T/T		
840 transplantés rénaux	716 (85%)	111 (13%)	13 (2%)	8,2%	
319 contrôles français (Michou *et al.*, 2007)	254 (80%)	59 (18%)	6 (2%)	11,1%	0,114
1036 contrôles espagnols (Orozco *et al.*, 2005)	890 (86%)	139 (13%)	7 (1%)	7,4%	0,534

[a] La fréquence de l'allèle variant T est comparée entre notre population de 840 transplantés rénaux et chacune des 2 populations de contrôles sains par un test du Chi2.

III.2. Caractéristiques de base des patients.

Une fois la distribution des génotypes connue, nous avons séparé les patients en 2 groupes suivant la présence (n = 124) ou l'absence (n = 716) de l'allèle variant T, que nous avons comparés concernant les principales caractéristiques cliniques de base (Tableau 16). Nous n'avons ainsi pas mis en évidence de différence entre ces 2 groupes concernant les principales données de pré-greffe. Il semblerait cependant que les porteurs de l'allèle T aient plus de néphropathie à IgA comme maladie initiale que les autres patients (15% contre 9%, *p* =

0,049). De plus, nous n'avons également pas pu montrer de différence entre les 2 groupes pour les principales caractéristiques post-transplantation.

Tableau 16. Caractéristiques cliniques de base de 840 transplantés rénaux en fonction de Lyp R620W.

Données cliniques [a]	Génotype Lyp R620W		*p* [b]
	C/C N = 716	C/T et T/T N = 124	
Temps d'observation (mois)	97 ± 63	93 ± 65	0,448
Age du receveur (années)	44 ± 15	44 ± 15	0,903
Sexe du receveur (femmes)	277 (39%)	40 (32%)	0,173
Age du donneur (années)	41 ± 16	40 ± 17	0,720
Sexe du donneur (femmes)	249 (35%)	48 (39%)	0,398
Maladie initiale			
Diabète	32 (4%)	5 (4%)	0,827
Polykystose rénale	114 (16%)	16 (13%)	0,391
Glomérulopathie	119 (17%)	20 (16%)	0,892
Néphropathie à IgA	68 (9%)	19 (15%)	0,049
Autres	383 (53%)	64 (52%)	0,699
Temps d'ischémie froide (h)	22 ± 8	21 ± 8	0,901
Incompatibilité HLA			
AB	2,7 ± 1,0	2,6 ± 1,1	0,395
DR	1,2 ± 0,7	1,3 ± 0,7	0,701
Rang de greffe >1	76 (11%)	14 (11%)	0,822
Immunisation anti-HLA (positive)			
I	121 (17%)	20 (16%)	0,832
II	93 (13%)	19 (15%)	0,480
Traitement d'induction			
Globulines anti-lymphocytaires	504 (70%)	85 (69%)	0,679
Anti-IL-2R	152 (21%)	33 (27%)	0,182
Traitement immunosuppresseur			
Mycophénolate mofétil	404 (56%)	78 (63%)	0,178
Anti-calcineurines	693 (97%)	120 (97%)	0,994

[a] Les données cliniques sont présentées en pourcentages ou en moyennes ± écarts-type. [b] Nous avons utilisé le test du Chi2 pour comparer les paramètres non-continus et le test de Mann-Whitney pour les paramètres continus.

III.3. Lyp R620W et le devenir du greffon rénal.

III.3.1. Pas de lien statistique avec le rejet aigu, l'infection à CMV, la survie du greffon ou du patient, et le cancer de la peau.

Nous avons étudié l'association entre le SNP et plusieurs événements cliniques post-transplantation. Nous n'avons pas montré de différence concernant le rejet aigu dans la première année entre les porteurs de l'allèle variant T et les autres patients (26% contre 30%, p = 0,289 ; Tableau 17), avec des résultats similaires pour l'infection à CMV (41% contre 38%, p = 0,598 pour le total des patients et 54% contre 55%, p = 0,911 pour les 265 R^+ n'ayant pas reçu de prophylaxie anti-CMV ; Tableau 17).

Tableau 17. Incidence du rejet aigu et de l'antigénémie CMV positive en fonction de Lyp R620W.

Evénements cliniques		Génotype Lyp R620W		Odds ratio [IC 95%]	p [a]
		C/C	C/T et T/T		
Rejet aigu dans la 1ère année [b]		211 / 692 (30%)	30 / 117 (26%)	0,79 [0,51-1,22]	0,289
Antigénémie CMV positive [c]	Total	185 / 482 (38%)	36 / 87 (41%)	1,13 [0,71-1,80]	0,598
	R^+ sans prophylaxie	121 / 219 (55%)	25 / 46 (54%)	0,96 [0,51-1,82]	0,911

IC : intervalle de confiance. [a] L'incidence des événements cliniques a été comparée entre les porteurs de l'allèle variant T et les autres patients avec le test du Chi2. [b] Nous n'avons étudié le rejet aigu dans la première année que chez les patients ayant conservé un greffon fonctionnel pendant au moins un an (n = 809). [c] L'étude de l'antigénémie CMV concerne les patients transplantés entre 1995 et 2005 dans leur totalité (n = 569) ou seulement les R^+ n'ayant pas reçu de prophylaxie anti-CMV (n = 265).

De même, nous n'avons pas montré de différence entre les porteurs de T et les autres patients, tant pour la survie globale du greffon (172 ± 10 mois contre 180 ± 4, p = 0,419 ; Figure 22) que pour celle avec mort censurée (189 ± 10 mois contre 201 ± 4, p = 0,391 ; Figure 22). Des résultats similaires ont été observés concernant la survie du patient (219 ± 10 mois contre 223 ± 3, p = 0,855 ; Figure 22) et la survie à l'événement « cancer de la peau » (220 ± 8 mois contre 216 ± 4, p = 0,461 ; Figure 23).

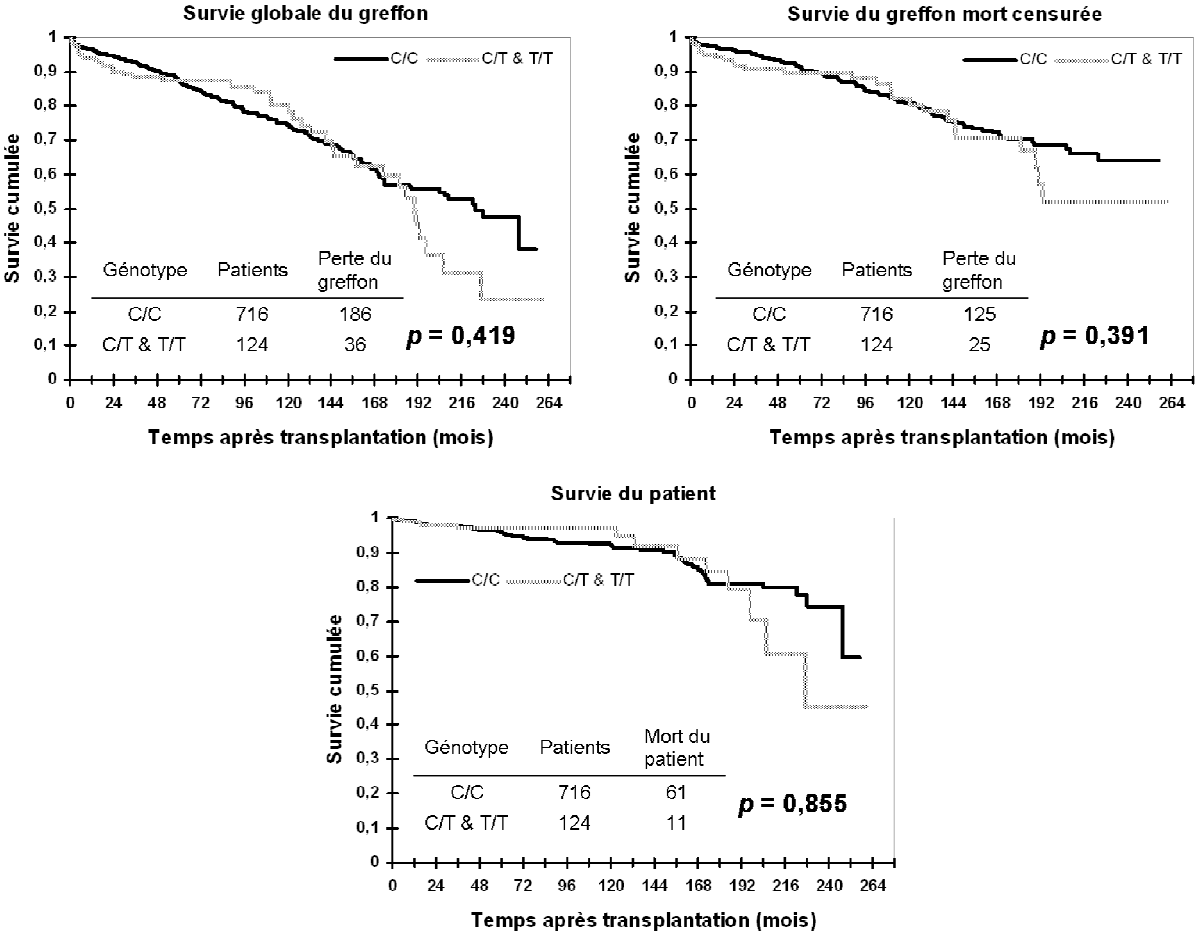


Figure 22. Survie du greffon et du patient en fonction du SNP Lyp R620W chez 840 transplantés rénaux.

Nous avons établi les courbes de survie avec une analyse de Kaplan-Meier et comparé par un test de log-rank les survies des porteurs de l'allèle T (C/T & T/T, courbe grise) avec celles des non-porteurs (C/C, courbe noire). Nous avons étudié la survie globale du greffon (en haut à gauche), la survie du greffon avec mort censurée (en haut à droite), ainsi que la survie du patient (en bas). Les effectifs au sein des 2 groupes génotypiques et le nombre de pertes ou de morts correspondants sont également indiqués.

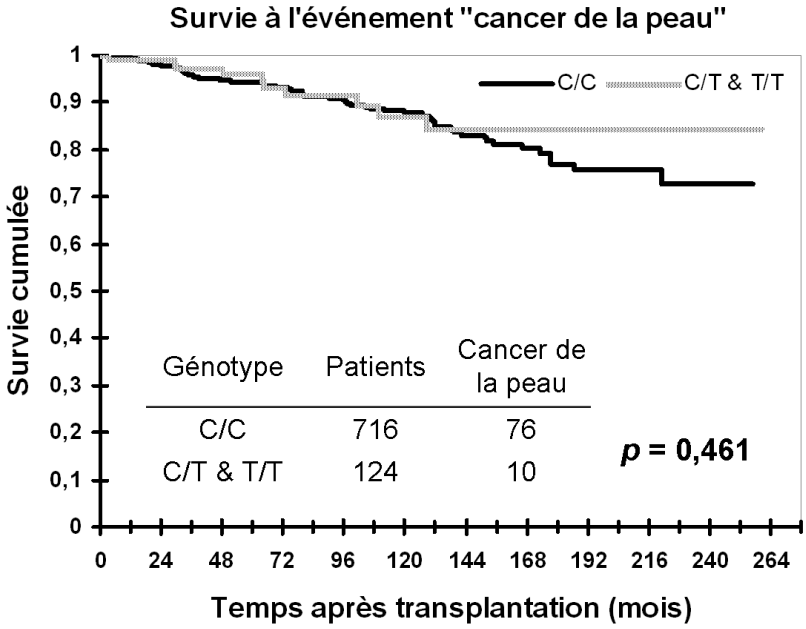


Figure 23. Survie à l'événement « cancer de la peau » en fonction du SNP Lyp R620W chez 840 transplantés rénaux.
Nous avons établi les courbes de survie avec une analyse de Kaplan-Meier et comparé par un test de log-rank les porteurs de l'allèle T (C/T & T/T, courbe grise) avec les non-porteurs (C/C, courbe noire). Les effectifs au sein des 2 groupes génotypiques et le nombre de cancers de la peau correspondants sont également indiqués.

Cependant, les courbes de Kaplan-Meier des patients porteurs de T et des autres patients présentent à long terme (à partir de 144 ou 168 mois) un important décrochement entre elles qui suggère une plus mauvaise survie du greffon (Figure 22) et une meilleure survie à l'événement « cancer de la peau » (Figure 23) pour les porteurs de T. Ainsi, un test du Chi2 a montré que ces derniers avaient une survie globale du greffon à 20 ans plus faible que les autres patients (24% contre 48%, OR = 2,98, $p < 0,0001$) et une survie à l'événement « cancer de la peau » après 20 ans plus élevée (85% contre 73%, OR = 2,07, $p = 0,005$). Rappelons que si l'allèle T est associé à une plus faible réponse immunitaire, il est aussi associé à plusieurs maladies auto-immunes, et une explication proposée est qu'il entraîne notamment une atteinte au niveau des LT régulateurs et de la sélection négative dans le thymus, ce qui entraînerait entre autres une augmentation des LT auto-réactifs circulants (Rieck *et al.*, 2007; Vang *et al.*, 2005). Ceci serait donc en cohérence avec une inhibition des LT régulateurs et pourrait expliquer nos résultats potentiels obtenus sur la survie du greffon et le cancer de la peau. Ceci mérite d'être vérifié sur une nouvelle population constituée de patients ayant conservé leur greffon pendant une très longue période (au moins 15 ans).

III.3.2. L'allèle T de Lyp R620W est un facteur protecteur contre le DGF.

Par contre, nous avons mis en évidence que les porteurs de T présentaient significativement moins de DGF que les autres patients (12% contre 20%, OR = 0,54, p = 0,033 ; Tableau 18), le risque étant alors divisé par près de 2.

Tableau 18. Incidence du DGF en fonction de Lyp R620W chez 840 transplantés rénaux.

Evénements cliniques	Génotype Lyp R620W		Odds ratio [IC 95%]	p [a]
	C/C	C/T et T/T		
DGF [b]	145 / 716 (20%)	15 / 124 (12%)	0,54 [0,31-0,95]	0,033

IC : intervalle de confiance. [a] L'incidence des événements cliniques a été comparée entre les porteurs de l'allèle variant T et les autres patients avec le test du Chi2. [b] Le DGF (pour « Delayed Graft Function ») est défini par une dialyse dans la 1ère semaine post-opératoire.

Il reste à déterminer si l'allèle T est un facteur protecteur indépendant, ce qui nécessite une étude multivariée. Les principaux facteurs confondants potentiels sont l'âge du donneur et du receveur, le temps d'ischémie froide, l'immunisation anti-HLA en pré-greffe du receveur, le rang de greffe et l'utilisation d'ATG en traitement d'induction (Perico *et al.*, 2004). Comme nous avons pu le voir auparavant, il n'y a pas de différence significative entre les porteurs de T et les autres patients pour ces facteurs (Tableau 16), mais il faudra tout de même les inclure dans l'étude multivariée. Par ailleurs, nous envisageons à cout terme de constituer une cohorte de validation et d'y vérifier si l'allèle T est toujours un facteur protecteur contre le DGF.

Dans la littérature, seuls 2 polymorphismes du receveur ont été significativement associés au DGF et concernent les gènes codant ICOS (Haimila *et al.*, 2009) et la molécule HLA A (Kamoun *et al.*, 2008). Le DGF étant un événement très précoce dans la transplantation, on pourrait considérer que sa part immunologique concerne essentiellement la présentation directe des antigènes du donneur par les cellules dendritiques du donneur et que donc les polymorphismes du donneur seraient intéressants à étudier. Deux études ont rapporté une association entre le DGF et le polymorphisme du donneur (Alakulppi *et al.*, 2004; Israni *et al.*, 2008), mais dans notre cas une telle étude serait probablement inutile pour Lyp R620W car Lyp est connue à l'heure actuelle comme étant exclusivement exprimée par les

lymphocytes et son polymorphisme chez le donneur ne devrait donc pas avoir d'impact en transplantation.

Aux vues de ces résultats, on peut se demander comment Lyp R620W peut être associé avec le DGF. L'allèle T a récemment été associé avec un gain de fonction de Lyp touchant les LT comme les LB (Rieck *et al.*, 2007; Vang *et al.*, 2005), d'où potentiellement une diminution de l'intensité de la réponse immunitaire. Or, comme les lésions d'ischémie/reperfusion ont une part immunologique et inflammatoire, une hypothèse possible est que cet allèle entraînerait une diminution de la gravité de ces lésions, ce qui pourrait expliquer pourquoi les porteurs de T présentent moins de DGF. Mais dans ce cas comment expliquer son absence d'effet sur le rejet aigu et l'infection à CMV, et nos résultats potentiels sur la survie du greffon et le cancer de la peau ?

Il serait donc intéressant d'explorer *in vitro* l'impact fonctionnel de Lyp R620W chez des transplantés rénaux. Une possibilité serait d'isoler des PBMC de patients pour tester d'une part la synthèse de Lyp en cytométrie en flux par marquage intracellulaire, et d'autre part la position de Lyp dans la cellule par microscopie à fluorescence, en fonction du génotype. Nous étudierions également la réponse des LT à divers agents activateurs en dosant l'IFNγ par ELISA.

IV. Le polymorphisme TIM1_5 en transplantation rénale.

IV.1. Distribution des génotypes de TIM1_5.

Sur les 555 patients de notre population, 36% sont homozygotes pour la délétion (del/del), 47% sont hétérozygotes (del/ins) et 17% sont homozygotes pour l'insertion (ins/ins), ce qui donne une fréquence de l'insertion de 40,5% environ (Tableau 19). L'équilibre de Hardy-Weinberg est respecté. La fréquence de l'insertion est similaire à celle rapportée dans une autre étude chez des contrôles sains caucasiens (Graves *et al.*, 2005), ce qui suggère que ce polymorphisme n'est pas associé aux maladies rénales menant à la transplantation.

Tableau 19. Distribution des génotypes de TIM1_5 chez 555 transplantés rénaux et chez des contrôles sains caucasiens.

Populations	Génotypes			Fréquence de l'insertion	*p* [a]
	del/del	del/ins	ins/ins		
555 transplantés rénaux	199 (36%)	262 (47%)	94 (17%)	40,5%	
339 contrôles sains (Graves *et al.*, 2005)	138 (41%)	150 (44%)	51 (15%)	37,2%	0,316

[a] La fréquence de l'insertion est comparée entre notre population de 555 transplantés rénaux et une population de contrôles sains par un test du Chi2.

IV.2. Caractéristiques de base des patients.

Une fois la distribution des génotypes connue, nous avons comparé les principales caractéristiques cliniques de base des patients entre les 3 génotypes (Tableau 20). Nous n'avons ainsi pas mis en évidence de différence significative concernant les principales données de pré-greffe et les principales caractéristiques post-transplantation. Nous avons cependant observé une différence proche de la significativité pour l'utilisation des anti-calcineurines (95%, 97% et 100%, $p = 0,089$).

Tableau 20. Caractéristiques cliniques de base de 555 transplantés rénaux en fonction de TIM1_5.

Données cliniques [a]	Génotype TIM1_5			p [b]
	del/del N = 199	del/ins N = 262	ins/ins N = 94	
Temps d'observation (mois)	71 ± 39	66 ± 39	74 ± 37	0,116
Age du receveur (années)	46 ± 15	45 ± 14	47 ± 15	0,364
Sexe du receveur (femmes)	65 (33%)	103 (39%)	39 (41%)	0,224
Age du donneur (années)	44 ± 16	44 ± 15	46 ± 17	0,447
Sexe du donneur (femmes)	76 (38%)	87 (33%)	40 (43%)	0,228
Maladie initiale				
Diabète	13 (6,5%)	13 (5%)	4 (4%)	0,658
Polykystose rénale	35 (17,5%)	43 (16%)	10 (11%)	0,297
Glomérulopathie	35 (17,5%)	41 (16%)	17 (18%)	0,799
Néphropathie à IgA	27 (13,5%)	30 (11%)	10 (11%)	0,706
Autres	89 (45%)	135 (52%)	53 (56%)	0,136
Temps d'ischémie froide (h)	21 ± 9	20 ± 7	20 ± 6	0,296
Incompatibilité HLA				
AB	2,7 ± 1,1	2,8 ± 1,0	2,8 ± 1,0	0,968
DR	1,3 ± 0,7	1,2 ± 0,7	1,2 ± 0,8	0,283
Rang de greffe >1	23 (12%)	27 (10%)	8 (9%)	0,724
Immunisation anti-HLA (positive)				
I	20 (10%)	40 (15%)	12 (13%)	0,255
II	19 (10%)	33 (13%)	10 (11%)	0,580
Traitement d'induction				
Globulines anti-lymphocytaires	126 (63%)	154 (59%)	51 (54%)	0,312
Anti-IL-2R	56 (28%)	91 (35%)	29 (31%)	0,315
Traitement immunosuppresseur				
Mycophénolate mofétil	161 (81%)	214 (82%)	73 (78%)	0,696
Anti-calcineurines	189 (95%)	253 (97%)	94 (100%)	0,087

[a] Les données cliniques sont présentées en pourcentages ou en moyennes ± écarts-type. [b] Nous avons utilisé le test du Chi2 pour comparer les paramètres non-continus et le test de Kruskal-Wallis pour les paramètres continus.

IV.3. Pas de lien statistique entre TIM1_5 et les événements cliniques post-transplantation étudiés.

Nous avons étudié l'association entre le polymorphisme et plusieurs événements cliniques post-transplantation (Tableau 21). Cependant, nous n'avons pas montré de différence entre les patients del/del, del/ins et ins/ins concernant le DGF (respectivement 19%, 18% et 21%, p = 0,721), le rejet aigu dans la première année (27%, 29% et 31%, p = 0,793) et l'infection à

CMV (41%, 38% et 37%, p = 0,673 pour le total des patients ; 57%, 55% et 49%, p = 0,678 pour les 251 R^+ n'ayant pas reçu de prophylaxie anti-CMV).

Tableau 21. Incidence de 3 événements cliniques post-transplantation en fonction de TIM1_5.

Evénements cliniques		Génotype TIM1_5			p [a]
		del/del	del/ins	ins/ins	
DGF [b]		38 / 199 (19%)	46 / 262 (18%)	20 / 94 (21%)	0,721
Rejet aigu dans la 1ère année [c]		53 / 193 (27%)	74 / 251 (29%)	29 / 93 (31%)	0,793
Antigénémie CMV positive [d]	Total	79 / 191 (41%)	95 / 251 (38%)	33 / 90 (37%)	0,673
	R+ sans prophylaxie	50 / 88 (57%)	65 / 118 (55%)	22 / 45 (49%)	0,678

IC : intervalle de confiance. [a] L'incidence des événements cliniques a été comparée entre les patients del/del, del/ins et ins/ins avec le test du Chi2. [b] Le DGF (pour « Delayed Graft Function », défini par une dialyse dans la 1ère semaine post-opératoire) a été étudié sur la totalité de notre cohorte (555 patients). [c] Nous n'avons étudié le rejet aigu dans la première année que chez les patients ayant conservé un greffon fonctionnel pendant au moins un an (n = 537). [d] L'étude de l'antigénémie CMV concerne les patients renseignés pour cette donnée clinique dans notre base de données, dans leur totalité (n = 532) ou seulement les R^+ n'ayant pas reçu de prophylaxie anti-CMV (n = 251).

Par ailleurs, des résultats similaires ont été obtenus pour la survie du greffon et celle du patient (Figure 24). En effet, les courbes de survie ne montrent pas de différence significative entre les 3 génotypes, que ce soit pour la survie globale du greffon (126 ± 4 mois, 119 ± 4 et 121 ± 5, p = 0,483), celle avec mort censurée (132 ± 4 mois, 130 ± 3 et 129 ± 5, p = 0,878) et la survie du patient (144 ± 2 mois, 137 ± 3 et 141 ± 4, p = 0,186).

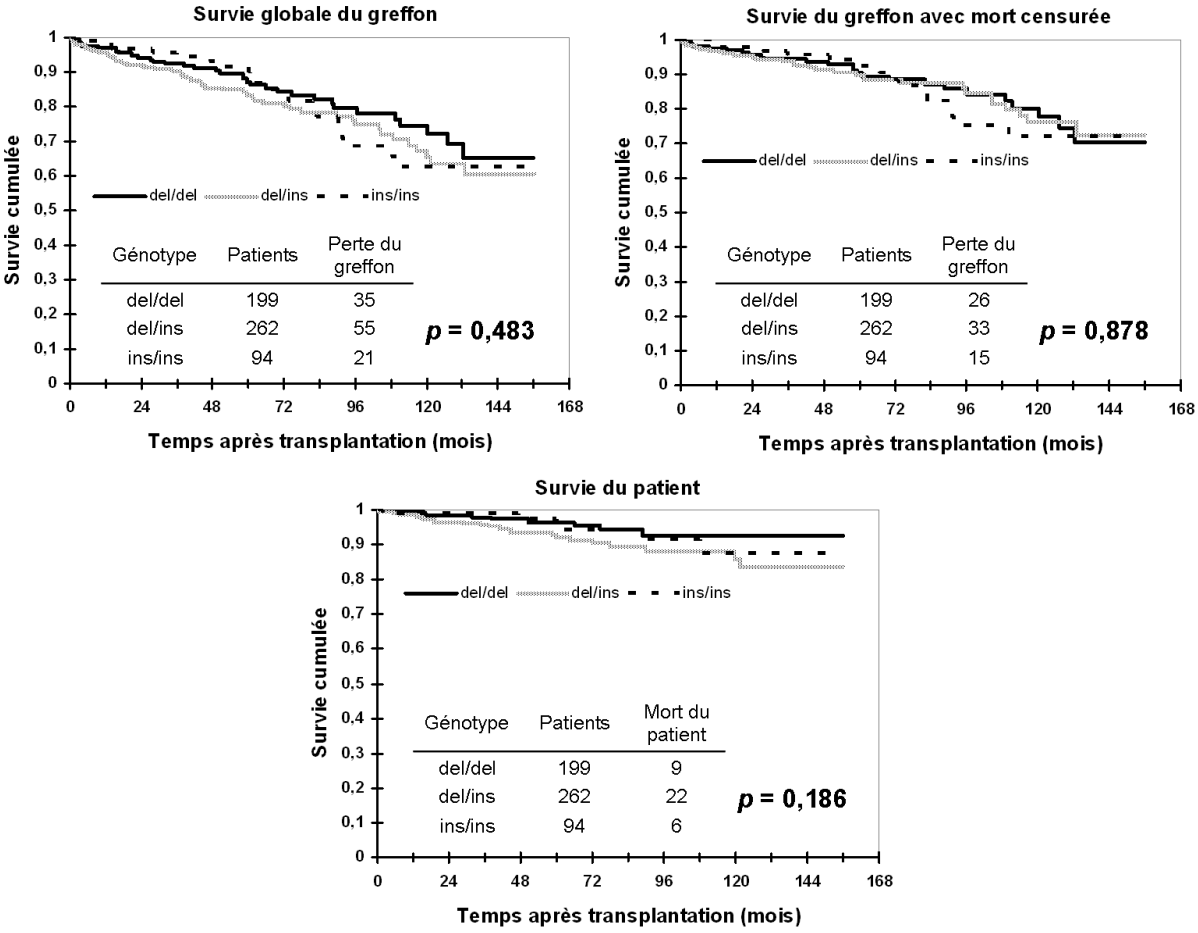


Figure 24. Survie du greffon et du patient en fonction de TIM1_5 chez 555 transplantés rénaux. Nous avons établi les courbes de survie avec une analyse de Kaplan-Meier et comparé par un test de log-rank les survies des patients del/del (courbe noire), del/ins (courbe gris) et ins/ins (pointillés). Nous avons étudié la survie globale du greffon (en haut à gauche), la survie du greffon avec mort censurée (en haut à droite), ainsi que la survie du patient (en bas). Les effectifs au sein des 3 groupes génotypiques et le nombre de pertes ou de morts correspondants sont également indiqués.

Cependant, aux vues des courbes de survie du patient, il semble que nous puissions regrouper les patients del/ins et ins/ins pour les comparer avec les patients del/del. Nous observons ainsi une tendance semblant indiquer que les porteurs de l'insertion présenteraient une moins bonne survie du patient que les autres patients (140 ± 2 mois contre 144 ± 2, p = 0,114 ; Figure 25). Cette différence n'est pas significative, mais cela peut être dû au petit nombre d'événements et à la taille de notre cohorte. Nous envisageons donc d'agrandir notre cohorte et le nombre d'événements en ajoutant les patients transplantés avant 1995, ce qui permettra notamment d'avoir plus de patients avec un long suivi et ayant survécu longtemps à leur transplantation.

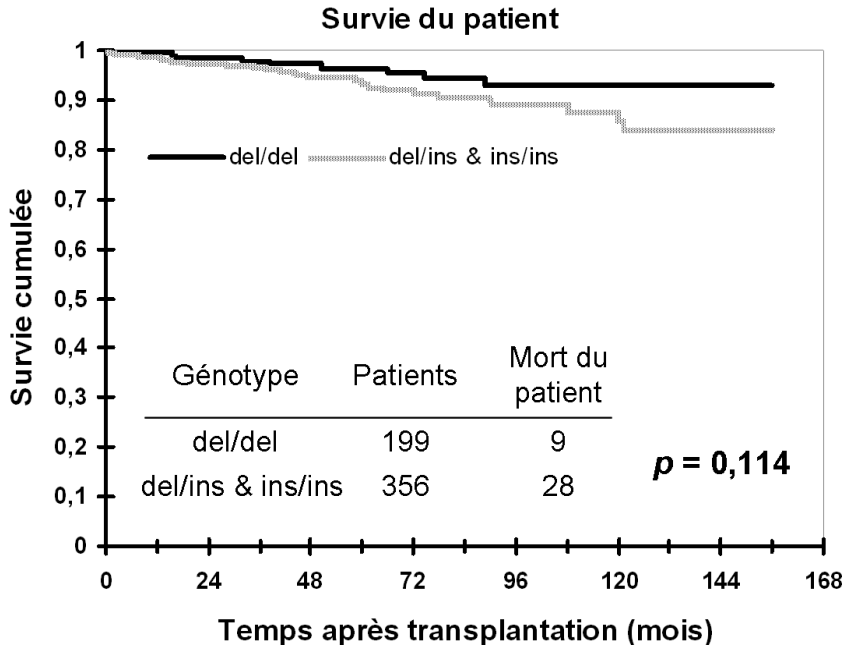


Figure 25. Présence de l'insertion de TIM1_5 et survie du patient chez 555 transplantés rénaux. Nous avons établi les courbes de survie avec une analyse de Kaplan-Meier et comparé par un test de log-rank les porteurs de l'insertion (del/ins & ins/ins, courbe grise) avec les non-porteurs (del/del, courbe noire). Les effectifs au sein des 2 groupes génotypiques et le nombre de morts correspondants sont également indiqués.

Enfin, nous n'avons pas non plus mis en évidence de différence entre les patients del/del, del/ins et ins/ins concernant le cancer de la peau (respectivement 138 ± 3 mois, 146 ± 2 et 135 ± 5, $p = 0,252$; Figure 26). Cependant, les courbes montrent que nous pourrions regrouper les patients del/del et del/ins pour les comparer avec les patients ins/ins. Nous observons ainsi que les porteurs de la délétion semblent avoir une meilleure survie à l'événement « cancer de la peau » que les autres patients (144 ± 2 mois contre 135 ± 5, $p = 0,112$; Figure 26). Cette différence étant proche de la significativité, nous envisageons là-aussi de constituer une cohorte plus importante contenant des patients avec un long suivi pour y vérifier cette association potentielle.

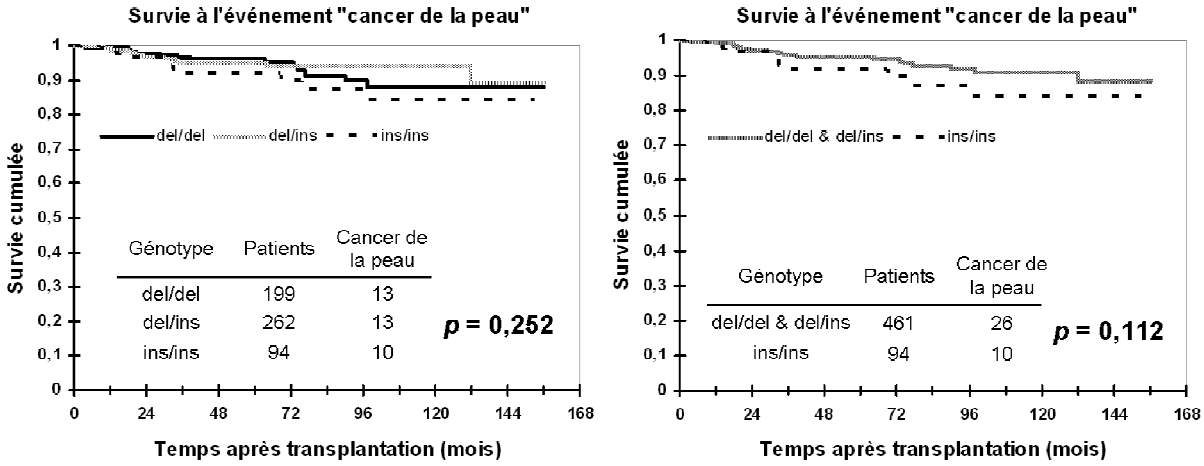


Figure 26. Survie à l'événement « cancer de la peau » en fonction de TIM1_5 chez 555 transplantés rénaux.
Nous avons établi les courbes de survie avec une analyse de Kaplan-Meier et comparé par un test de log-rank : à gauche les patients del/del (courbe noire), del/ins (courbe grise) et ins/ins (pointillés), et à droite les porteurs de la délétion (del/del & del/ins, courbe grise) avec les non-porteurs (ins/ins, pointillés). Les effectifs au sein des groupes génotypiques et le nombre de cancers de la peau correspondants sont également indiqués.

V. Le SNP TIM3_2 en transplantation rénale.

V.1. Distribution des génotypes de TIM3_2.

Sur les 558 patients de notre population, 71,5% sont homozygotes pour l'allèle commun (T/T), 25,6% sont hétérozygotes (T/G) et 2,9% sont homozygotes pour l'allèle variant (G/G), ce qui donne une fréquence de l'allèle G de 15,7% environ (Tableau 22). L'équilibre de Hardy-Weinberg est respecté. La fréquence de l'insertion est similaire à celle rapportée dans une autre étude chez des contrôles sains caucasiens (Graves *et al.*, 2005), ce qui suggère que ce SNP n'est pas associé aux maladies rénales menant à la transplantation.

Tableau 22. Distribution des génotypes de TIM3_2 chez 558 transplantés rénaux et chez des contrôles sains caucasiens.

Populations	Génotypes			Fréquence de l'allèle G	*p* [a]
	T/T	T/G	G/G		
558 transplantés rénaux	399 (71,5%)	143 (25,6%)	16 (2,9%)	15,7%	
339 contrôles sains (Graves *et al.*, 2005)	228 (67,3%)	103 (30,4%)	8 (2,4%)	17,6%	0,463

[a] La fréquence de l'allèle G est comparée entre notre population de 558 transplantés rénaux et une population de contrôles sains par un test du Chi2.

V.2. Caractéristiques de base des patients.

Une fois la distribution des génotypes connue, nous avons comparé les principales caractéristiques cliniques de base des patients en fonction de la présence (n = 159) ou de l'absence (n = 399) de l'allèle variant G (Tableau 23). Nous n'avons ainsi pas mis en évidence de différence significative concernant les principales données de pré-greffe et les principales caractéristiques post-transplantation. Nous avons cependant observé qu'il y avait plus de femmes parmi les porteurs de l'allèle G (45% contre 35%, p = 0,022) et que ces derniers avaient moins d'incompatibilité HLA AB que les autres patients (2,6 ± 1,0 contre 2,8 ± 1,0, p = 0,018).

Tableau 23. Caractéristiques cliniques de base de 558 transplantés rénaux en fonction de TIM3_2.

Données cliniques [a]	Génotype TIM3_2		p [b]
	T/T N = 399	T/G et G/G N = 159	
Temps d'observation (mois)	72 ± 41	73 ± 44	0,818
Age du receveur (années)	46 ± 14	45 ± 14	0,653
Sexe du receveur (femmes)	139 (35%)	72 (45%)	0,022
Age du donneur (années)	44 ± 16	44 ± 16	0,630
Sexe du donneur (femmes)	149 (37%)	55 (35%)	0,542
Maladie initiale			
Diabète	22 (5,5%)	10 (6%)	0,722
Polykystose rénale	65 (16%)	27 (17%)	0,843
Glomérulopathie	70 (17,5%)	29 (18%)	0,846
Néphropathie à IgA	50 (12,5%)	16 (10%)	0,415
Autres	192 (48%)	77 (48%)	0,948
Temps d'ischémie froide (h)	21 ± 8	20 ± 7	0,893
Incompatibilité HLA			
AB	2,8 ± 1,0	2,6 ± 1,0	0,018
DR	1,3 ± 0,7	1,2 ± 0,7	0,170
Rang de greffe >1	48 (12%)	15 (9%)	0,382
Immunisation anti-HLA (positive)			
I	53 (13%)	26 (16%)	0,348
II	49 (12%)	19 (12%)	0,914
Traitement d'induction			
Globulines anti-lymphocytaires	247 (62%)	97 (61%)	0,844
Anti-IL-2R	124 (31%)	47 (30%)	0,726
Traitement immunosuppresseur			
Mycophénolate mofétil	311 (78%)	118 (74%)	0,345
Anti-calcineurines	386 (97%)	154 (97%)	0,945
Statut sérologique CMV en pré-greffe [c]			
D^-/R^-	99 (25%)	47 (30%)	0,249
D^+/R^-	86 (21,5%)	32 (20%)	0,709
$D^{+\text{ ou }-}/R+$	214 (54%)	80 (50%)	0,478
Prophylaxie anti-CMV	90 (23%)	38 (24%)	0,733

[a] Les données cliniques sont présentées en pourcentages ou en moyennes ± écarts-type. [b] Nous avons utilisé le test du Chi2 pour comparer les paramètres non-continus et le test de Mann-Whitney pour les paramètres continus. [c] D/R correspond à donneur/receveur et $^{+/-}$ à un statut sérologique avant la transplantation positif/négatif.

V.3. TIM3_2 et le devenir du greffon rénal.

V.3.1. Pas de lien statistique avec le DGF, le rejet aigu, la survie du greffon ou du patient, et le cancer de la peau.

Nous avons étudié l'association entre le SNP et plusieurs événements cliniques post-transplantation. Nous n'avons pas pu montrer de différence entre les porteurs de l'allèle G et les autres patients concernant le DGF (16% contre 20%, p = 0,285 ; Tableau 24) et le rejet aigu dans la première année (33% contre 29%, p = 0,384 ; Tableau 24).

Tableau 24. Incidence du DGF et du rejet aigu en fonction de TIM3_2.

Evénements cliniques	Génotype TIM3_2		Odds ratio [IC 95%]	p [a]
	T/T	T/G et G/G		
DGF [b]	81 / 399 (20%)	26 / 159 (16%)	0,77 [0,47-1,24]	0,285
Rejet aigu dans la 1ère année [c]	111 / 385 (29%)	49 / 150 (33%)	1,20 [0,80-1,80]	0,384

IC : intervalle de confiance. [a] L'incidence des événements cliniques a été comparée entre les porteurs de l'allèle variant G et les autres patients avec le test du Chi2. [b] Le DGF (pour « Delayed Graft Function », défini par une dialyse dans la 1ère semaine post-opératoire) a été étudié sur la totalité de notre cohorte (558 patients). [c] Nous n'avons étudié le rejet aigu dans la première année que chez les patients ayant conservé un greffon fonctionnel pendant au moins un an (n = 535).

Nous avons également testé l'association de TIM3_2 avec la survie du greffon et du patient (Figure 27). Nos analyses n'ont montré aucune différence significative entre les porteurs de G et les autres patients concernant la survie globale du greffon (124 ± 5 mois contre 134 ± 3, p = 0,361), celle avec mort censurée (131 ± 4 mois contre 142 ± 3, p = 0,310), et la survie du patient (148 ± 3 mois contre 155 ± 2, p = 0,923).

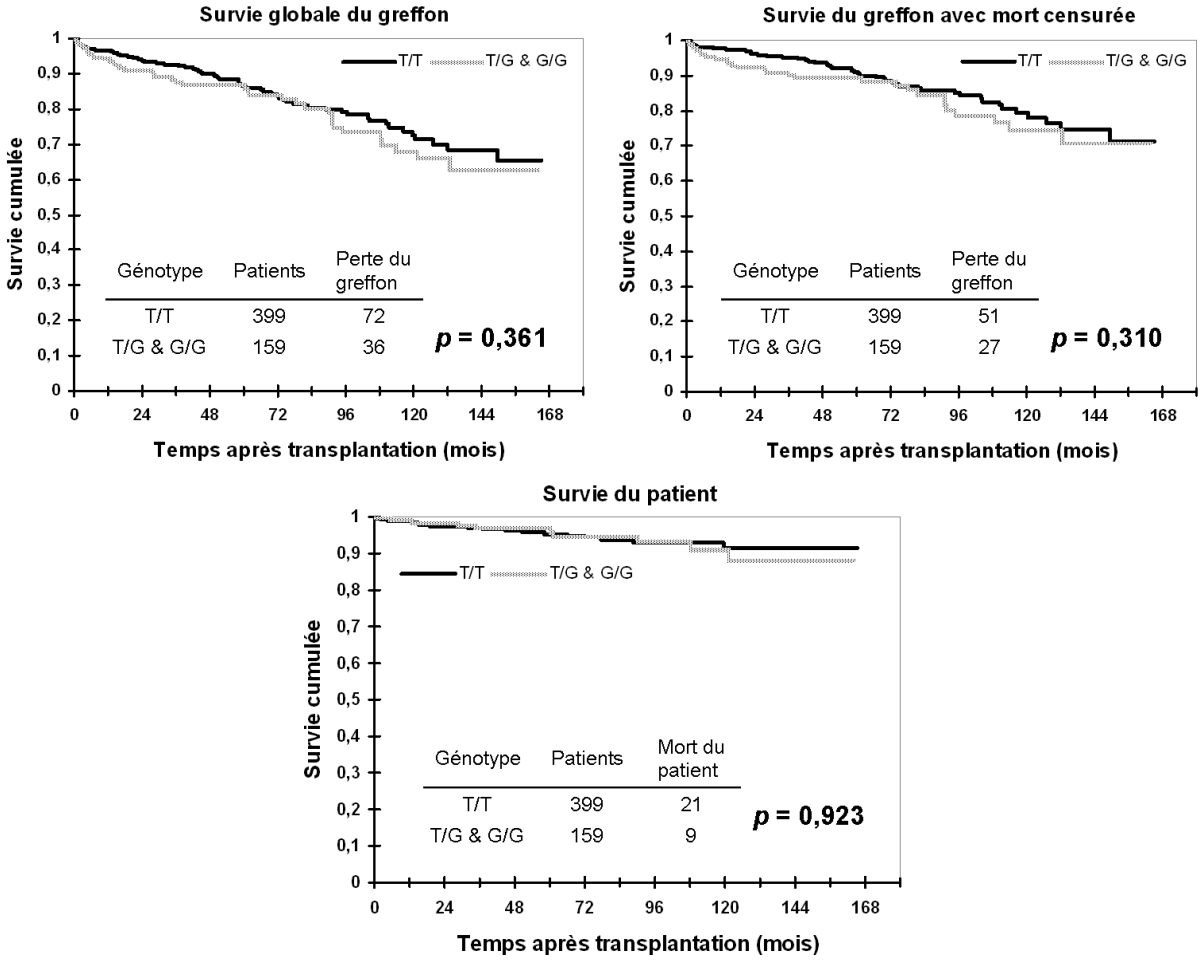


Figure 27. Survie du greffon et du patient en fonction de TIM3_2 chez 558 transplantés rénaux. Nous avons établi les courbes de survie avec une analyse de Kaplan-Meier et comparé par un test de log-rank les survies des porteurs de l'allèle variant G (T/G & G/G, courbe grise) avec celles des autres patients (T/T, courbe noire). Nous avons étudié la survie globale du greffon (en haut à gauche), la survie du greffon avec mort censurée (en haut à droite), ainsi que la survie du patient (en bas). Les effectifs au sein des 2 groupes génotypiques et le nombre de pertes ou de morts correspondants sont également indiqués.

Enfin, nous avons étudié l'association entre TIM3_2 et le cancer de la peau chez les 558 patients de notre population. Il apparaît que les porteurs de l'allèle G ne survivent pas différemment à l'événement « cancer de la peau » que les autres patients (146 ± 3 mois contre 148 ± 2, $p = 0,585$; Figure 28).

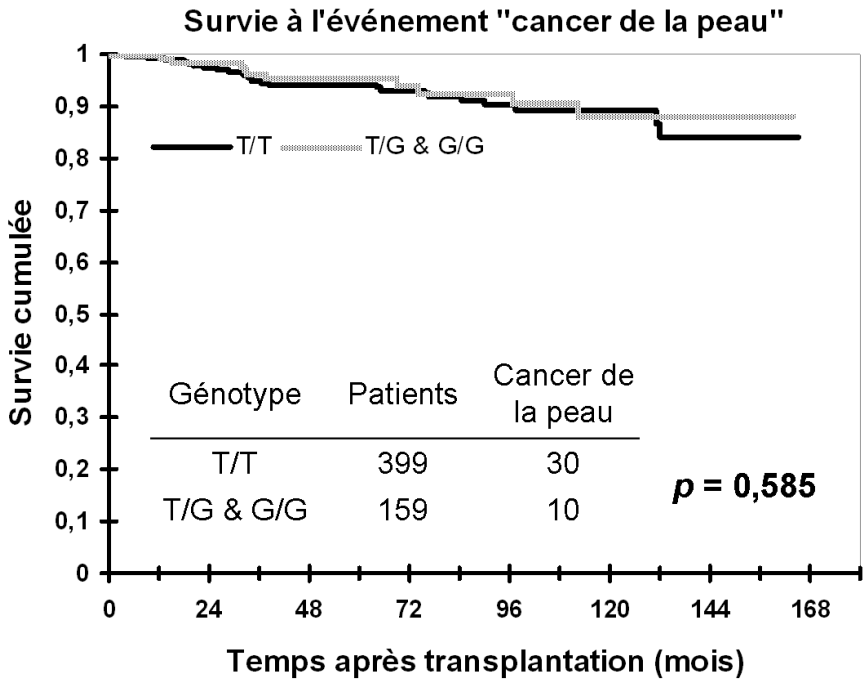


Figure 28. Survie à l'événement « cancer de la peau » en fonction de TIM3_2 chez 558 transplantés rénaux.
Nous avons établi les courbes de survie avec une analyse de Kaplan-Meier et comparé par un test de log-rank les porteurs de l'allèle G (T/G & G/G, courbe grise) avec les non-porteurs (T/T, courbe noire). Les effectifs au sein des 2 groupes génotypiques et le nombre de cancers de la peau correspondants sont également indiqués.

V.3.2. L'allèle G de TIM3_2 est un facteur protecteur contre la primo-infection à CMV.

Il est apparu que les porteurs de G présentaient significativement moins d'infection à CMV que les autres patients (32% contre 43%, OR = 0,63, p = 0,027 ; Tableau 25). Cependant, ce résultat n'est pas retrouvé lorsque nous ne nous intéressons qu'aux 241 patients R^+ n'ayant pas reçu de prophylaxie anti-CMV (53% contre 57%, p = 0,587 ; Tableau 25), ce qui tendrait à prouver que TIM3_2 n'est pas associé à la réactivation du CMV. Nous nous sommes donc intéressés à la primo-infection, en étudiant les patients D^+/R^- : les porteurs de l'allèle G dans cette sous-population ont environ 2 fois moins de risque de présenter une infection à CMV par rapport aux autres patients (38% contre 56%, OR = 0,47, p = 0,089 ; Tableau 25), cette association atteignant presque la significativité. Il semble donc que l'allèle variant G de TIM3_2 soit un facteur protecteur contre la primo-infection à CMV.

Tableau 25. Incidence de l'antigénémie CMV positive après transplantation rénale en fonction de TIM3_2.

Evénements cliniques		Génotype TIM3_2		Odds ratio [IC 95%]	*p* [a]
		T/T	T/G et G/G		
	Total	**155 / 360 (43%)**	**47 / 145 (32%)**	**0,63 [0,42-0,95]**	**0,027**
Antigénémie CMV positive [b]	R^+ sans prophylaxie	101 / 177 (57%)	34 / 64 (53%)	0,85 [0,48-1,51]	0,587
	D^+/R^-	**44 / 78 (56%)**	**11 / 29 (38%)**	**0,47 [0,20-1,12]**	**0,089**

IC : intervalle de confiance. [a] L'incidence des événements cliniques a été comparée entre les porteurs de l'allèle variant G et les autres patients avec le test du Chi2. [b] L'étude de l'antigénémie CMV concerne les patients qui sont renseignés pour cette donnée clinique dans notre base de données : la totalité (n = 505), les patients R^+ n'ayant pas reçu de prophylaxie anti-CMV (n = 241) ou les patients D^+/R^- (n = 107).

Le fait que ce résultat ne soit pas significatif est certainement dû à la taille de la sous-population des D^+/R^- et il sera donc nécessaire de vérifier l'association de TIM3_2 avec la primo-infection à CMV sur une population plus importante, et plus particulièrement sur une grande cohorte de patients D^+/R^-. Nous pourrons alors également mettre en place une étude multivariée pour tester l'indépendance de l'association entre TIM3_2 et la primo-infection à CMV, ainsi qu'une cohorte de validation issue d'un autre centre de transplantation afin de valider les résultats obtenus.

Même si ce résultat demande à être confirmé sur une plus grande cohorte, sur une cohorte de validation et par une étude multivariée, il suggère tout de même un lien entre TIM3_2 et l'infection à CMV, et plus particulièrement la primo-infection. Aucune étude sur l'impact fonctionnel de TIM3_2 n'a été menée à ce jour mais, du point de vue clinique, des études ont montré que l'allèle variant G était un facteur de risque de diverses maladies allergiques ou auto-immunes (Chae et al., 2004a; Chae et al., 2004b; Graves et al., 2005). Vu que le principal rôle connu de TIM-3 est d'inhiber l'activité des LT de type Th1 en entraînant leur apoptose, on peut supposer que la substitution dans le domaine mucine diminue la fonctionnalité de TIM-3 en affectant la liaison avec son ligand, ce qui diminuerait par là même l'apoptose des LT et pourrait expliquer la sensibilité aux maladies auto-immunes. Or les LT de type Th1 jouent également un rôle majeur dans les défenses anti-CMV et dans la gestion de ce virus (Harari et al., 2004; Orange et Biron, 1996; Presti et al., 1998; Reddehase

et al., 1987). Les porteurs de l'allèle G pourraient ainsi avoir une plus forte réponse immune et seraient donc moins sensible à la primo-infection à CMV, car plus aptes à se débarrasser du virus lors de leur rencontre.

Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en menant des études *in vitro* sur l'impact fonctionnel de TIM3_2 en réponse au CMV. Une possibilité serait d'isoler les PBMC de donneurs sains et de greffés rénaux, qui seraient séronégatifs ou séropositifs pour le CMV (pour étudier respectivement la primo-infection et la réactivation). Nous aurions bien sûr génotypé TIM3_2 chez ces individus. Les cellules seraient incubées avec une solution d'antigènes du CMV ou avec des cellules dendritiques autologues immatures préalablement infectées par le CMV. Elles seraient ensuite marquées pour les antigènes CD4 ou CD8, puis incubées avec des anticorps anti-TIM-3 et anti-IFNγ afin de déterminer l'expression de TIM-3 et de quantifier le nombre de LT anti-CMV, le niveau de réponse étant analysé en fonction du génotype. De plus, nous étudierions également par cytométrie en flux l'activité cytotoxique des lymphocytes anti-CMV obtenus plus haut grâce à un marquage de CD107 (dégranulation) et à l'utilisation du couple CFSE/7-AAD (mort des cellules cibles). Enfin, nous étudierions l'apoptose des LT anti-CMV en réponse à la galectine-9 (le ligand de TIM-3) par un double marquage annexine V/7-AAD.

Par ailleurs, il serait également très intéressant de constituer une cohorte d'individus sains non transplantés et d'étudier si TIM3_2 est associé à la séropositivité CMV dans cette population. Une association significative confirmerait encore plus l'influence de ce SNP sur la primo-infection à CMV, mais mettrait aussi en évidence pour la première fois un facteur génétique de séropositivité à CMV.

Conclusion

L'objectif de cette étude rétrospective était d'étudier l'association entre 6 polymorphismes et divers événements cliniques reflétant le devenir des greffons rénaux. En effet, une bonne connaissance des polymorphismes influençant le devenir des greffons pourrait permettre de stratifier les patients selon leur risque de présenter une pathologie délétère pour le greffon et ainsi moduler les stratégies immunosuppressives pour éventuellement améliorer la survie des greffons rénaux chez les patients à risque et minimiser les effets secondaires associés aux traitements immunosuppresseurs. Nous avons ainsi mis en évidence plusieurs associations entre ces polymorphismes et certains événements cliniques survenant après la transplantation rénale (Figure 29).

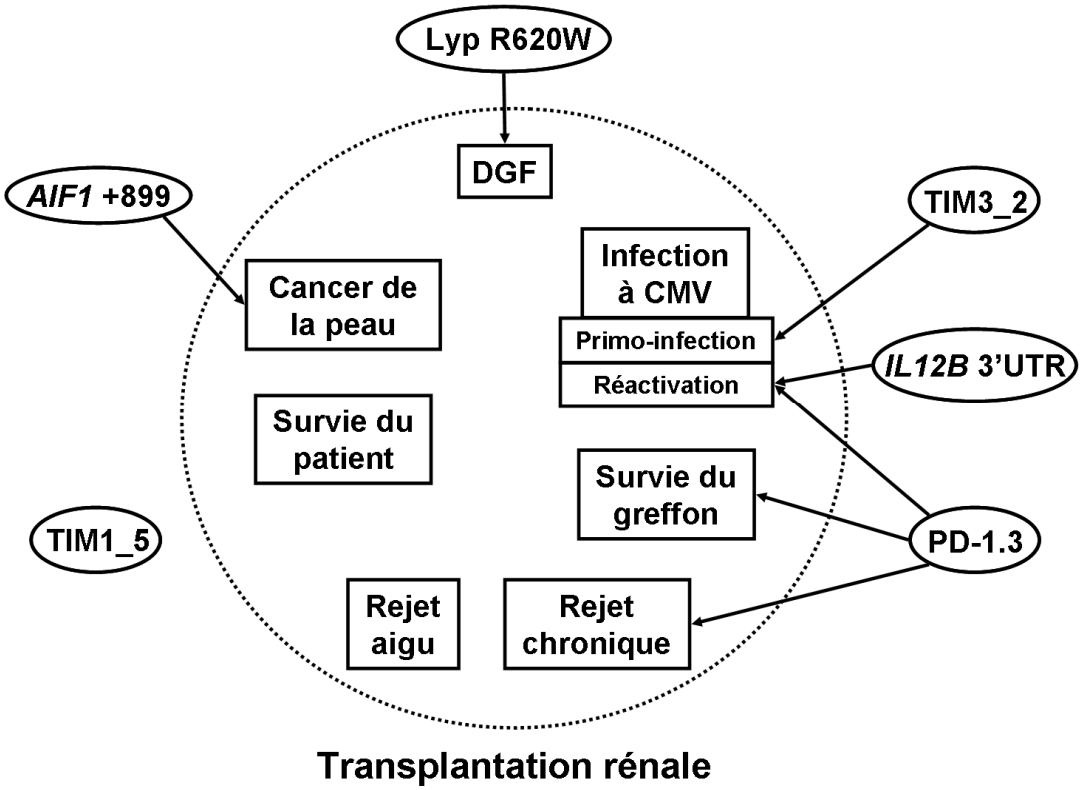


Figure 29. Bilan des résultats de cette étude.
Les flèches indiquent les associations mises en évidence dans ce travail entre les polymorphismes étudiés et plusieurs événements cliniques survenant après une transplantation rénale.

Les SNP *IL12B* 3'UTR et PD-1.3 ont été associés à la réactivation du CMV après transplantation rénale. Ces résultats ont permis d'établir des groupes de patients avec un risque de réactivation différent en fonction des génotypes, et nous avons ainsi isolé un groupe à haut risque qui pourrait tout particulièrement bénéficier d'une prophylaxie anti-CMV. Ces résultats ont donné lieu à 3 articles publiés. Par ailleurs, PD-1.3 a été associé à la survie du

greffon (article à en cours de rédaction), son effet pouvant potentiellement passer par le rejet chronique et étant lié à la sérologie CMV avant la transplantation. Les SNP *AIF1* +899 et Lyp R620W ont quant à eux été associés respectivement au cancer de la peau après transplantation rénale et au DGF. Enfin, nous avons associé TIM3_2 à la primo-infection du CMV. Par contre, nous n'avons pas montré d'association statistique entre la délétion/insertion TIM1_5 et les événements cliniques post-transplantation étudiés.

Tous ces résultats nous montrent l'importance que peuvent avoir les polymorphismes génétiques sur la réponse immunitaire, notamment dans la cadre de la transplantation rénale. Il est bien sûr nécessaire de valider ces résultats sur une cohorte de réplication issue d'un autre centre de transplantation afin d'éliminer de potentiels biais liés à notre population d'étude. Il faudra aussi mettre en évidence les causes fonctionnelles unissant les polymorphismes et les événements cliniques associés en menant des études *in vitro*.

Mais même après tout cela, nous n'aurons pas la certitude que l'effet observé en clinique est bien dû au polymorphisme étudié et pas à un autre en déséquilibre de liaison. Ainsi un autre polymorphisme dans le gène codant IL-12p40 (dans le promoteur) a été associé à la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques (Muller-Berghaus *et al.*, 2004) ainsi qu'à des pathologies cliniques telles que l'asthme et la malaria (Morahan *et al.*, 2002a; Morahan *et al.*, 2002b) ; il pourrait pourquoi pas être à l'origine des effets observés pour *IL12B* 3'UTR. Par ailleurs, le SNP 3'UTR a également été rapporté comme étant en déséquilibre de liaison avec un locus de susceptibilité au diabète de type 1, *IDDM18* (Morahan *et al.*, 2001), ce dernier pouvant donc lui aussi avoir un impact sur la réponse immunitaire, et de plus *IL12B* est proche du gène codant EBF1 (pour « Early B-cell Factor 1 ») dont un SNP a été associé à la sclérose en plaques (Martinez *et al.*, 2005). De même, d'autres SNP ont été caractérisés dans le gène de PD-1 (Prokunina *et al.*, 2002), certains ayant été associés à des maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde par exemple (Kong *et al.*, 2005). Le gène d'AIF-1 contient aussi plusieurs polymorphismes, dont 2 sont liés à *AIF1* +899 et un autre est en déséquilibre de liaison complet avec ce dernier (Otieno *et al.*, 2007), et il est proche du gène codant TNFα, pour lequel des SNP ont déjà été associés à des événements cliniques post-transplantation rénale tels que le rejet aigu (Krüger *et al.*, 2008). Enfin, d'autres polymorphismes que TIM1_5 et TIM3_2 ont été caractérisés dans les gènes de TIM-1 et TIM-3, et plusieurs ont été associés à des maladies allergiques ou auto-immunes (Chae *et al.*, 2004a; Chae *et al.*, 2004b; Chae *et al.*, 2005; Chae *et al.*, 2004d), avec des déséquilibres de liaison modérés par rapport à TIM1_5 ou TIM3_2 (Graves *et al.*, 2005). Par ailleurs, TIM3_2 semble également être en

déséquilibre de liaison avec 2 SNP du gène codant ITK (pour « IL2-inducible T-cell Kinase ») qui ont été associés avec l'atopie (Graves *et al.*, 2005).

C'est pourquoi les études de polymorphismes nécessitent de plus en plus d'en explorer plusieurs en combinaison, et plus particulièrement plusieurs SNP dans le même gène, ce qui représente ainsi des études haplotypiques. Ce type de travaux nécessite bien sûr des techniques de génotypage universelles et surtout à haut débit. D'où notre volonté de mettre en place au laboratoire une nouvelle technique de génotypage des polymorphismes génétiques. En effet, la technique utilisée en routine (RFLP) ne pouvait pas s'appliquer à tous les polymorphismes et restait assez limitée au niveau du rendement ainsi que de la sensibilité. Nous avons ainsi appliqué une méthode basée sur un test de ligation (OLA) et la cytométrie en flux pour le génotypage de 3 SNP simultanément chez des patients transplantés rénaux, cette technique permettant une discrimination visuelle et statistique des différents génotypes. De plus, les articles ayant étudié le principe de cette technique l'ont gratifiée d'un très bon rapport rendement/prix. Toutes ces données en font une méthode de choix pour le génotypage de transplantés rénaux dans les laboratoires d'immunologie dépendant de petits et moyens centres de transplantation rénale.

Tous nos résultats encouragent à mener d'autres études sur des polymorphismes du receveur. Nous avons par exemple dans nos futurs choix des polymorphismes dans les gènes codant CD25, l'IL-18, CD40 et son ligand CD40L, ainsi que le polymorphisme dans le promoteur du gène de l'IL-12p40. Tous ces polymorphismes concernent des molécules majeures de l'immunité et ont été associés à des pathologies cliniques (le plus souvent des maladies auto-immunes), mais ils ont été peu ou pas étudiés en transplantation rénale.

Pour finir, nos résultats encouragent également à étudier les polymorphismes du donneur. En effet, ces derniers n'ont pas été explorés dans ce travail car les échantillons d'ADN étaient plus difficiles à obtenir et à utiliser, tant au niveau juridique qu'au niveau logistique, mais nos résultats sur les polymorphismes du receveur peuvent justifier cette étude au moins pour les 6 de ce travail. Ainsi, si Lyp et TIM-1 ne sont à priori pas les meilleurs candidats car à l'heure actuelle ils sont considérés comme étant strictement exprimés sur les lymphocytes, les 4 autres molécules sont ou peuvent être exprimées par les CPA et peuvent dont intervenir dans la présentation directe des antigènes du donneur, ce qui rend l'étude de leur polymorphisme chez le donneur particulièrement intéressante, notamment concernant le DGF et le rejet aigu.

Bibliographie

Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J, Mangion J, Roberton-Lowe C, Marshall AJ, Petretto E, Hodges MD, Bhangal G, Patel SG, Sheehan-Rooney K, Duda M, Cook PR, Evans DJ, Domin J, Flint J, Boyle JJ, Pusey CD et Cook HT. Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature*, 2006, 439 (7078), 851-855.

Alakulppi NS, Kyllonen LE, Jantti VT, Matinlauri IH, Partanen J, Salmela KT et Laine JT. Cytokine gene polymorphisms and risks of acute rejection and delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation*, 2004, 78 (10), 1422-1428.

Alakulppi NS, Kyllonen LE, Partanen J, Salmela KT et Laine JT. Diagnosis of acute renal allograft rejection by analyzing whole blood mRNA expression of lymphocyte marker molecules. *Transplantation*, 2007, 83 (6), 791-798.

Alakulppi NS, Kyllonen LE, Salo HM, Partanen J, Salmela KT et Laine JT. The impact of donor cytokine gene polymorphisms on the incidence of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplant Immunology*, 2006, 16 (3-4), 258-262.

Alamartine E, Berthoux P, Mariat C, Cambazard F et Berthoux F. Interleukin-10 promoter polymorphisms and susceptibility to skin squamous cell carcinoma after renal transplantation. *Journal of Investigative Dermatology*, 2003, 120 (1), 99-103.

Alcina A, Fedetz M, Ndagire D, Fernandez O, Leyva L, Guerrero M, Abad-Grau MM, Arnal C, Delgado C, Lucas M, Izquierdo G et Matesanz F. IL2RA/CD25 gene polymorphisms: uneven association with multiple sclerosis (MS) and type 1 diabetes (T1D). *PLoS One*, 2009, 4 (1), e4137.

Alegre ML, Florquin S et Goldman M. Cellular mechanisms underlying acute graft rejection: time for reassessment. *Current Opinion in Immunology*, 2007, 19 (5), 563-568.

Alkassab F, Gourh P, Tan FK, McNearney T, Fischbach M, Ahn C, Arnett FC et Mayes MD. An allograft inflammatory factor 1 (AIF1) single nucleotide polymorphism (SNP) is associated with anticentromere antibody positive systemic sclerosis. *Rheumatology*, 2007, 46 (8), 1248-1251.

Allison AC et Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*, 2000, 47 (2-3), 85-118.

Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA et Rieder MJ. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *Journal of Leukocyte Biology*, 1996, 60 (5), 563-572.

Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, Hastings WD, Kassam N, Lei C, Chandwaskar R, Karman J, Su EW, Hirashima M, Bruce JN, Kane LP, Kuchroo VK et Hafler DA.

Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science*, 2007, 318 (5853), 1141-1143.

Anglicheau D, Legendre C, Beaune P et Thervet E. Cytochrome P450 3A polymorphisms and immunosuppressive drugs: an update. *Pharmacogenomics*, 2007, 8 (7), 835-849.

Anglicheau D, Thervet E, Etienne I, Hurault De Ligny B, Le Meur Y, Touchard G, Buchler M, Laurent-Puig P, Tregouet D, Beaune P, Daly A, Legendre C et Marquet P. CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2004, 75 (5), 422-433.

Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL et Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature Genetics*, 2000, 25 (2), 187-191.

Asadullah K, Prosch S, Audring H, Buttnerova I, Volk HD, Sterry W et Docke WD. A high prevalence of cytomegalovirus antigenaemia in patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis: an association with systemic tumour necrosis factor alpha overexpression. *British Journal of Dermatology*, 1999, 141 (1), 94-102.

Autieri MV. cDNA cloning of human allograft inflammatory factor-1: tissue distribution, cytokine induction, and mRNA expression in injured rat carotid arteries. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 228 (1), 29-37.

Azarian M, Busson M, Rocha V, Ribaud P, Peffault de Latour R, Bleux H, Lepage V, Charron D, Toubert A, Socie G et Loiseau P. The PTPN22 R620W polymorphism is associated with severe bacterial infections after human leukocyte antigen geno-identical haematopoietic stem-cell transplantations. *Transplantation*, 2008, 85 (12), 1859-1862.

Bandur S, Petrasek J, Hribova P, Novotna E, Brabcova I et Viklicky O. Haplotypic structure of ABCB1/MDR1 gene modifies the risk of the acute allograft rejection in renal transplant recipients. *Transplantation*, 2008, 86 (9), 1206-1213.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136 (2), 215-233.

Beecham GW, Martin ER, Li YJ, Slifer MA, Gilbert JR, Haines JL et Pericak-Vance MA. Genome-wide association study implicates a chromosome 12 risk locus for late-onset Alzheimer disease. *American Journal of Human Genetics*, 2009, 84 (1), 35-43.

Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT,

Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ et Gregersen PK. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *American Journal of Human Genetics*, 2004, 75 (2), 330-337.

Benedict CA, Loewendorf A, Garcia Z, Blazar BR et Janssen EM. Dendritic cell programming by cytomegalovirus stunts naive T cell responses via the PD-L1/PD-1 pathway. *Journal of Immunology*, 2008, 180 (7), 4836-4847.

Benichou G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Frontiers in Bioscience*, 1999, 4 D476-480.

Bertsias GK, Nakou M, Choulaki C, Raptopoulou A, Papadimitraki E, Goulielmos G, Kritikos H, Sidiropoulos P, Tzardi M, Kardassis D, Mamalaki C et Boumpas DT. Genetic, immunologic, and immunohistochemical analysis of the programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 2009, 60 (1), 207-218.

Bestard O, Nickel P, Cruzado JM, Schoenemann C, Boenisch O, Sefrin A, Grinyo JM, Volk HD et Reinke P. Circulating alloreactive T cells correlate with graft function in longstanding renal transplant recipients. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2008, 19 (7), 1419-1429.

Bochud PY, Magaret AS, Koelle DM, Aderem A et Wald A. Polymorphisms in TLR2 are associated with increased viral shedding and lesional rate in patients with genital herpes simplex virus Type 2 infection. *Journal of Infectious Diseases*, 2007, 196 (4), 505-509.

Boros P et Bromberg JS. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *American Journal of Transplantation*, 2006, 6 (4), 652-658.

Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni GF, Lucarelli P, Pellecchia M, Eisenbarth GS, Comings D et Mustelin T. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nature Genetics*, 2004, 36 (4), 337-338.

Bottini N, Vang T, Cucca F et Mustelin T. Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Seminars in Immunology*, 2006, 18 (4), 207-213.

Brennan DC. Cytomegalovirus in renal transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2001, 12 (4), 848-855.

Briscoe DM et Sayegh MH. A rendezvous before rejection: where do T cells meet transplant antigens? *Nature Medicine*, 2002, 8 (3), 220-222.

Brown KM, Kondeatis E, Vaughan RW, Kon SP, Farmer CK, Taylor JD, He X, Johnston A, Horsfield C, Janssen BJ, Gros P, Zhou W, Sacks SH et Sheerin NS. Influence of donor C3 allotype on late renal-transplantation outcome. *New England Journal of Medicine*, 2006, 354 (19), 2014-2023.

Cappellesso S, Valentin JF, Giraudeau B, Boulanger MD, Al-Najjar A, Buchler M, Halimi JM, Nivet H, Bardos P, Lebranchu Y et Watier H. Association of donor TNFRSF6 (FAS) gene polymorphism with acute rejection in renal transplant patients: a case-control study. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 2004, 19 (2), 439-443.

Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, Matsunami N, Ardlie KG, Civello D, Catanese JJ, Leong DU, Panko JM, McAllister LB, Hansen CB, Papenfuss J, Prescott SM, White TJ, Leppert MF, Krueger GG et Begovich AB. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *American Journal of Human Genetics*, 2007, 80 (2), 273-290.

Carreno BM et Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 2002, 20 29-53.

Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P et Watier H. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. *Blood*, 2002, 99 (3), 754-758.

Carvalho A, Pasqualotto AC, Pitzurra L, Romani L, Denning DW et Rodrigues F. Polymorphisms in toll-like receptor genes and susceptibility to pulmonary aspergillosis. *Journal of Infectious Diseases*, 2008, 197 (4), 618-621.

Cervera C, Lozano F, Saval N, Gimferrer I, Ibanez A, Suarez B, Linares L, Cofan F, Ricart MJ, Esforzado N, Marcos MA, Pumarola T, Oppenheimer F, Campistol JM et Moreno A. The influence of innate immunity gene receptors polymorphisms in renal transplant infections. *Transplantation*, 2007, 83 (11), 1493-1500.

Chae SC, Park YR, Lee YC, Lee JH et Chung HT. The association of TIM-3 gene polymorphism with atopic disease in Korean population. *Human Immunology*, 2004a, 65 (12), 1427-1431.

Chae SC, Park YR, Shim SC, Yoon KS et Chung HT. The polymorphisms of Th1 cell surface gene Tim-3 are associated in a Korean population with rheumatoid arthritis. *Immunology Letters*, 2004b, 95 (1), 91-95.

Chae SC, Park YR, Song JH, Shim SC, Yoon KS et Chung HT. The polymorphisms of Tim-1 promoter region are associated with rheumatoid arthritis in a Korean population. *Immunogenetics*, 2005, 56 (10), 696-701.

Chae SC, Song JH, Heo JC, Lee YC, Kim JW et Chung HT. Molecular variations in the promoter and coding regions of human Tim-1 gene and their association in Koreans with asthma. *Human Immunology*, 2003, 64 (12), 1177-1182.

Chae SC, Song JH, Pounsambath P, Yuan HY, Lee JH, Kim JJ, Lee YC et Chung HT. Molecular variations in Th1-specific cell surface gene Tim-3. *Experimental and Molecular Medicine*, 2004c, 36 (3), 274-278.

Chae SC, Song JH, Shim SC, Yoon KS et Chung HT. The exon 4 variations of Tim-1 gene are associated with rheumatoid arthritis in a Korean population. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004d, 315 (4), 971-975.

Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 2004, 4 (5), 336-347.

Chen TM, Kuo PL, Hsu CH, Tsai SJ, Chen MJ, Lin CW et Sun HS. Microsatellite in the 3' untranslated region of human fibroblast growth factor 9 (FGF9) gene exhibits pleiotropic effect on modulating FGF9 protein expression. *Human Mutation*, 2007, 28 (1), 98.

Citores MJ, Rua-Figueroa I, Rodriguez-Gallego C, Durantez A, Garcia-Laorden MI, Rodriguez-Lozano C, Rodriguez-Perez JC, Vargas JA et Perez-Aciego P. The dinucleotide repeat polymorphism in the 3'UTR of the CD154 gene has a functional role on protein expression and is associated with systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2004, 63 (3), 310-317.

Cohen S, Dadi H, Shaoul E, Sharfe N et Roifman CM. Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. *Blood*, 1999, 93 (6), 2013-2024.

Cooper AM et Khader SA. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends in Immunology*, 2007, 28 (1), 33-38.

Dantal J et Pohanka E. Malignancies in renal transplantation: an unmet medical need. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 2007, 22 Suppl 1 i4-10.

Dausset J. The major histocompatibility complex in man. *Science*, 1981, 213 (4515), 1469-1474.

de Jong EC, Smits HH et Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Seminars in Immunopathology*, 2005, 26 (3), 289-307.

Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R et O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*, 1996, 273 (5283), 1856-1862.

Degauque N, Mariat C, Kenny J, Zhang D, Gao W, Vu MD, Alexopoulos S, Oukka M, Umetsu DT, DeKruyff RH, Kuchroo V, Zheng XX et Strom TB. Immunostimulatory Tim-1-specific antibody deprograms Tregs and prevents transplant tolerance in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 2008, 118 (2), 735-741.

Del Galdo F, Maul GG, Jimenez SA et Artlett CM. Expression of allograft inflammatory factor 1 in tissues from patients with systemic sclerosis and in vitro differential expression of its isoforms in response to transforming growth factor beta. *Arthritis and Rheumatism*, 2006, 54 (8), 2616-2625.

Densem CG, Ray M, Hutchinson IV, Yonan N et Brooks NH. Interleukin-6 polymorphism: a genetic risk factor for cardiac transplant related coronary vasculopathy? *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2005, 24 (5), 559-565.

Ding H, Wu X et Gao W. PD-L1 is expressed by human renal tubular epithelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. *Clinical Immunology*, 2005, 115 (2), 184-191.

Djebli N, Picard N, Rerolle JP, Le Meur Y et Marquet P. Influence of the UGT2B7 promoter region and exon 2 polymorphisms and comedications on Acyl-MPAG production in vitro and in adult renal transplant patients. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2007, 17 (5), 321-330.

Dominici R, Cattaneo M, Malferrari G, Archi D, Mariani C, Grimaldi LM et Biunno I. Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha. *Immunogenetics*, 2002, 54 (2), 82-86.

Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, Ferrand C, Bamoulid J, Saas P, Kazory A, Chalopin JM et Tiberghien P. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney International*, 2005, 67 (6), 2454-2461.

European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. *Lancet*, 1995, 345 (8961), 1321-1325.

Fanciulli M, Norsworthy PJ, Petretto E, Dong R, Harper L, Kamesh L, Heward JM, Gough SC, de Smith A, Blakemore AI, Froguel P, Owen CJ, Pearce SH, Teixeira L, Guillevin L, Graham DS, Pusey CD, Cook HT, Vyse TJ et Aitman TJ. FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. *Nature Genetics*, 2007, 39 (6), 721-723.

Ferreiros-Vidal I, D'Alfonso S, Papasteriades C, Skopouli FN, Marchini M, Scorza R, Migliaresi S, Sebastiani GD, Endreffy E, Mavromati M, Kappou-Rigatou I, Ruzickova S, Dostal C, Schmidt RE, Witte T, Gomez-Reino JJ et Gonzalez A. Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe. *Genes and Immunity*, 2007, 8 (2), 138-146.

Fischereder M, Luckow B, Hocher B, Wuthrich RP, Rothenpieler U, Schneeberger H, Panzer U, Stahl RA, Hauser IA, Budde K, Neumayer H, Kramer BK, Land W et Schlondorff D. CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival. *Lancet*, 2001, 357 (9270), 1758-1761.

Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, Belmont JW, Boudreau A, Hardenbol P, Leal SM, Pasternak S, Wheeler DA, Willis TD, Yu F, Yang H, Zeng C, Gao Y, Hu H, Hu W, Li C, Lin W, Liu S, Pan H, Tang X, Wang J, Wang W, Yu J, Zhang B, Zhang Q, Zhao H, Zhao H, Zhou J, Gabriel SB, Barry R, Blumenstiel B, Camargo A, Defelice M, Faggart M, Goyette M, Gupta S, Moore J, Nguyen H, Onofrio RC, Parkin M, Roy J, Stahl E, Winchester E, Ziaugra L, Altshuler D, Shen Y, Yao Z, Huang W, Chu X, He Y, Jin L, Liu Y, Shen Y, Sun W, Wang H, Wang Y, Wang Y, Xiong X, Xu L, Waye MM, Tsui SK, Xue H, Wong JT, Galver LM, Fan JB, Gunderson K, Murray SS, Oliphant AR, Chee MS, Montpetit A, Chagnon F, Ferretti V, Leboeuf M, Olivier JF, Phillips MS, Roumy S, Sallee C, Verner A, Hudson TJ, Kwok PY, Cai D, Koboldt DC, Miller RD, Pawlikowska L, Taillon-Miller P, Xiao M, Tsui LC, Mak W, Song YQ, Tam PK, Nakamura Y, Kawaguchi T, Kitamoto T, Morizono T, Nagashima A, Ohnishi Y, Sekine A, Tanaka T, Tsunoda T, Deloukas P, Bird CP, Delgado M, Dermitzakis ET, Gwilliam R, Hunt S, Morrison J, Powell D, Stranger BE, Whittaker P, Bentley DR, Daly MJ, de Bakker PI, Barrett J, Chretien

YR, Maller J, McCarroll S, Patterson N, Pe'er I, Price A, Purcell S, Richter DJ, Sabeti P, Saxena R, Schaffner SF, Sham PC, Varilly P, Altshuler D, Stein LD, Krishnan L, Smith AV, Tello-Ruiz MK, Thorisson GA, Chakravarti A, Chen PE, Cutler DJ, Kashuk CS, Lin S, Abecasis GR, Guan W, Li Y, Munro HM, Qin ZS, Thomas DJ, McVean G, Auton A, Bottolo L, Cardin N, Eyheramendy S, Freeman C, Marchini J, Myers S, Spencer C, Stephens M, Donnelly P, Cardon LR, Clarke G, Evans DM, Morris AP, Weir BS, Tsunoda T, Mullikin JC, Sherry ST, Feolo M, Skol A, Zhang H, Zeng C, Zhao H, Matsuda I, Fukushima Y, Macer DR, Suda E, Rotimi CN, Adebamowo CA, Ajayi I, Aniagwu T, Marshall PA, Nkwodimmah C, Royal CD, Leppert MF, Dixon M, Peiffer A, Qiu R, Kent A, Kato K, Niikawa N, Adewole IF, Knoppers BM, Foster MW, Clayton EW, Watkin J, Gibbs RA, Belmont JW, Muzny D, Nazareth L, Sodergren E, Weinstock GM, Wheeler DA, Yakub I, Gabriel SB, Onofrio RC, Richter DJ, Ziaugra L, Birren BW, Daly MJ, Altshuler D, Wilson RK, Fulton LL, Rogers J, Burton J, Carter NP, Clee CM, Griffiths M, Jones MC, McLay K, Plumb RW, Ross MT, Sims SK, Willey DL, Chen Z, Han H, Kang L, Godbout M, Wallenburg JC, L'Archeveque P, Bellemare G, Saeki K, Wang H, An D, Fu H, Li Q, Wang Z, Wang R, Holden AL, Brooks LD, McEwen JE, Guyer MS, Wang VO, Peterson JL, Shi M, Spiegel J, Sung LM, Zacharia LF, Collins FS, Kennedy K, Jamieson R et Stewart J. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*, 2007, 449 (7164), 851-861.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR et Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine*, 2000, 192 (7), 1027-1034.

Freidin MB, Rudko AA, Kolokolova OV, Strelis AK et Puzyrev VP. Association between the 1188 A/C polymorphism in the human IL12B gene and Th1-mediated infectious diseases. *International Journal of Immunogenetics*, 2006, 33 (3), 231-232.

Gomez LM, Anaya JM et Martin J. Genetic influence of PTPN22 R620W polymorphism in tuberculosis. *Human Immunology*, 2005, 66 (12), 1242-1247.

Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, Nibbs RJ, Freedman BI, Quinones MP, Bamshad MJ, Murthy KK, Rovin BH, Bradley W, Clark RA, Anderson SA, O'Connell R J, Agan BK, Ahuja SS, Bologna R, Sen L, Dolan MJ et

Ahuja SK. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science*, 2005, 307 (5714), 1434-1440.

Goriely S et Goldman M. The interleukin-12 family: new players in transplantation immunity? *American Journal of Transplantation*, 2007, 7 (2), 278-284.

Graves PE, Siroux V, Guerra S, Klimecki WT et Martinez FD. Association of atopy and eczema with polymorphisms in T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-IL-2-inducible T-cell kinase gene cluster in chromosome 5 q 33. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2005, 116 (3), 650-656.

Grimm PC, McKenna R, Nickerson P, Russell ME, Gough J, Gospodarek E, Liu B, Jeffery J et Rush DN. Clinical rejection is distinguished from subclinical rejection by increased infiltration by a population of activated macrophages. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1999, 10 (7), 1582-1589.

Guy M, Lowe LC, Bretherton-Watt D, Mansi JL, Peckitt C, Bliss J, Wilson RG, Thomas V et Colston KW. Vitamin D receptor gene polymorphisms and breast cancer risk. *Clinical Cancer Research*, 2004, 10 (16), 5472-5481.

Ha SJ, Lee CH, Lee SB, Kim CM, Jang KL, Shin HS et Sung YC. A novel function of IL-12p40 as a chemotactic molecule for macrophages. *Journal of Immunology*, 1999, 163 (5), 2902-2908.

Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivinson AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR et Hauser SL. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *New England Journal of Medicine*, 2007, 357 (9), 851-862.

Haimila K, Turpeinen H, Alakulppi NS, Kyllonen LE, Salmela KT et Partanen J. Association of genetic variation in inducible costimulator gene with outcome of kidney transplantation. *Transplantation*, 2009, 87 (3), 393-396.

Hakonarson H et Grant SF. Genome-wide association studies in type 1 diabetes, inflammatory bowel disease and other immune-mediated disorders. *Seminars in Immunology*, 2009.

Halary F, Pitard V, Dlubek D, Krzysiek R, de la Salle H, Merville P, Dromer C, Emilie D, Moreau JF et Dechanet-Merville J. Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *Journal of Experimental Medicine*, 2005, 201 (10), 1567-1578.

Hall MA, McGlinn E, Coakley G, Fisher SA, Boki K, Middleton D, Kaklamani E, Moutsopoulos H, Loughran TP, Jr., Ollier WE, Panayi GS et Lanchbury JS. Genetic

polymorphism of IL-12 p40 gene in immune-mediated disease. *Genes and Immunity*, 2000, 1 (3), 219-224.

Halloran PF, Aprile MA, Farewell V, Ludwin D, Smith EK, Tsai SY, Bear RA, Cole EH, Fenton SS et Cattran DC. Early function as the principal correlate of graft survival. A multivariate analysis of 200 cadaveric renal transplants treated with a protocol incorporating antilymphocyte globulin and cyclosporine. *Transplantation*, 1988, 46 (2), 223-228.

Harari A, Zimmerli SC et Pantaleo G. Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Human Immunology*, 2004, 65 (5), 500-506.

Hasegawa K, Martin F, Huang G, Tumas D, Diehl L et Chan AC. PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells. *Science*, 2004, 303 (5658), 685-689.

Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S, Scheuermann EH, Wegner B, Gossmann J, Ackermann H, Seidl C, Hocher B, Zanger UM, Geiger H, Eichelbaum M et Schwab M. ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2005, 16 (5), 1501-1511.

Heininger A, Jahn G, Engel C, Notheisen T, Unertl K et Hamprecht K. Human cytomegalovirus infections in nonimmunosuppressed critically ill patients. *Critical Care Medicine*, 2001, 29 (3), 541-547.

Heinzel FP, Hujer AM, Ahmed FN et Rerko RM. In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. *Journal of Immunology*, 1997, 158 (9), 4381-4388.

Hirota T, Suzuki Y, Hasegawa K, Obara K, Matsuda A, Akahoshi M, Nakashima K, Cheng L, Takahashi N, Shimizu M, Doi S, Fujita K, Enomoto T, Ebisawa M, Yoshihara S, Nakamura Y, Kishi F, Shirakawa T et Tamari M. Functional haplotypes of IL-12B are associated with childhood atopic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2005, 116 (4), 789-795.

Hoffmann TW, Halimi J-M, Buchler M, Velge-Roussel F, Goudeau A, Al-Najjar A, Marliere J-F, Lebranchu Y et Baron C. Association between a polymorphism in the human programmed death-1 (PD-1) gene and CMV infection after kidney transplantation. *Journal of Medical Genetics*, 2009a jmg.2009.068841.

Hoffmann TW, Halimi JM, Buchler M, Velge-Roussel F, Al-Najjar A, Marliere JF, Lebranchu Y et Baron C. Impact of a polymorphism in the IL-12p40 gene on the

outcome of kidney transplantation. *Transplantation Proceedings*, 2009b, 41 (2), 654-656.

Hoffmann TW, Halimi JM, Buchler M, Velge-Roussel F, Goudeau A, Najjar AA, Boulanger MD, Houssaini TS, Marliere JF, Lebranchu Y et Baron C. Association between a polymorphism in the IL-12p40 gene and cytomegalovirus reactivation after kidney transplantation. *Transplantation*, 2008, 85 (10), 1406-1411.

Huang D, Cancilla MR et Morahan G. Complete primary structure, chromosomal localisation, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit. *Genes and Immunity*, 2000, 1 (8), 515-520.

Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Jin Z, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau NR, Phair J, Ho DD et Koup RA. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature Medicine*, 1996, 2 (11), 1240-1243.

Humar A, Gillingham KJ, Payne WD, Dunn DL, Sutherland DE et Matas AJ. Association between cytomegalovirus disease and chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation*, 1999, 68 (12), 1879-1883.

Hummel M, Zhang Z, Yan S, DePlaen I, Golia P, Varghese T, Thomas G et Abecassis MI. Allogeneic transplantation induces expression of cytomegalovirus immediate-early genes in vivo: a model for reactivation from latency. *Journal of Virology*, 2001, 75 (10), 4814-4822.

Hussain T, Burch M, Fenton MJ, Whitmore PM, Rees P, Elliott M et Aurora P. Positive pretransplantation cytomegalovirus serology is a risk factor for cardiac allograft vasculopathy in children. *Circulation*, 2007, 115 (13), 1798-1805.

Iannone MA, Taylor JD, Chen J, Li MS, Rivers P, Slentz-Kesler KA et Weiner MP. Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry. *Cytometry*, 2000, 39 (2), 131-140.

Iobagiu C, Lambert C, Normand M et Genin C. Microsatellite profile in hormonal receptor genes associated with breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2006, 95 (2), 153-159.

Israni AK, Li N, Cizman BB, Snyder J, Abrams J, Joffe M, Rebbeck T et Feldman HI. Association of donor inflammation- and apoptosis-related genotypes and delayed allograft function after kidney transplantation. *American Journal of Kidney Diseases*, 2008, 52 (2), 331-339.

Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M, Pachucki J, Ringel MD, Jarzab B et de la Chapelle A. Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106 (5), 1502-1505.

Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR et de la Chapelle A. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105 (20), 7269-7274.

Johansson M, Arlestig L, Moller B et Rantapaa-Dahlqvist S. Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 2005, 52 (6), 1665-1669.

Kamoun M, Holmes JH, Israni AK, Kearns JD, Teal V, Yang WP, Rosas SE, Joffe MM, Li H et Feldman HI. HLA-A amino acid polymorphism and delayed kidney allograft function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105 (48), 18883-18888.

Karim M, Bushell AR et Wood KJ. Regulatory T cells in transplantation. *Current Opinion in Immunology*, 2002, 14 (5), 584-591.

Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, Koulmanda M, Freeman GJ, Sayegh MH et Sharpe AH. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, 2006, 203 (4), 883-895.

Khader SA, Partida-Sanchez S, Bell G, Jelley-Gibbs DM, Swain S, Pearl JE, Ghilardi N, Desauvage FJ, Lund FE et Cooper AM. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of Experimental Medicine*, 2006, 203 (7), 1805-1815.

Khoury JA, Storch GA, Bohl DL, Schuessler RM, Torrence SM, Lockwood M, Gaudreault-Keener M, Koch MJ, Miller BW, Hardinger KL, Schnitzler MA et Brennan DC. Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 2006, 6 (9), 2134-2143.

Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF, Hayden HS, Sampas N, Graves T, Hansen N, Teague B, Alkan C, Antonacci F, Haugen E, Zerr T, Yamada NA, Tsang P, Newman TL, Tuzun E, Cheng Z, Ebling HM, Tusneem N, David R, Gillett W, Phelps KA, Weaver M, Saranga D, Brand A, Tao W, Gustafson E, McKernan K, Chen L, Malig M, Smith JD, Korn JM, McCarroll SA, Altshuler DA, Peiffer DA, Dorschner M,

Stamatoyannopoulos J, Schwartz D, Nickerson DA, Mullikin JC, Wilson RK, Bruhn L, Olson MV, Kaul R, Smith DR et Eichler EE. Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature*, 2008, 453 (7191), 56-64.

Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, Paya CV et Razonable RR. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 2007, 44 (10), 1315-1320.

Kim J et Bartel DP. Allelic imbalance sequencing reveals that single-nucleotide polymorphisms frequently alter microRNA-directed repression. *Nature Biotechnology*, 2009, 27 (5), 472-477.

Kitazawa Y, Fujino M, Wang Q, Kimura H, Azuma M, Kubo M, Abe R et Li XK. Involvement of the programmed death-1/programmed death-1 ligand pathway in CD4+CD25+ regulatory T-cell activity to suppress alloimmune responses. *Transplantation*, 2007, 83 (6), 774-782.

Kliem V, Fricke L, Wollbrink T, Burg M, Radermacher J et Rohde F. Improvement in Long-Term Renal Graft Survival due to CMV Prophylaxis with Oral Ganciclovir: Results of a Randomized Clinical Trial. *American Journal of Transplantation*, 2008, 8 975-983.

Koguchi K, Anderson DE, Yang L, O'Connor KC, Kuchroo VK et Hafler DA. Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*, 2006, 203 (6), 1413-1418.

Kong EK, Prokunina-Olsson L, Wong WH, Lau CS, Chan TM, Alarcon-Riquelme M et Lau YL. A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese. *Arthritis and Rheumatism*, 2005, 52 (4), 1058-1062.

Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Maurer M et Wiendl H. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 2005, 58 (1), 50-57.

Krüger B, Schröppel B et Murphy B. Genetic polymorphisms and the fate of the transplanted organ. *Transplantation Reviews*, 2008, 22 131-140.

Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH et Freeman GJ. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 2003, 3 (6), 454-462.

Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VE, Chang M, Ramos P, Baechler EC, Batliwalla FM, Novitzke J, Williams AH, Gillett C, Rodine P, Graham RR, Ardlie KG, Gaffney PM, Moser KL, Petri M, Begovich AB, Gregersen PK et Behrens TW. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine

phosphatase PTPN22 with human SLE. *American Journal of Human Genetics*, 2004, 75 (3), 504-507.

Lafarge X, Merville P, Cazin MC, Berge F, Potaux L, Moreau JF et Dechanet-Merville J. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *Journal of Infectious Diseases*, 2001, 184 (5), 533-541.

Laing ME, Dicker P, Moloney FJ, Ho WL, Murphy GM, Conlon P, Whitehead AS et Shields DC. Association of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of squamous cell carcinoma in renal transplant patients. *Transplantation*, 2007, 84 (1), 113-116.

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH et Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*, 2001, 2 (3), 261-268.

Latchman YE, Liang SC, Wu Y, Chernova T, Sobel RA, Klemm M, Kuchroo VK, Freeman GJ et Sharpe AH. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101 (29), 10691-10696.

Lautenschlager I, Soots A, Krogerus L, Kauppinen H, Saarinen O, Bruggeman C et Ahonen J. Effect of cytomegalovirus on an experimental model of chronic renal allograft rejection under triple-drug treatment in the rat. *Transplantation*, 1997, 64 (3), 391-398.

Le Meur Y, Djebli N, Szelag JC, Hoizey G, Toupance O, Rerolle JP et Marquet P. CYP3A5*3 influences sirolimus oral clearance in de novo and stable renal transplant recipients. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2006, 80 (1), 51-60.

Lee SH, Walker DR, Cregan PB et Boerma HR. Comparison of four flow cytometric SNP detection assays and their use in plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 110 (1), 167-174.

Lee SH, Webb JR et Vidal SM. Innate immunity to cytomegalovirus: the Cmv1 locus and its role in natural killer cell function. *Microbes and Infection*, 2002, 4 (15), 1491-1503.

Lemström KB, Bruning JH, Bruggeman CA, Koskinen PK, Aho PT, Yilmaz S, Lautenschlager IT et Häyry PJ. Cytomegalovirus infection-enhanced allograft

arteriosclerosis is prevented by DHPG prophylaxis in the rat. *Circulation*, 1994a, 90 (4), 1969-1978.

Lemström KB, Koskinen PK, Bruning JH, Bruggeman CA, Lautenschlager IT et Häyry PJ. Effect of ganciclovir prophylaxis on cytomegalovirus-enhanced allograft arteriosclerosis. *Transplant International*, 1994b, 7 Suppl 1 S383-384.

Li JS, Liu QJ, Wang P, Li HC, Wei CH, Guo CH et Gong YQ. Absence of association between two insertion/deletion coding genetic polymorphisms of TIM-1 gene and asthma in Chinese Han population. *International Journal of Immunogenetics*, 2006, 33 (6), 417-422.

Lindholm A, Ohlman S, Albrechtsen D, Tufveson G, Persson H et Persson NH. The impact of acute rejection episodes on long-term graft function and outcome in 1347 primary renal transplants treated by 3 cyclosporine regimens. *Transplantation*, 1993, 56 (2), 307-315.

Liu G, Ma H, Jiang L et Zhao Y. Allograft inflammatory factor-1 and its immune regulation. *Autoimmunity*, 2007, 40 (2), 95-102.

Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA et Landau NR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 1996, 86 (3), 367-377.

Magram J, Connaughton SE, Warrier RR, Carvajal DM, Wu CY, Ferrante J, Stewart C, Sarmiento U, Faherty DA et Gately MK. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity*, 1996, 4 (5), 471-481.

Mandelbrot DA, Furukawa Y, McAdam AJ, Alexander SI, Libby P, Mitchell RN et Sharpe AH. Expression of B7 molecules in recipient, not donor, mice determines the survival of cardiac allografts. *Journal of Immunology*, 1999, 163 (7), 3753-3757.

Martinez A, Mas A, de las Heras V, Arroyo R, Fernandez-Arquero M, de la Concha EG et Urcelay E. Early B-cell Factor gene association with multiple sclerosis in the Spanish population. *BMC Neurology*, 2005, 5 19.

Mattner F, Fischer S, Guckes S, Jin S, Kaulen H, Schmitt E, Rude E et Germann T. The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *European Journal of Immunology*, 1993, 23 (9), 2202-2208.

Mattner F, Ozmen L, Podlaski FJ, Wilkinson VL, Presky DH, Gately MK et Alber G. Treatment with homodimeric interleukin-12 (IL-12) p40 protects mice from IL-12-

dependent shock but not from tumor necrosis factor alpha-dependent shock. *Infection and Immunity*, 1997, 65 (11), 4734-4737.

McGregor JM, Harwood CA, Brooks L, Fisher SA, Kelly DA, O'Nions J, Young AR, Surentheran T, Breuer J, Millard TP, Lewis CM, Leigh IM, Storey A et Crook T. Relationship between p53 codon 72 polymorphism and susceptibility to sunburn and skin cancer. *Journal of Investigative Dermatology*, 2002, 119 (1), 84-90.

McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O, Potter M, Kuchroo VK, Barsh GS, Freeman GJ, Umetsu DT et DeKruyff RH. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nature Immunology*, 2001, 2 (12), 1109-1116.

Meyers JH, Chakravarti S, Schlesinger D, Illes Z, Waldner H, Umetsu SE, Kenny J, Zheng XX, Umetsu DT, DeKruyff RH, Strom TB et Kuchroo VK. TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nature Immunology*, 2005, 6 (5), 455-464.

Michon L, Hamburger J, Oeconomos N, Delinotte P, Richet G, Vaysse J et Antoine B. An attempted kidney transplantation in man: medical and biological aspects. *Presse Medicale*, 1953, 61 (70), 1419-1423.

Michou L, Lasbleiz S, Rat AC, Migliorini P, Balsa A, Westhovens R, Barrera P, Alves H, Pierlot C, Glikmans E, Garnier S, Dausset J, Vaz C, Fernandes M, Petit-Teixeira E, Lemaire I, Pascual-Salcedo D, Bombardieri S, Dequeker J, Radstake TR, Van Riel P, van de Putte L, Lopes-Vaz A, Prum B, Bardin T, Dieude P et Cornelis F. Linkage proof for PTPN22, a rheumatoid arthritis susceptibility gene and a human autoimmunity gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104 (5), 1649-1654.

Mikols CL, Yan L, Norris JY, Russell TD, Khalifah AP, Hachem RR, Chakinala MM, Yusen RD, Castro M, Kuo E, Patterson GA, Mohanakumar T, Trulock EP et Walter MJ. IL-12 p80 is an innate epithelial cell effector that mediates chronic allograft dysfunction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2006, 174 (4), 461-470.

Mishra PJ et Bertino JR. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics*, 2009, 10 (3), 399-416.

Miteva L et Stanilova S. The combined effect of interleukin (IL)-10 and IL-12 polymorphisms on induced cytokine production. *Human Immunology*, 2008, 69 (9), 562-566.

Moal MC. Tumeurs solides après transplantation rénale. *Nephrologie et Therapeutique*, 2008, 4 (Suppl 3), S214-217.

Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, Manning S, Greenfield EA, Coyle AJ, Sobel RA, Freeman GJ et Kuchroo VK. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*, 2002, 415 (6871), 536-541.

Morahan G, Boutlis CS, Huang D, Pain A, Saunders JR, Hobbs MR, Granger DL, Weinberg JB, Peshu N, Mwaikambo ED, Marsh K, Roberts DJ et Anstey NM. A promoter polymorphism in the gene encoding interleukin-12 p40 (IL12B) is associated with mortality from cerebral malaria and with reduced nitric oxide production. *Genes and Immunity*, 2002a, 3 (7), 414-418.

Morahan G, Huang D, Wu M, Holt BJ, White GP, Kendall GE, Sly PD et Holt PG. Association of IL12B promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children. *Lancet*, 2002b, 360 (9331), 455-459.

Morahan G, Huang D, Ymer SI, Cancilla MR, Stephen K, Dabadghao P, Werther G, Tait BD, Harrison LC et Colman PG. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. *Nature Genetics*, 2001, 27 (2), 218-221.

Mueller T, Mas-Marques A, Sarrazin C, Wiese M, Halangk J, Witt H, Ahlenstiel G, Spengler U, Goebel U, Wiedenmann B, Schreier E et Berg T. Influence of interleukin 12B (IL12B) polymorphisms on spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*, 2004, 41 (4), 652-658.

Muller-Berghaus J, Kern K, Paschen A, Nguyen XD, Kluter H, Morahan G et Schadendorf D. Deficient IL-12p70 secretion by dendritic cells based on IL12B promoter genotype. *Genes and Immunity*, 2004, 5 (5), 431-434.

Muller-Steinhardt M, Fricke L, Muller B, Ebel B, Kirchner H et Hartel C. Cooperative influence of the interleukin-6 promoter polymorphisms -597, -572 and -174 on long-term kidney allograft survival. *American Journal of Transplantation*, 2004, 4 (3), 402-406.

Muller-Steinhardt M, Hartel C, Muller B, Kirchner H et Fricke L. The interleukin-6 -174promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival. *Kidney International*, 2002, 62 (5), 1824-1827.

Nielsen C, Hansen D, Husby S, Jacobsen BB et Lillevang ST. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens*, 2003, 62 (6), 492-497.

Ninomiya T, Takimoto H, Matsuzaki G, Hamano S, Yoshida H, Yoshikai Y, Kimura G et Nomoto K. Vgamma1+ gammadelta T cells play protective roles at an early phase of murine cytomegalovirus infection through production of interferon-gamma. *Immunology*, 2000, 99 (2), 187-194.

Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N et Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 1999, 11 (2), 141-151.

Ongagna JC, Pinget M et Belcourt A. Vitamin D-binding protein gene polymorphism association with IA-2 autoantibodies in type 1 diabetes. *Clinical Biochemistry*, 2005, 38 (5), 415-419.

Orange JS et Biron CA. Characterization of early IL-12, IFN-alphabeta, and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *Journal of Immunology*, 1996, 156 (12), 4746-4756.

Orozco G, Sanchez E, Gonzalez-Gay MA, Lopez-Nevot MA, Torres B, Caliz R, Ortego-Centeno N, Jimenez-Alonso J, Pascual-Salcedo D, Balsa A, de Pablo R, Nunez-Roldan A, Gonzalez-Escribano MF et Martin J. Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 2005, 52 (1), 219-224.

Otieno FG, Lopez AM, Jimenez SA, Gentiletti J et Artlett CM. Allograft inflammatory factor-1 and tumor necrosis factor single nucleotide polymorphisms in systemic sclerosis. *Tissue Antigens*, 2007, 69 (6), 583-591.

Otley CC, Cherikh WS, Salasche SJ, McBride MA, Christenson LJ et Kauffman HM. Skin cancer in organ transplant recipients: effect of pretransplant end-organ disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2005, 53 (5), 783-790.

Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, Linsley PS, Thompson CB et Riley JL. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25 (21), 9543-9553.

Pawlik A, Domanski L, Rozanski J, Florczak M, Wrzesniewska J, Dutkiewicz G, Dabrowska-Zamojcin E et Gawronska-Szklarz B. The cytokine gene polymorphisms in patients with chronic kidney graft rejection. *Transplant Immunology*, 2005, 14 (1), 49-52.

Pawlik A, Kurzawski M, Szczepanik T, Dziedziejko V, Safranow K, Borowiec-Chlopek Z, Giedrys-Kalemba S et Drozdzik M. Association of allograft inflammatory factor-1 gene polymorphism with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*, 2008, 72 (2), 171-175.

Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH et Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet*, 2004, 364 (9447), 1814-1827.

Piccotti JR, Chan SY, Li K, Eichwald EJ et Bishop DK. Differential effects of IL-12 receptor blockade with IL-12 p40 homodimer on the induction of CD4+ and CD8+ IFN-gamma-producing cells. *Journal of Immunology*, 1997, 158 (2), 643-648.

Ponciano VC, Renesto PG, Nogueira E, Rangel EB, Cenedeze MA, Franco MF, Camara NO et Pacheco-Silva A. Tim-3 expression in human kidney allografts. *Transplant Immunology*, 2007, 17 (3), 215-222.

Ponticelli C. Renal transplantation 2004: where do we stand today? *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 2004, 19 (12), 2937-2947.

Potena L, Holweg CT, Chin C, Luikart H, Weisshaar D, Narasimhan B, Fearon WF, Lewis DB, Cooke JP, Mocarski ES et Valantine HA. Acute rejection and cardiac allograft vascular disease is reduced by suppression of subclinical cytomegalovirus infection. *Transplantation*, 2006, 82 (3), 398-405.

Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ et Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *European Journal of Immunogenetics*, 1999, 26 (1), 1-3.

Presti RM, Pollock JL, Dal Canto AJ, O'Guin AK et Virgin HWt. Interferon gamma regulates acute and latent murine cytomegalovirus infection and chronic disease of the great vessels. *Journal of Experimental Medicine*, 1998, 188 (3), 577-588.

Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, Brookes AJ, Tentler D, Kristjansdottir H, Grondal G, Bolstad AI, Svenungsson E, Lundberg I, Sturfelt G, Jonssen A, Truedsson L, Lima G, Alcocer-Varela J, Jonsson R, Gyllensten UB, Harley JB, Alarcon-Segovia D, Steinsson K et Alarcon-Riquelme ME. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nature Genetics*, 2002, 32 (4), 666-669.

Prokunina L, Gunnarsson I, Sturfelt G, Truedsson L, Seligman VA, Olson JL, Seldin MF, Criswell LA et Alarcon-Riquelme ME. The systemic lupus erythematosus-associated PDCD1 polymorphism PD1.3A in lupus nephritis. *Arthritis and Rheumatism*, 2004, 50 (1), 327-328.

Qu HQ, Montpetit A, Ge B, Hudson TJ et Polychronakos C. Toward further mapping of the association between the IL2RA locus and type 1 diabetes. *Diabetes*, 2007, 56 (4), 1174-1176.

Ramsay HM, Harden PN, Reece S, Smith AG, Jones PW, Strange RC et Fryer AA. Polymorphisms in glutathione S-transferases are associated with altered risk of nonmelanoma skin cancer in renal transplant recipients: a preliminary analysis. *Journal of Investigative Dermatology*, 2001, 117 (2), 251-255.

Reddehase MJ, Mutter W, Munch K, Buhring HJ et Koszinowski UH. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *Journal of Virology*, 1987, 61 (10), 3102-3108.

Reddy MV, Johansson M, Sturfelt G, Jonsen A, Gunnarsson I, Svenungsson E, Rantapaa-Dahlqvist S et Alarcon-Riquelme ME. The R620W C/T polymorphism of the gene PTPN22 is associated with SLE independently of the association of PDCD1. *Genes and Immunity*, 2005, 6 (8), 658-662.

Reed AJ, Noorchashm H, Rostami SY, Zarrabi Y, Perate AR, Jeganathan AN, Caton AJ et Naji A. Alloreactive CD4 T cell activation in vivo: an autonomous function of the indirect pathway of alloantigen presentation. *Journal of Immunology*, 2003, 171 (12), 6502-6509.

Renesto PG, Ponciano VC, Cenedeze MA, Camara NO et Pacheco-Silva A. High Expression of Tim-3 mRNA in Urinary Cells from Kidney Transplant Recipients with Acute Rejection. *American Journal of Transplantation*, 2007.

Rieck M, Arechiga A, Onengut-Gumuscu S, Greenbaum C, Concannon P et Buckner JH. Genetic variation in PTPN22 corresponds to altered function of T and B lymphocytes. *Journal of Immunology*, 2007, 179 (7), 4704-4710.

Roussey-Kesler G, Brouard S, Ballet C, Moizant F, Moreau A, Guillet M, Smit H, Usal C et Soulillou JP. Exhaustive depletion of graft resident dendritic cells: marginally delayed rejection but strong alteration of graft infiltration. *Transplantation*, 2005, 80 (4), 506-513.

Ruggiero M, Pacini S, Aterini S, Fallai C, Ruggiero C et Pacini P. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with metastatic breast cancer. *Oncology Research*, 1998, 10 (1), 43-46.

Ruzek MC, Miller AH, Opal SM, Pearce BD et Biron CA. Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. *Journal of Experimental Medicine*, 1997, 185 (7), 1185-1192.

Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, Schubart A, Sanchez-Fueyo A, Zheng XX, Coyle AJ, Strom TB, Freeman GJ et Kuchroo VK. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand

regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nature Immunology*, 2003, 4 (11), 1102-1110.

Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES et Altshuler D. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 2001, 409 (6822), 928-933.

Sagedal S, Hartmann A et Rollag H. The impact of early cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients. *Clinical Microbiology and Infection*, 2005, 11 (7), 518-530.

Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, Degre M, Holter E, Foss A, Osnes K, Leivestad T, Fauchald P et Rollag H. A prospective study of the natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal allograft recipients. *Transplantation*, 2000, 70 (8), 1166-1174.

Sanchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, Domenig C, Zheng XX, Sabatos CA, Manlongat N, Bender O, Kamradt T, Kuchroo VK, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ et Strom TB. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nature Immunology*, 2003, 4 (11), 1093-1101.

Santiago JL, Martinez A, de la Calle H, Fernandez-Arquero M, Figueredo MA, de la Concha EG et Urcelay E. Susceptibility to type 1 diabetes conferred by the PTPN22 C1858T polymorphism in the Spanish population. *BMC Medical Genetics*, 2007, 8 54.

Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burtt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ, Hughes TE, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez JC, Meyer J, Ardlie K, Bengtsson Bostrom K, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon HN, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orho-Melander M, Rastam L, Speliotes EK, Taskinen MR, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjogren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel SB, Chirn GW, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Ricke

D et Purcell S. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science*, 2007, 316 (5829), 1331-1336.

Schoop R, Wahl P, Le Hir M, Heemann U, Wang M et Wuthrich RP. Suppressed T-cell activation by IFN-gamma-induced expression of PD-L1 on renal tubular epithelial cells. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 2004, 19 (11), 2713-2720.

Schwartz R, Eisner A et Dameshek W. The effect of 6-mercaptopurine on primary and secondary immune responses. *Journal of Clinical Investigation*, 1959, 38 (8), 1394-1403.

Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding CJ, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS et Boehnke M. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science*, 2007, 316 (5829), 1341-1345.

Sester U, Presser D, Dirks J, Gartner BC, Kohler H et Sester M. PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus- specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *American Journal of Transplantation*, 2008, 8 (7), 1486-1497.

Sharpe AH et Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nature Reviews. Immunology*, 2002, 2 (2), 116-126.

Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R et Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology*, 2007, 8 (3), 239-245.

Shi Z, Wakil AE et Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94 (20), 10663-10668.

Shibasaki F, Hallin U et Uchino H. Calcineurin as a multifunctional regulator. *Journal of Biochemistry*, 2002, 131 (1), 1-15.

Sibinga NE, Feinberg MW, Yang H, Werner F et Jain MK. Macrophage-restricted and interferon gamma-inducible expression of the allograft inflammatory factor-1 gene requires Pu.1. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (18), 16202-16210.

Sieburth D, Jabs EW, Warrington JA, Li X, Lasota J, LaForgia S, Kelleher K, Huebner K, Wasmuth JJ et Wolf SF. Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12)

composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. *Genomics*, 1992, 14 (1), 59-62.

Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C et Froguel P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*, 2007, 445 (7130), 881-885.

Soderberg-Naucler C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *Journal of Internal Medicine*, 2006, 259 (3), 219-246.

Söderberg-Nauclér C. HCMV microinfections in inflammatory diseases and cancer. *Journal of Clinical Virology*, 2008, 41 (3), 218-223.

Söderberg-Nauclér C, Fish KN et Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell*, 1997, 91 (1), 119-126.

Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickeleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN et Valente M. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *American Journal of Transplantation*, 2008, 8 (4), 753-760.

Sollinger HW. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation*, 1995, 60 (3), 225-232.

Stanilova S et Miteva L. Taq-I polymorphism in 3'UTR of the IL-12B and association with IL-12p40 production from human PBMC. *Genes and Immunity*, 2005, 6 (4), 364-366.

Sun W, He X, Guo Z, Wang Q, Li X, Rayner J, Zhang L, Wang J et Cao X. IL-12p40-overexpressing immature dendritic cells induce T cell hyporesponsiveness in vitro but accelerate allograft rejection in vivo: role of NK cell activation and interferon-gamma production. *Immunology Letters*, 2004, 94 (3), 191-199.

Taylor AL, Watson CJ et Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2005, 56 (1), 23-46.

Tena-Tomas C, de Messias-Reason I, Song le H, Tomiuk J, Kemsner PG et Kun JF. A globally occurring indel polymorphism in the promoter of the IFNA2 gene is not associated with severity of malaria but with the positivity rate of HCV. *BMC Genetics*, 2008, 9 80.

The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. . *Transplantation*, 1996, 61 (7), 1029-1037.

Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 2003, 3 (2), 133-146.

Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Sekiya T, Hirai K, Fujita H, Asano N, Kishimoto M, Tanida Y, Kakinuma T, Mitsui H, Tada Y, Wakugawa M, Torii H, Komine M, Asahina A et Tamaki K. Interleukin-12 p40 gene (IL12B) 3'-untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *Journal of Dermatological Science*, 2002, 30 (2), 161-166.

Ueno T, Habicht A, Clarkson MR, Albin MJ, Yamaura K, Boenisch O, Popoola J, Wang Y, Yagita H, Akiba H, Ansari MJ, Yang J, Turka LA, Rothstein DM, Padera RF, Najafian N et Sayegh MH. The emerging role of T cell Ig mucin 1 in alloimmune responses in an experimental mouse transplant model. *Journal of Clinical Investigation*, 2008, 118 (2), 742-751.

Umetsu SE, Lee WL, McIntire JJ, Downey L, Sanjanwala B, Akbari O, Berry GJ, Nagumo H, Freeman GJ, Umetsu DT et DeKruyff RH. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nature Immunology*, 2005, 6 (5), 447-454.

Urcelay E, Santiago JL, Mas A, Martinez A, de Las Heras V, Arroyo R et de la Concha EG. Role of interleukin 4 in Spanish multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, 2005, 168 (1-2), 164-167.

Utans U, Arceci RJ, Yamashita Y et Russell ME. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *Journal of Clinical Investigation*, 1995, 95 (6), 2954-2962.

van de Weyer PS, Muehlfeit M, Klose C, Bonventre JV, Walz G et Kuehn EW. A highly conserved tyrosine of Tim-3 is phosphorylated upon stimulation by its ligand galectin-9. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 351 (2), 571-576.

van Veen T, Crusius JB, Schrijver HM, Bouma G, Killestein J, van Winsen L, Salvador Pena A, Polman CH et Uitdehaag BM. Interleukin-12p40 genotype plays a role in the susceptibility to multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 2001, 50 (2), 275.

Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orru V, Zavattari P, Nika K, Tautz L, Tasken K, Cucca F, Mustelin T et Bottini N. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nature Genetics*, 2005, 37 (12), 1317-1319.

Varagunam M, Yaqoob MM, Dohler B et Opelz G. C3 polymorphisms and allograft outcome in renal transplantation. *New England Journal of Medicine*, 2009, 360 (9), 874-880.

Velthuis JH, Mol WM, Weimar W et Baan CC. CD4+CD25bright+ regulatory T cells can mediate donor nonreactivity in long-term immunosuppressed kidney allograft patients. *American Journal of Transplantation*, 2006, 6 (12), 2955-2964.

von Müller L, Klemm A, Durmus N, Weiss M, Suger-Wiedeck H, Schneider M, Hampl W et Mertens T. Cellular immunity and active human cytomegalovirus infection in patients with septic shock. *Journal of Infectious Diseases*, 2007, 196 (9), 1288-1295.

Waeckerle-Men Y, Starke A et Wuthrich RP. PD-L1 partially protects renal tubular epithelial cells from the attack of CD8+ cytotoxic T cells. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 2007, 22 (6), 1527-1536.

Waldmann H et Cobbold S. Regulating the immune response to transplants. a role for CD4+ regulatory cells? *Immunity*, 2001, 14 (4), 399-406.

Wang H, Hosiawa KA, Min W, Yang J, Zhang X, Garcia B, Ichim TE, Zhou D, Lian D, Kelvin DJ et Zhong R. Cytokines regulate the pattern of rejection and susceptibility to cyclosporine therapy in different mouse recipient strains after cardiac allografting. *Journal of Immunology*, 2003, 171 (7), 3823-3836.

Watano K, Iwabuchi K, Fujii S, Ishimori N, Mitsuhashi S, Ato M, Kitabatake A et Onoe K. Allograft inflammatory factor-1 augments production of interleukin-6, -10 and -12 by a mouse macrophage line. *Immunology*, 2001, 104 (3), 307-316.

Whittaker JR, Veith FJ, Soberman R, Lalezari P, Tellis I, Freed SZ et Gliedman ML. The fate of the renal transplant with delayed function. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*, 1973, 136 (6), 919-922.

Wisniewski A, Kusztal M, Magott-Procelewska M, Klinger M, Jasek M, Luszczek W, Nowak I, Kosmaczewska A, Ciszak L, Frydecka I, Gorski A et Kusnierczyk P. Possible association of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene promoter single nucleotide polymorphism with acute rejection of allogeneic kidney transplant. *Transplantation Proceedings*, 2006, 38 (1), 56-58.

Xiao S, Najafian N, Reddy J, Albin M, Zhu C, Jensen E, Imitola J, Korn T, Anderson AC, Zhang Z, Gutierrez C, Moll T, Sobel RA, Umetsu DT, Yagita H, Akiba H, Strom T, Sayegh MH, DeKruyff RH, Khoury SJ et Kuchroo VK. Differential engagement of Tim-1 during activation can positively or negatively costimulate T cell expansion and effector function. *Journal of Experimental Medicine*, 2007, 204 (7), 1691-1702.

Yang L, Anderson DE, Kuchroo J et Hafler DA. Lack of TIM-3 immunoregulation in multiple sclerosis. *Journal of Immunology*, 2008, 180 (7), 4409-4414.

Yu KD, Di GH, Yuan WT, Fan L, Wu J, Hu Z, Shen ZZ, Zheng Y, Huang W et Shao ZM. Functional polymorphisms, altered gene expression and genetic association link NRH:quinone oxidoreductase 2 to breast cancer with wild-type p53. *Human Molecular Genetics*, 2009, 18 (13), 2502-2517.

Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, Kustra R, Tenesa A, Farrington SM, Prendergast J, Olschwang S, Chiang T, Crowdy E, Ferretti V, Laflamme P, Sundararajan S, Roumy S, Olivier JF, Robidoux F, Sladek R, Montpetit A, Campbell P, Bezieau S, O'Shea AM, Zogopoulos G, Cotterchio M, Newcomb P, McLaughlin J, Younghusband B, Green R, Green J, Porteous ME, Campbell H, Blanche H, Sahbatou M, Tubacher E, Bonaiti-Pellie C, Buecher B, Riboli E, Kury S, Chanock SJ, Potter J, Thomas G, Gallinger S, Hudson TJ et Dunlop MG. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nature Genetics*, 2007, 39 (8), 989-994.

Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB et Kuchroo VK. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature Immunology*, 2005, 6 (12), 1245-1252.

Annexes

Annexe 1. Abréviations des produits chimiques utilisés.

EDC : 1-éthyl-3-[3-diméthylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

MES : acide 2-[N-morpholino] éthanesulfonique

PBS : « phosphate buffer saline », ou tampon phosphate salin

TE : Tris-EDTA (Tris-HCl à 10 mM + EDTA à 1 mM, pH 8)

Annexe 2. Protocole de PCR.

Réactifs (Fisher Bioblock®)	Concentration de départ	Concentration ou quantité voulue dans le tube
Tampon de la Taq polymérase	10 X	1 X
Chlorure de magnésium ($MgCl_2$)	50 mM	1,5 mM
Désoxyribo-nucléotides triphosphates (dNTPs)	10 mM	0,2 mM
Amorce(s) sens	10 µM	0,2 µM
Amorce(s) antisens	10 µM	0,2 µM
Taq polymérase	5 unités/µL	1 unité
ADN du patient	20 ng/µL	50 ng
Eau ultra-pure	Quantité suffisante pour 25 µL	

Programme du thermocycleur :

3 min à 95°C

30 s à 95°C
30 s à 60°C
30 s à 72°C
} 35 cycles

5 min à 72°C

Annexe 3. Manuscrit sur *IL12B* 3'UTR, PD-1.3 et le devenir du greffon rénal, soumis à *Clinical Transplantation* (pdf).

No association between IL-12 and PD-1 gene polymorphisms and graft rejection, skin cancer or delayed graft function after kidney transplantation in a large cohort of patients.

Thomas W. Hoffmann[1,3], Jean-Michel Halimi[1,2,3], Mathias Büchler[1,2,3], Florence Velge-Roussel[1,3], Azmi Al-Najjar[2], Jean-Frédéric Marliere[2], Yvon Lebranchu[1,2,3] and Christophe Baron[1,2,3,*]

[1] Université François Rabelais de Tours, EA 4245 Cellules Dendritiques Immunomodulation et Greffes, UFR de Médecine, Tours, France; [2] CHRU de Tours, Service de Néphrologie et Immunologie Clinique, Tours, France; [3] IFR 136, Infectiologie et Vaccinologie, Tours, France.

[*]Corresponding author: Dr Christophe Baron (MD/PhD), Service de Néphrologie et Immunologie Clinique, CHRU de Tours, 37044 Tours cedex 9, France. Phone: (+33) 0247473592. Fax: (+33) 0247473802. E-mail: baron@med.univ-tours.fr

Running title: Impact of two SNP in kidney graft.

Hoffmann TW, Halimi JM, Büchler M, Velge-Roussel F, Al-Najjar A, Marliere JF, Lebranchu Y and Baron C*

No association between IL-12 and PD-1 gene polymorphisms and graft rejection, skin cancer or delayed graft function after kidney transplantation in a large cohort of patients.

Clin Transplant

ABSTRACT

A number of factors interfere with the outcome of renal transplantation. IL-12 and PD-1, by stimulating Th1 cells and inhibiting IFNγ production respectively, have a crucial role in immune responses against both graft and viral agents. Analyzing genetic polymorphisms and graft outcome may have consequences in clinical practice. An A-to-C single nucleotide polymorphism (SNP) within the 3'UTR region of the IL-12p40 gene (*IL12B*) and a G-to-A SNP within the intron 4 of the PD-1 gene (*PDCD1*) have recently been characterized and found to be both functionally and clinically relevant. However, their impact on kidney graft outcome has been little investigated. In this study, we assessed the impact of these 2 SNP on the occurrence of delayed graft function, acute rejection in the first year and skin cancer in 834 kidney recipients transplanted at the University Hospital of Tours between 1985 and 2005. Genotyping was carried out using the restriction fragment length polymorphism method. Our results showed that the *IL12B* 3'UTR and *PDCD1* polymorphisms were not associated with any of these events. In conclusion, these polymorphisms seem not to affect the occurrence of the clinical events cited above.

Keywords: genetic polymorphism, IL-12p40, PD-1, kidney transplantation.

*Corresponding author: Dr Christophe Baron, Service de Néphrologie et Immunologie Clinique, CHRU de Tours, 37044 Tours cedex 9, France. E-mail: baron@med.univ-tours.fr

INTRODUCTION

After transplantation, a number of donor-derived proteins are recognized as foreign antigens by the recipient's immune leading to graft injuries through acute or chronic rejection (1). Immunosuppressive drugs are used to prevent this reaction, but are associated with increased risk for infection, neoplasia and toxic effects. Another clinical event following kidney graft transplantation is ischemia/reperfusion injuries, which can cause a delayed graft function (DGF). Except for their chirurgical aspect, ischemia/reperfusion injuries, and especially DGF, also mobilize recipient's immune response which has an important role in the damages observed (2).

T-cell mediated immune response is regulated through an intricate network of molecular signals, such as interleukin-12 (IL-12) that stimulates interferon γ (IFNγ) production in T and natural killer (NK) cells (3) and programmed death-1 (PD-1) that inhibits IFNγ production in T cells (4). They therefore act as major actors of the balance between Th1-, Th2-, and tolerance-type immune response. IL-12 thus promotes Th1 immune response which is a major actor anti-tumoral response and, in transplantation, of acute rejection (5, 6). As it can inhibit the Th1 immune response, PD-1 could impair rejection mechanisms, but has also been reported as being used by tumoral cells to evade from immune response (7, 8).

IL-12 (IL-12p70) is composed of 2 subunits (p35 and p40) especially produced by dendritic cells and encoded by *IL12A* and *IL12B* genes respectively. A single nucleotide polymorphism (SNP) has recently been described in the 3'-untranslated region (3'UTR) of *IL12B* (rs3212227) (9, 10). This A-to-C substitution creates a *Taq*I restriction site. It has been shown to reduce the stability of the p40 mRNA in transfected cell lines (11), and to decrease the production of the IL-12p40 protein in stimulated PBMC (12). In addition, this SNP appears to be clinically relevant since it has been found to be associated with multiple sclerosis (13) and psoriasis vulgaris (14).

PD-1 is a coinhibitory molecule especially expressed on T and B cells and encoded by the *PDCD1* gene. Recently a single-nucleotide polymorphism (SNP) was described in the intron 4 of *PDCD1* and called PD-1.3 (rs11568821) (15). This G-to-A substitution creates a *Pst*I restriction site and disrupts binding of the Runx1 transcription factor, which causes a decrease of the transcriptional activity of

PDCD1 and impairs the function of PD-1 (16, 17). The PD-1.3 A allele has also been reported as associated with lupus nephritis (18, 19) and type 1 diabetes (20).

The association of these SNP with clinical events after kidney transplantation has been little studied. We previously reported that cytomegalovirus infection after kidney transplantation was associated with the *IL12B* 3'UTR polymorphism (21) and PD-1.3 (22).

Our study analyzed whether these 2 SNP were associated with significant clinical events (DGF, acute rejection in the first year and skin cancer) after kidney transplantation in a large population of 834 kidney graft recipient

PATIENTS AND METHODS

Genotyping was performed on DNA samples from 834 consecutive Caucasian recipients of a deceased-donor kidney graft at the University Hospital of Tours between 1985 and 2005. Blood samples for DNA extraction from these patients were taken after obtaining signed informed consent. Most patients received induction with either antithymocyte globulins or anti-IL2R and immunosuppressive treatments based on calcineurin inhibitor, azathioprine/mycophenolate mofetil and steroids. For each polymorphism, patients were divided into 2 groups according to the presence or absence of the variant allele (C for the *IL12B* 3'UTR polymorphism and A for PD-1.3).

Clinical data for each patient were extracted from the renal transplant database. We studied delayed graft function (DGF), acute rejection in the first year and skin cancer, the observation time ending at December 2007. DGF was defined by a dialysis in the first postoperative week and survival from skin cancer was calculated by Kaplan Meier life-table analysis. Rejection episodes in the first year were defined by clinical diagnosis (elevation in creatinine serum levels of over 20% in comparison with baseline), with a confirmation by biopsy according to Banff classification, and were studied only on recipients with at least one-year graft survival (801 patients).

We genotyped the 2 SNP by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). For each polymorphism, primers were designed to amplify a region containing the substitution. The fragment obtained was digested with 5 units of *Taq*I (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) for 1 h 40 min at 65°C (*IL12B* 3'UTR polymorphism) or with 5 units of *Pst*I (Invitrogen) for

1 h 40 min at 37°C (PD-1.3). Digestion product was loaded on a 2% agarose gel and genotypes were deducted from the digestion profile obtained after electrophoretic migration. We used a 607-bp region of the *GAPDH* gene containing both *Taq*I and *Pst*I restrictions sites as an internal control of digestion in order to assess the efficiency of digestions.

Chi-square test was used to compare the occurrence of DGF and acute rejection between SNP genotypes (presence or absence of the variant allele), whereas log-rank test was used to compare survivals from skin cancer. A p value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Distribution of genotypes is presented in Table 1. For *IL12B* 3'UTR polymorphism, 58% of the patients were A/A, 37% were A/C and 5% were C/C, with a C allele frequency of 24%. For PD-1.3, 75% of the patients were G/G, 23% were G/A and 2% were A/A, with an A allele frequency of 13%. Hardy-Weinberg equilibrium was respected in this population.

The baseline characteristics of the two groups according to the presence or absence of the variant alleles are shown in Table 2. For each SNP, there were no significant differences between the groups regarding pre-transplantation data such as recipient age and gender, donor age and gender, cold ischemia time, HLA mismatch and anti-HLA immunization. Similarly, post-transplantation data analysis did not show any significant difference for immunosuppressive regimen or induction with anti-lymphocyte antibodies (antithymocyte globulins or anti-IL2R).

Then we studied the occurrence of DGF and acute rejection in the first year according to the presence or absence of the 2 variant alleles. Our results showed that neither of these two clinical events was associated with *IL12B* 3'UTR polymorphism (p = 0.954 and 0.484 respectively; Table 3) or PD-1.3 (p = 0.820 and 0.193 respectively; Table 3). Furthermore, these 2 polymorphisms also appeared not to be associated with the occurrence of skin cancer (p = 0.557 and 0.546 respectively; Figure 1).

DISCUSSION

In this study we investigated 2 polymorphisms, concerning IL-12p40 and PD-1 genes, in kidney transplant patients. Frequencies of these SNP (24% and 13% respectively) in kidney transplant

patients were similar to the frequencies reported by others in healthy Caucasian control populations (23, 24). The occurrence of kidney disease leading to transplantation was therefore not associated with *IL12B* 3'UTR SNP or PD-1.3. Then we analyzed the association between the 2 polymorphisms and graft or patient outcome in 834 kidney graft recipients. No significant association could be revealed between these polymorphisms and DGF, acute rejection in the first year or skin cancer, indicating that they may not play a major role in the mechanisms of these clinical events.

IL-12p40 and PD-1 are major molecules in immune response and it has been reported that the polymorphisms we studied had both functional and clinical effects. We can therefore wonder the meaning of the lack of association with important post-transplantation events where immune response plays an active role. In fact, our results concerned a very large population (834 patients), which could make them reliable. Besides, concerning PD-1.3 polymorphism, similar results has been reported for acute rejection and DGF on a large cohort (25). Furthermore, although several immune gene polymorphisms have been associated with acute rejection (26), results similar to ours were reported about recipient major immunity genes, as Fas (27), IL-2 (28), TNFα (29) or IL-10 (29) genes. In addition, at our knowledge, few studies were reported about genetic polymorphisms and skin cancer after kidney transplantation. Four of these studies reported significant results, with only one concerning an immune molecule, IL-10 (30), and the others concerning p53 (31), glutathione S-transferase (32) and methylene tetrahydrofolate reductase (33). Finally, very few studies concerned recipients polymorphisms and DGF and only two reported a significant association, involving HLA-A (34) and ICOS gene (25) polymorphisms. Our results are not very surprising when we consider that DGF is a rather early event and that its immunological part could therefore concern donor characteristics such as antigen direct presentation by donor dendritic cells. Besides, two significant studies were reported about donor polymorphisms and DGF (35, 36), with only one providing significant result after multivariate analysis (35).

In conclusion, our results suggest that the *IL12B* 3'UTR polymorphism and PD-1.3 could have no effect on the events we tested, but we expect to carry out further studies on our population concerning other clinical events after kidney transplantation, all the rather than the *IL12B* 3'UTR polymorphism and PD-1.3 were associated with cytomegalovirus infection by our team (21, 22). These results also

promote us to carry out combined studies with several polymorphisms of a same gene (haplotypes) or of different genes in order to easier reveal genotypes, which could allow to adapt therapeutic strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the staff of the Nephrology and Clinical Immunology Department of the CHRU of Tours and the Etablissement Français du Sang (EFS) Centre-Atlantique for blood and DNA samples.

REFERENCES

1. BENICHOU G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. Front Biosci 1999: 4: D476.
2. BOROS P, BROMBERG JS. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. Am J Transplant 2006: 6: 652.
3. TRINCHIERI G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat Rev Immunol 2003: 3: 133.
4. SHARPE AH, WHERRY EJ, AHMED R, FREEMAN GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. Nat Immunol 2007: 8: 239.
5. OBATA F, YOSHIDA K, OHKUBO M et al. Contribution of CD4+ and CD8+ T cells and interferon-gamma to the progress of chronic rejection of kidney allografts: the Th1 response mediates both acute and chronic rejection. Transpl Immunol 2005: 14: 21.
6. SAGGI BH, FISHER RA, NAAR JD et al. Intragraft cytokine expression in tolerant rat renal allografts with rapamycin and cyclosporin immunosuppression. Clin Transplant 1999: 13: 90.
7. HAMANISHI J, MANDAI M, IWASAKI M et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2007: 104: 3360.
8. WONG RM, SCOTLAND RR, LAU RL et al. Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. Int Immunol 2007: 19: 1223.

9. HALL MA, MCGLINN E, COAKLEY G et al. Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immune-mediated disease. Genes Immun 2000: 1: 219.
10. HUANG D, CANCILLA MR, MORAHAN G. Complete primary structure, chromosomal localisation, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit. Genes Immun 2000: 1: 515.
11. MORAHAN G, HUANG D, YMER SI et al. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. Nat Genet 2001: 27: 218.
12. STANILOVA S, MITEVA L. Taq-I polymorphism in 3'UTR of the IL-12B and association with IL-12p40 production from human PBMC. Genes Immun 2005: 6: 364.
13. VAN VEEN T, CRUSIUS JB, SCHRIJVER HM et al. Interleukin-12p40 genotype plays a role in the susceptibility to multiple sclerosis. Ann Neurol 2001: 50: 275.
14. CARGILL M, SCHRODI SJ, CHANG M et al. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. Am J Hum Genet 2007: 80: 273.
15. PROKUNINA L, CASTILLEJO-LOPEZ C, OBERG F et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. Nat Genet 2002: 32: 666.
16. BERTSIAS GK, NAKOU M, CHOULAKI C et al. Genetic, immunologic, and immunohistochemical analysis of the programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway in human systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2009: 60: 207.
17. KRONER A, MEHLING M, HEMMER B et al. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. Ann Neurol 2005: 58: 50.
18. JOHANSSON M, ARLESTIG L, MOLLER B, RANTAPAA-DAHLQVIST S. Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2005: 52: 1665.
19. PROKUNINA L, GUNNARSSON I, STURFELT G et al. The systemic lupus erythematosus-associated PDCD1 polymorphism PD1.3A in lupus nephritis. Arthritis Rheum 2004: 50: 327.

20. NIELSEN C, HANSEN D, HUSBY S, JACOBSEN BB, LILLEVANG ST. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. Tissue Antigens 2003: 62: 492.
21. HOFFMANN TW, HALIMI JM, BUCHLER M et al. Association between a polymorphism in the IL-12p40 gene and cytomegalovirus reactivation after kidney transplantation. Transplantation 2008: 85: 1406.
22. HOFFMANN TW, HALIMI J-M, BUCHLER M et al. Association between a polymorphism in the human programmed death-1 (PD-1) gene and CMV infection after kidney transplantation. J Med Genet 2009: jmg.2009.068841.
23. FERREIROS-VIDAL I, D'ALFONSO S, PAPASTERIADES C et al. Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe. Genes Immun 2007: 8: 138.
24. MUELLER T, MAS-MARQUES A, SARRAZIN C et al. Influence of interleukin 12B (IL12B) polymorphisms on spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. J Hepatol 2004: 41: 652.
25. HAIMILA K, TURPEINEN H, ALAKULPPI NS, KYLLONEN LE, SALMELA KT, PARTANEN J. Association of genetic variation in inducible costimulator gene with outcome of kidney transplantation. Transplantation 2009: 87: 393.
26. KRÜGER B, SCHRÖPPEL B, MURPHY B. Genetic polymorphisms and the fate of the transplanted organ. Transplant Rev 2008: 22: 131.
27. CAPPELLESSO S, VALENTIN JF, AL-NAJJAR A et al. Recipient TNFRSF6 (FAS) gene polymorphism and acute renal allograft rejection. Transplant Proc 2002: 34: 803.
28. PAWLIK A, DOMANSKI L, ROZANSKI J et al. IL-2 and TNF-alpha promoter polymorphisms in patients with acute kidney graft rejection. Transplant Proc 2005: 37: 2041.
29. DMITRIENKO S, HOAR DI, BALSHAW R, KEOWN PA. Immune response gene polymorphisms in renal transplant recipients. Transplantation 2005: 80: 1773.

30. ALAMARTINE E, BERTHOUX P, MARIAT C, CAMBAZARD F, BERTHOUX F. Interleukin-10 promoter polymorphisms and susceptibility to skin squamous cell carcinoma after renal transplantation. J Invest Dermatol 2003: 120: 99.

31. MCGREGOR JM, HARWOOD CA, BROOKS L et al. Relationship between p53 codon 72 polymorphism and susceptibility to sunburn and skin cancer. J Invest Dermatol 2002: 119: 84.

32. RAMSAY HM, HARDEN PN, REECE S et al. Polymorphisms in glutathione S-transferases are associated with altered risk of nonmelanoma skin cancer in renal transplant recipients: a preliminary analysis. J Invest Dermatol 2001: 117: 251.

33. LAING ME, DICKER P, MOLONEY FJ et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of squamous cell carcinoma in renal transplant patients. Transplantation 2007: 84: 113.

34. KAMOUN M, HOLMES JH, ISRANI AK et al. HLA-A amino acid polymorphism and delayed kidney allograft function. Proc Natl Acad Sci U S A 2008: 105: 18883.

35. ALAKULPPI NS, KYLLONEN LE, JANTTI VT et al. Cytokine gene polymorphisms and risks of acute rejection and delayed graft function after kidney transplantation. Transplantation 2004: 78: 1422.

36. ISRANI AK, LI N, CIZMAN BB et al. Association of donor inflammation- and apoptosis-related genotypes and delayed allograft function after kidney transplantation. Am J Kidney Dis 2008: 52: 331.

Table 1. Genotype distribution and allele frequency of two polymorphisms in 834 kidney graft recipients.

	IL12B 3'UTR genotype				PD-1.3 genotype			
	A/A	A/C	C/C	C allele frequency	G/G	G/A	A/A	A allele frequency
834 kidney graft recipients	479 (58%)	312 (37%)	43 (5%)	24%	630 (75%)	191 (23%)	13 (2%)	13%

Table 2. Clinical data for 834 recipients of kidney transplants according to *IL12B* 3'UTR and PD-1.3 genotypes.

Clinical data [a]	*IL12B* 3'UTR genotype			PD-1.3 genotype		
	A/A N = 479	A/C and C/C N = 355	*p* [b]	G/G N = 630	G/A and A/A N = 204	*p* [b]
Recipient age (years)	44 ± 15	45 ± 15	0.320	44 ± 15	45 ± 15	0.559
Recipient gender (female)	177 (37%)	135 (38%)	0.751	229 (36%)	83 (41%)	0.266
Donor age (years)	40 ± 16	42 ± 16	0.106	41 ± 16	40 ± 17	0.614
Donor gender (female)	162 (34%)	131 (37%)	0.357	228 (36%)	65 (32%)	0.260
Cold ischemia time (h)	22 ± 8	21 ± 9	0.131	22 ± 8	22 ± 8	0.273
HLA mismatch						
AB	2.7 ± 1.0	2.7 ± 1.0	0.586	2.7 ± 1.0	2.8 ± 1.0	0.470
DR	1.2 ± 0.7	1.2 ± 0.7	0.780	1.2 ± 0.7	1.3 ± 0.7	0.783
Anti-HLA immunization						
I	82 (17%)	58 (16%)	0.765	109 (17%)	31 (15%)	0.484
II	77 (16%)	36 (10%)	0.013	85 (13%)	28 (14%)	0.933
Induction treatment						
Antithymocyte globulins	332 (69%)	252 (71%)	0.602	441 (70%)	143 (70%)	0.979
Anti-IL2R	108 (23%)	75 (21%)	0.624	140 (22%)	43 (21%)	0.732
Immunosuppressive treatment						
Mycophenolate mofetil	280 (58%)	197 (55%)	0.393	363 (58%)	114 (56%)	0.663
Calcineurin inhibitors	465 (97%)	342 (96%)	0.551	612 (97%)	195 (96%)	0.276

[a] Results are expressed as percentage and means ± standard deviation.

[b] Chi-square test was used to compare categorical data and Mann-Whitney test was used to compare numeric factors.

Table 3. No association between two polymorphisms and delayed graft function or acute rejection in kidney graft recipients.

Clinical data[a]	*IL12B* 3'UTR genotype				PD-1.3 genotype			
	A/A	A/C and C/C	Odds ratio	*p*	G/G	G/A and A/A	Odds ratio	*p*
Delayed graft function[b]	91 / 479 (19%)	68 / 355 (19%)	1,01	0,954	119 / 630 (19%)	40 / 204 (20%)	1,05	0,820
Acute rejection in the first year[c]	133 / 457 (29%)	108 / 344 (31%)	1,12	0,484	189 / 604 (31%)	52 / 197 (26%)	0,78	0,193

[a] The occurrences of delayed graft function and acute rejection were compared between genotypes by chi-square test.

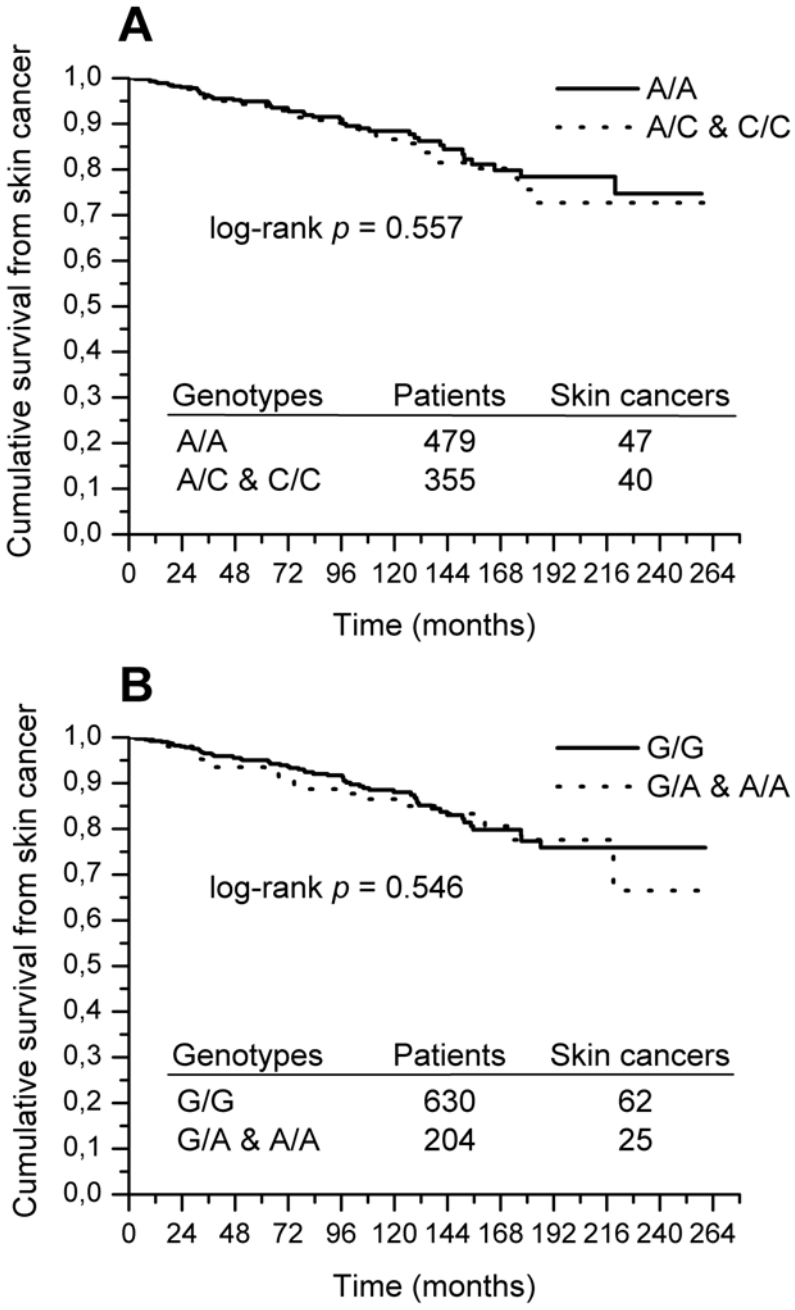
[b] The study of delayed graft function was carried out on our whole kidney recipient population (834 patients).

[c] The study of acute rejection in the first year was carried out on recipients with at least one-year graft survival (801 patients among our population).

Figure legends

Figure 1. No association between 2 polymorphisms and the occurrence of skin cancer. The survival from the "skin cancer" event was estimated by Kaplan Meier life-table analysis in 834 kidney graft recipients according to *IL12B* 3'UTR (**A**) and PD-1.3 (**B**) genotypes. Survivals between variant-allele carriers (dots) and common-allele homozygotes (lines) were compared by log-rank test, which showed no significant difference between genotypes.

Figure 1


A
Cumulative survival from skin cancer
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
A/A
A/C & C/C
log-rank p = 0.557
Genotypes Patients Skin cancers
A/A 479 47
A/C & C/C 355 40
0 24 48 72 96 120 144 168 192 216 240 264
Time (months)
B
Cumulative survival from skin cancer
G/G
G/A & A/A
log-rank p = 0.546
Genotypes Patients Skin cancers
G/G 630 62
G/A & A/A 204 25
0 24 48 72 96 120 144 168 192 216 240 264
Time (months)

Thomas HOFFMANN

IMPACT DU POLYMORPHISME DE CERTAINS GÈNES DE L'IMMUNITÉ SUR LE DEVENIR DES ALLOGREFFES RÉNALES HUMAINES

Résumé

Malgré les progrès effectués en transplantation rénale, on observe encore de nombreuses pertes de greffon sur le long terme. Mettre en évidence des polymorphismes génétiques influençant le devenir du greffon pourrait permettre d'améliorer la prise en charge des patients greffés. Nous avons génotypé 6 polymorphismes de gènes de l'immunité codant l'IL-12p40, PD-1, AIF-1, Lyp, TIM-1 et -3, puis nous avons recherché une association statistique avec plusieurs événements cliniques survenus après la greffe. Nous avons montré que les polymorphismes des gènes de l'IL-12p40, PD-1 et TIM-3 étaient associés à l'infection à CMV, que celui du gène de PD-1 influait sur la survie du greffon, et que ceux d'AIF-1 et Lyp étaient liés respectivement au cancer de la peau et à la reprise retardée de fonction du greffon. Ces résultats suggèrent l'intérêt de stratifier génétiquement les patients afin d'en identifier certains qui bénéficieraient tout particulièrement d'adaptations thérapeutiques.

Mots-clés : polymorphisme génétique, immunité, transplantation rénale

Abstract

In spite of the continuous progress in immunosuppressive therapy, a number of factors still interfere with the complete success of renal transplantation. Revealing some factors with impact on graft outcome may therefore have important consequences in clinical practice. In the work presented here, we studied 6 polymorphisms into immunity genes coding IL-12p40, PD-1, AIF-1, Lyp, TIM-1 and -3, and we assessed their association with several clinical events occurring after transplantation. We showed that the polymorphisms into IL-12p40, PD-1 and TIM-3 genes were associated with CMV infection, that the PD-1 gene polymorphism was associated with graft survival, and that the polymorphisms into AIF-1 and Lyp genes were associated with skin cancer and delayed graft function, respectively. These results suggest that it would be interesting to genetically stratify patients in order to better adapt treatments and patient care.

Keywords: genetic polymorphism, immunity, kidney transplantation