

# UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

**ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV**

**EA 4245- Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes**

**THÈSE** présentée par :

**Catherine FORCONI**

soutenue le : 17 Décembre 2013

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

Discipline/ Spécialité : Santé Sciences Biologiques / Infectiologie et Transplantation

## **Cytomégalovirus et survie à long terme des greffes d'organes solides :**

**Etude clinique et génétique**

**THÈSE dirigée par :**

**Pr. BARON Christophe**

Professeur, CHU Tours, Université François – Rabelais de Tours

**RAPPORTEURS :**

**Pr. ALAIN Sophie**

Professeur, CHU Limoges

**Pr. MERVILLE Pierre**

Professeur, CHU Bordeaux

**JURY :**

**Pr. ALAIN Sophie**

Professeur, CHU Limoges

**Pr. BARON Christophe**

Professeur, CHU Tours, Université François – Rabelais de Tours

**Pr. HALIMI Jean-Michel**

Professeur, CHU Tours, Université François – Rabelais de Tours

**Pr. LEBRANCHU Yvon**

Professeur, CHU Tours, Université François – Rabelais de Tours

**Pr. MERVILLE Pierre**

Professeur, CHU Bordeaux

**Pr. STERN Marc**

Professeur, CHU FOCH Suresnes

*La sagesse ne convient pas en toutes occasions : il faut quelquefois être un  
peu fou avec les fous (Ménandre)*

# Remerciements

Insérer ici votre texte de remerciements

## Résumé

**Contexte :** Suite à une transplantation d'organe solide, et afin de prévenir le risque de rejet, les patients reçoivent des traitements immunosuppresseurs qui affaiblissent leur système immunitaire, favorisant ainsi les tumeurs et les infections dont le Cytomégalo virus (CMV). Ce virus est à l'origine de syndromes infectieux cliniques mais aussi de nombreux effets qualifiés « d'indirects » encore très mal compris. Dans ce travail nous nous sommes intéressés à son impact sur la survie des greffes d'organe solides et particulièrement dans les dysfonctions chroniques des greffons.

**Objectif :** Dans un premier travail clinique en greffe rénale, nous avons tenté de mieux comprendre les effets de l'infection à CMV provenant du donneur (CMV intra-greffon) sur le devenir clinique des greffons. Puis dans un second travail nous avons étudié un facteur de risque génétique pouvant moduler ces effets.

**Méthode :** A travers une approche clinique rétrospective basée sur la cohorte de patients transplantés rénaux de Tours (n=1279) nous avons analysé la survie des greffons à long terme en fonction des paramètres suivants : les statuts sérologiques pour le CMV des donneurs et receveurs, la survenue d'antigénémie, la sous population de cellules CD8+, l'incompatibilité HLA, et l'impact des traitements immunosuppresseurs. Nous avons ensuite identifié les facteurs génétiques de la réponse immunitaire de l'hôte qui pourraient moduler ce risque à travers une étude gène candidat chez des patients greffés rénaux (n=1120) ou pulmonaires (n=193). Cette étude a analysé le polymorphisme PD-1.3 du gène *PDCDI* codant pour la protéine programmed cell-death-1 (PD-1) impliquée dans l'épuisement clonal. Enfin, une étude *in vitro* cas témoin de la réponse immunitaire anti-CMV chez les patients rénaux R+ a été réalisée suite à un appariement individuel entre homozygote variant AA (groupe cas, n=7) et homozygote sauvage GG (groupe contrôle, n=14).

**Résultats :** Le premier axe clinique de cette thèse a pu démontrer que le rein provenant de donneur séropositif pour le CMV (D+) est un facteur de risque indépendant de perte des greffons rénaux, d'autant plus si le patient receveur est lui même infecté par ce virus avant la greffe (R+). Au sein de notre cohorte, la survenue d'une antigénémie à CMV chez les patients transplantés n'est pas associée à une perte de greffon, cependant nous avons pu mettre en avant d'autres facteurs pouvant influencer sur ce risque. D'une part, en cas de mésappariement complet des molécules de HLA de classe I des donneurs et receveurs, l'effet délétère de la transplantation d'un rein D+ est augmenté. Et d'autre part, une forte contraction du « compartiment » numéraire des cellules CD8+ à deux ans post-transplantation chez les

patients exposés au CMV est un facteur de risque important de dysfonctionnement chronique de l'allogreffe rénale.

Le second axe de recherche a permis d'identifier le SNP PD-1.3 comme un facteur de risque génétique fort de la perte du greffon rénal associée au CMV, et ceci exclusivement chez les patients D+. Ces résultats obtenus au sein d'une cohorte de patients greffés rénaux ont été confirmés par la réplication de l'étude au sein de la cohorte de patients transplantés pulmonaires. De manière intéressante, nous retrouvons les facteurs de risques découverts dans le premier axe de recherche : la taille du « compartiment » des cellules CD8+, des patients porteurs de l'allèle variant A pour le SNP PD-1.3, est plus grand que celui des patients homozygotes sauvages GG. En ce qui concerne les antigènes HLA de classe I, les patients D+ possédant l'allèle A présentent une meilleure survie que les patients GG lorsque le mésappariement est partielle entre donneur et receveur. Nos résultats présentent aussi une association très forte entre la présence de l'allèle A et une meilleure survie des greffons, exclusivement chez les patients qui ont reçu des globulines anti-lymphocytaires. Enfin, suite à l'étude de la réponse immunitaire anti-CMV, les patients homozygotes AA ont un nombre de cellules T produisant de l'IFN $\gamma$  supérieur à celui des patients GG.

**Discussion/Conclusion:** L'absence d'association entre le polymorphisme PD-1.3 et la survie des greffons chez les patients D-R- appuie notre hypothèse selon laquelle le CMV joue un rôle important dans l'effet observé. De façon intéressante ce polymorphisme présente les patients porteurs de l'allèle variant A comme ayant une meilleure survie à long terme, suggérant ainsi un lien favorable avec le contrôle intra-greffon du CMV. L'association entre le SNP et la survie des greffons est retrouvée uniquement chez les patients qui présentent un mésappariement partiel de leur HLA de classe I avec le donneur. Cet appariement même incomplet permettrait une reconnaissance cellulaire et donc une activation plus importante de la réponse immunitaire anti-CMV. De plus, la forte contraction du « compartiment » cellulaire CD8+ et le nombre faible de cellules productrices d'INF $\gamma$  chez les patients D+ homozygotes GG suggèrent un lien entre le SNP PD-1.3 et l'épuisement de la réponse immunitaire anti-CMV spécifique. Ces travaux de thèse mettent en avant l'importance de la physiopathologie liée au CMV sur l'association clinique observée. Des recherches approfondies sur la réponse cellulaire CMV-spécifiques en fonction du SNP pourraient améliorer la stratégie de prise en charge des patients afin de diminuer les effets indirects liés au CMV qui continuent, encore aujourd'hui, à limiter le succès de la transplantation d'organes à long terme.

Mots-clés : Cytomegalovirus, transplantation, survie greffons rénaux, polymorphisme PD-1, survie patients pulmonaires

## Abstract

**Background:** Following a solid organ transplant, and to prevent the risk of rejection, patients take immunosuppressive treatments that make their immune system weak and promote tumors and infections, including cytomegalovirus (CMV). This virus is the cause of clinical infectious syndromes but also many "indirect" effects which are not yet clearly understood. In this work we studied its impact on the survival of solid organ transplants, particularly in chronic graft dysfunction.

**Objective:** At first, across a renal transplantation clinical study, we tried to understand the effects of the CMV-donor infection (CMV intra-graft) on the clinical outcome of the grafts. Then in a second work we studied a genetic risk factor that can modulate these effects.

**Method:** Across a retrospective clinical approach realized with the cohort of the renal transplant patients of Tours (n=1279), we analyzed the graft survival on a long term in function of the following parameters: CMV serostatus of donor and recipient, the occurrence of antigenemia, the subpopulation of CD8+ cells, the HLA mismatch, and the impact of immunosuppressive therapy. Then, we identified the genetic factors of the host immune response that may modulate this risk through an association study in renal (n=1120) or lung (n=193) transplant patients. This study analyzed the PD-1.3 polymorphism in the PDCD1 gene encoding the programmed cell death-1 protein (PD-1) involved in the clonal exhaustion. Finally, an *in vitro* case-control study on the anti-CMV immune response in R+ renal patients has been carried out following an individual pairing between homozygous variant AA patients (case group, n=7) and homozygous wild GG (control group, n=14).

**Results:** Our first work demonstrated that a kidney from a CMV-seropositive donor (D+) is an independent risk factor for kidney graft loss, especially if the recipient patient himself is infected by this virus before transplantation (R+). In our cohort, the occurrence of the CMV antigenemia in transplant patients is not associated with graft loss; however we were able to highlight other factors that may influence this risk. On the one hand, in the case of a mismatch on a complete HLA I class between donor and recipient, the deleterious effect of a D+ renal transplant is increased. On the other hand, a strong contraction in the CD8+ "cells compartment", at two years post-transplant in patients exposed to the CMV, represents a major risk factor for chronic renal allograft dysfunction.

The second line of research identified the SNP PD-1.3 as a strong genetic risk factor for renal graft loss associated with CMV, and this, only in patients with D+. These results obtained in a cohort of renal transplant patients were confirmed by replication of the study

within the cohort of lung transplant patients. Interestingly, we find the risk factors found in the first line of research: the size of the CD8+ “cells compartment” of patients with the variant allele A for SNP PD-1.3, is larger than the patients homozygous GG wild. Regarding the HLA I class, D+ carriers of the A allele have a better survival than GG patients when the mismatch is partial between donor and recipient. Our results also show a very strong association between the presence of the A allele and a better graft survival, only for patients who received anti-lymphocyte globulin. Finally, following the study of anti-CMV immune response, patients homozygous AA have a higher number of T cells producing IFN $\gamma$  than GG patients.

**Discussion / Conclusion:** The lack of association, between the PD-1.3 polymorphism and the graft survival in D-R- patients, supports our hypothesis that the CMV plays an important role in the observed effect. Interestingly, this polymorphism presents the A carriers patients as having a better long-term survival, suggesting a positive association with the CMV intra-graft control. The association between SNPs and graft survival was found only in patients who have a partial mismatch of their HLA I class with the donor. A matching even incomplete will enable the cell recognition between donor and recipient, and therefore a greater activation of the anti-CMV immune response. In addition, the strong contraction of the CD8+ "cells compartment" and the low number of the IFN $\gamma$  producing cells in D+ GG patients suggests a link between the SNP PD- 1.3 and the exhaustion of the immune response CMV-specific. This thesis put forward the importance of the pathophysiology associated with the CMV on the observed clinical association. Extensive research on CMV-specific cellular response depending on the SNP, could improve the care of patients to reduce the indirect effects of CMV that continue even today, to limit the success of transplantation bodies in the long term.

Key words: Cytomegalovirus, transplantation, renal graft survival, PD-1 polymorphism, pulmonary patients' survival

# Table des matières

Remerciements .....	3
Résumé .....	4
Table des matières .....	8
Liste des tableaux .....	12
Liste des figures .....	13
Liste des annexes.....	15
INTRODUCTION.....	16
La transplantation d'organe.....	17
Généralités / Historique.....	17
La réponse immunitaire en allogreffe .....	18
Mécanismes immunitaires impliqués .....	19
Rejet hyper aigu .....	22
Rejet aigu.....	23
Rejet chronique .....	23
Traitements immunosuppresseurs .....	27
La transplantation rénale .....	28
Historique .....	28
Principales pathologies conduisant à une transplantation rénale .....	29
La dialyse .....	30
La transplantation pulmonaire.....	31
Historique .....	31
Principales pathologies conduisant à une transplantation pulmonaire.....	32
La transplantation mono-pulmonaire .....	34
La transplantation bi-pulmonaire .....	35
La transplantation pulmonaire multi viscérale .....	36
Eléments de génétique.....	37
Généralités.....	37
Historique .....	37
Le Single Nucleotide Polymorphism (SNP) .....	38
Le projet HapMap .....	38
Etablissement d'une étude génétique .....	39
Strengthening the reporting of genetic associations (STREGA) .....	39



Equilibre d'Hardy-Weinberg.....	40
Etude d'association .....	40
Etudes génétiques et transplantation .....	41
Le Cytomégalo­virus .....	43
Généralités.....	43
Cycle viral .....	44
L'infection à CMV chez le sujet immunocompétent .....	44
L'infection à CMV chez le patient immunodéprimé .....	45
Le CMV dans un contexte d'inflammation.....	45
Les effets directs du CMV .....	46
Les effets indirects du CMV .....	46
Réactivation, latence et inflammation.....	47
Le CMV en transplantation d'organe.....	48
CMV et transplantation cardiaque.....	49
CMV et transplantation rénale .....	50
CMV et transplantation pulmonaire .....	51
CMV et résistance aux antiviraux .....	52
Réponse immu­ne anti-CMV et échappement immunitaire du virus .....	53
Programmed Cell Death-1 (PD-1) protein .....	55
Généralité .....	55
PD-1 et la réponse immunitaire.....	55
Généralités.....	55
PD-1, tolérance et auto-immu­nité .....	58
PD-1 et échappement viral .....	59
Généralités.....	59
PD-1 et CMV .....	61
Le polymorphisme gé­né­ti­que au sein du gène <i>PDCD1</i> .....	61
Ménage à trois .....	63
OBJECTIF DE TRAVAIL.....	64
PATIENTS ET METHODES .....	66
Mise en place de l'étude.....	67
Autorisation de la mise en place de l'étude.....	67
Centres de transplantation participant à l'étude .....	67
Population de patients et consentements .....	68

Banques d'ADN et bases de données cliniques .....	68
Banque d'ADN.....	68
Items cliniques communs (rénaux et pulmonaires).....	68
Items cliniques spécifiques de transplantation rénale .....	69
Items cliniques spécifiques de transplantation pulmonaire.....	70
Méthodes utilisées .....	72
Diagnostic du CMV .....	72
Détermination du génotype du SNP PD-1.3 .....	72
Extraction d'ADN et PCR.....	72
Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	73
Oligonucleotide Ligation Assay (OLA).....	74
Analyse statistique.....	76
Recherche de l'éventuel effet biologique du SNP PD-1.3 .....	77
Appariement des patients transplantés rénaux de Tours .....	77
Etude par technique ELISpot .....	77
Isolement des PBMC des patients.....	78
Mise en culture des cellules .....	79
ELISpot <sup>PLUS</sup> for Human Interferon- $\gamma$ .....	79
Recherche d'IFN $\gamma$ par ELISA sur les surnageants.....	80
RESULTATS .....	82
Caractéristiques des patients greffés à Tours depuis 1985.....	83
Mise en évidence des impacts d'une infection à CMV du donneur sur le devenir clinique des receveurs.....	85
L'infection à CMV chez le donneur est un facteur de risque de survenue de l'insuffisance rénale terminale, en particulier chez les patients R+.....	87
Les greffons D+ augmentent le risque d'antigénémie-CMV chez les receveurs R+, cependant, le risque accru de perte de greffon des reins D+ est indépendant de cette virémie .....	89
Un mésappariement complet pour les HLA classe I entre donneur et receveur augmente l'effet délétère de la transplantation d'un rein D+ .....	91
Exposition au CMV et numération des cellules CD8+ circulantes.....	93
Compartiment cellulaire CD8+ circulant à 2 ans post-transplantation en fonction des sérologies CMV des donneurs et receveurs et de la survenue d'une antigenémie.....	95
Evolution temporelle après la greffe du compartiment de cellules CD8+ circulantes.....	96

La contraction du compartiment des cellules CD8+ en post-transplantation augmente le risque de perte du greffon chez les patients exposés au CMV .....	98
Etude de l'association entre polymorphisme du gène de programmed cell death-1 (PD1) et survie des greffons: impact de l'infection CMV du donneur .....	100
Fréquence de l'allèle PD1.3 dans la population des greffés rénaux.....	100
Survie des greffons rénaux en fonction du polymorphisme pour le gène <i>PDCDI</i> .....	102
Impact du SNP PD1.3 chez les patients transplantés pulmonaires .....	110
Caractéristiques des patients transplantés pulmonaires .....	110
Survie des greffons pulmonaires en fonction du polymorphisme pour le gène <i>PDCDI</i> ...	113
Mieux comprendre le lien entre le polymorphisme du gène <i>PDCDI</i> , le CMV et la survie des greffons : étude d'association entre polymorphisme <i>PDCDI</i> et la réponse anti-CMV .....	118
Analyse de la numération des cellules CD8+ des patients transplantés rénaux en fonction du polymorphisme PD-1.3 .....	119
Etude clinique cas-témoin de la réponse anti-CMV <i>in vitro</i> chez des patients greffés rénaux R+ homozygotes AA appariés à des patients GG .....	120
Etude de la réponse anti CMV <i>in vitro</i> par ELISpot et validation de la technique.....	121
Etude clinique cas-témoin de la réponse anti CMV <i>in vitro</i> chez des patients greffés rénaux R+ homozygotes AA appariés à des patients GG .....	123
Caractéristiques démographiques de la population étudiée .....	123
DISCUSSION / CONCLUSION .....	126
DISCUSSION / CONCLUSION .....	127
Bibliographie.....	140

## Liste des tableaux

Tableau I : Evolution du nombre d'inscrits au 1er janvier de 2006 à 2012 (ABM) .....	18
Tableau II : Evolution de l'activité de greffe pulmonaire et cardio-pulmonaire.....	35
Tableau III : Caractéristiques cliniques des patients ayant reçu une greffe rénale à Tours entre 1985 et 2008 inclus .....	83
Tableau IV : Caractéristiques cliniques des patients greffés rénaux en fonction du statut sérologique CMV du donneur et du receveur .....	86
Tableau V : recevoir un greffon rénal d'un donneur séropositif au CMV est un facteur de risque indépendant de perte du greffon (mort-censurée) .....	89
Tableau VI : donneur D+ est un facteur de risque indépendant de perte de greffon en l'absence d'antigénémie CMV .....	90
Tableau VII : Caractéristiques des patients transplantés rénaux de Tours entre 1985 et 2008 en fonction du polymorphisme PD-1.3 .....	101
Tableau VIII : Caractéristiques des patients transplantés avec un rein provenant d'un donneur séropositif (D+, colonne de gauche) ou séronégatif (D-colonne de droite) au CMV, entre 1985 et 2008, en fonction du polymorphisme PD-1.3 .....	103
Tableau IX : Caractéristiques des patients transplantés pulmonaires entre 1992 et 2009 en fonction du polymorphisme PD-1.3 .....	112
Tableau X: Traitements immunosuppresseurs durant les 3 premiers mois suivant la greffe chez des patients transplantés pulmonaires entre 1992 et 2009 en fonction du polymorphisme PD-1.3 .....	113
Tableau XI : Caractéristiques des patients transplantés pulmonaires entre 1992 et 2009 en fonction du polymorphisme PD-1.3 .....	115
Tableau XII : Principales caractéristiques de la population de l'étude cas-contrôle .....	124

## Liste des figures

Figure I : La réponse immunitaire adaptative en allogreffe. ....	18
Figure II : Principe de la photophrèse extracorporelle .....	26
Figure III : Survie globale du greffon rénal entre 1993 et 2010 .....	28
Figure IV : Courbe de survie du receveur selon le type de greffe pulmonaire (1993-2010) ...	32
Figure V : Rôle du cytomégalo virus dans l'accélération de la mise en place du rejet chronique de l'allogreffe .....	47
Figure VI : Modèle de l'inhibition des lymphocytes T médiée par la protéine PD-1 .....	57
Figure VII: Modèle de la perte de fonction des lymphocytes T de façon hiérarchique durant une infection virale chronique.....	60
Figure VIII : Les reins provenant de donneurs séropositifs au CMV (D+) ont une survie plus faible chez les receveurs infectés par ce virus (R+) .....	88
Figure IX : La survenue d'une antigénémie-CMV en post-transplantation n'influe pas sur la survie des greffons en mort-censurée chez les D+. .....	90
Figure X : un mésappariement complet pour les antigènes HLA de classe I entre le donneur et le receveur augmente le risque de développer les effets délétères associés aux reins D+92	
Figure XI : Les patients non exposés au CMV (D-R-) ont moins de LT CD8 circulants comparés à tous les autres groupes de patients exposés au CMV .....	93
Figure XII: Numérations cellulaires des « compartiments » NK et CD4 similaires quel que soit le statut sérologique CMV .....	94
Figure XIII : A 2 ans, la numération cellulaire CD8 est beaucoup plus faible chez les patients D+R+ que chez les D+R- .....	96
Figure XIV : Une virémie précoce du CMV entraîne une importante et durable augmentation des cellules CD8+ chez les patients R-, à l'opposé des patients R+ chez qui la variation des CD8+ est très hétérogène .....	97
Figure XV : La réduction sévère du nombre de cellules CD8+ en post-transplantation augmente le risque de perte du greffon chez les receveurs R+. .....	98
Figure XVI : Les patients porteurs de l'allèle A du SNP PD1.3 ont une meilleure survie des greffons.....	102
Figure XVII : L'allèle variant A du SNP PD-1.3 est fortement associée à la survie des greffons chez les patients qui reçoivent le rein d'un donneur séropositif au CMV (D+) .....	105

Figure XVIII : L'allèle variant A du SNP PD-1.3 est associée à la survie des greffons rénaux au sein de la population D+ quelque soit la période de transplantation. ....	106
Figure XIX : L'allèle variant A du SNP PD-1.3 n'est pas associée à la survie des greffons chez les patients D-R+ ou D-R-. ....	107
Figure XX: Association très significative ( $p < 0.0001$ ) entre la survie des greffons D+ et le SNP PD1.3 uniquement chez les patients qui ont reçu des GAL.....	108
Figure XXI: Le mésappariement total des antigènes HLA de classe I entre le donneur et le receveur protège contre les effets délétères d'une greffe de rein d'un donneur D+ .....	109
Figure XXII : Survie à long terme similaire des patients transplantés pulmonaires de notre cohorte et issue du rapport annuel 2011 de l'agence de biomédecine .....	111
Figure XXIII: L'allèle A de PD1.3 est associé une meilleure survie des patients transplantés pulmonaires (n=193). ....	114
Figure XXIV : L'allèle variant A du polymorphisme du gène PDCD1 est très fortement associée à une meilleure survie des patients transplantés pulmonaires lorsqu'ils reçoivent un greffon D+ .....	115
Figure XXV : Analyses Kaplan-Meier des patients transplantés pulmonaires recevant un greffon D+ du centre HEGP (gauche, n=23 ; $p=0,08$ ) et Foch (droite, n=58, $p=0,011$ )	117
Figure XXVI : L'accroissement du nombre de cellules CD8+ chez les patients porteurs de l'allèle A est plus grand que celui des patients homozygotes GG chez les receveurs D+ qui ont présenté une virémie CMV durant la première année de greffe .....	120
Figure XXVII : Production d'IFN $\gamma$ par des PBMC provenant de deux donneurs sains GG, l'un séronégatif (à gauche) et l'autre séropositif au CMV (à droite) stimulés ou non par des peptides du CMV .....	121
Figure XXVIII : Production d'IFN $\gamma$ par des PBMC provenant de deux donneurs sains, l'un séronégatif (à gauche) et l'autre séropositif au CMV (à droite) stimulés ou non par des peptides du CMV .....	122
Figure XXIX: Les patients homozygotes AA ont un nombre de cellules T produisant de l'IFN $\gamma$ en réponse à CMV-pp65 supérieur à celui des patients GG ( $p=0.004$ ). ....	125
Figure XXX: Les possibilités d'une infection virale .....	129
Figure XXXI : Modèle d'épuisement clonale hiérarchique lors d'une infection virale chronique.....	133

## Liste des annexes

Annexe 1 : Courrier du CPP de Tours.....	153
Annexe 2 : Formulaire de consentement.....	154
Annexe 3 : Lettre informative .....	155
Annexe 4: Protocole de l'ELISpot .....	157
Annexe 5: Article American Journal of Transplantation .....	159
Annexe 6: Article en soumission .....	170

# INTRODUCTION



# La transplantation d'organe

## Généralités / Historique

La transplantation d'organe est l'acte de transférer un organe d'un individu à un autre. L'idée de remplacer un organe malade par un organe sain est survenue au cours du 20<sup>ème</sup> siècle. C'est en 1954, à l'hôpital Peter Bent Brigham de Boston, que l'équipe de Joseph Murray réalise avec succès la première transplantation rénale entre deux jumeaux monozygotes (Kindt, *Immunologie* 2009).

La transplantation d'organe engendre une réponse immunitaire chez le receveur dirigée contre le greffon. L'arrivée des traitements immunosuppresseurs dans les années 60, a permis d'affaiblir cette attaque immunitaire et par la suite de réaliser des allogreffes (tissus ou organes transférés entre individus génétiquement différents mais de la même espèce). De nos jours l'acte de transplantation, comme traitement aux maladies chroniques terminales d'organe, s'avère être une pratique courante pour plusieurs type d'organes solides : rein, pancréas, cœur, poumon, foie et cornée. Suite à une transplantation, la stratégie du traitement médical de routine est de contrôler/moduler la réponse immunitaire de l'hôte afin que le greffon ne soit pas rejeté.

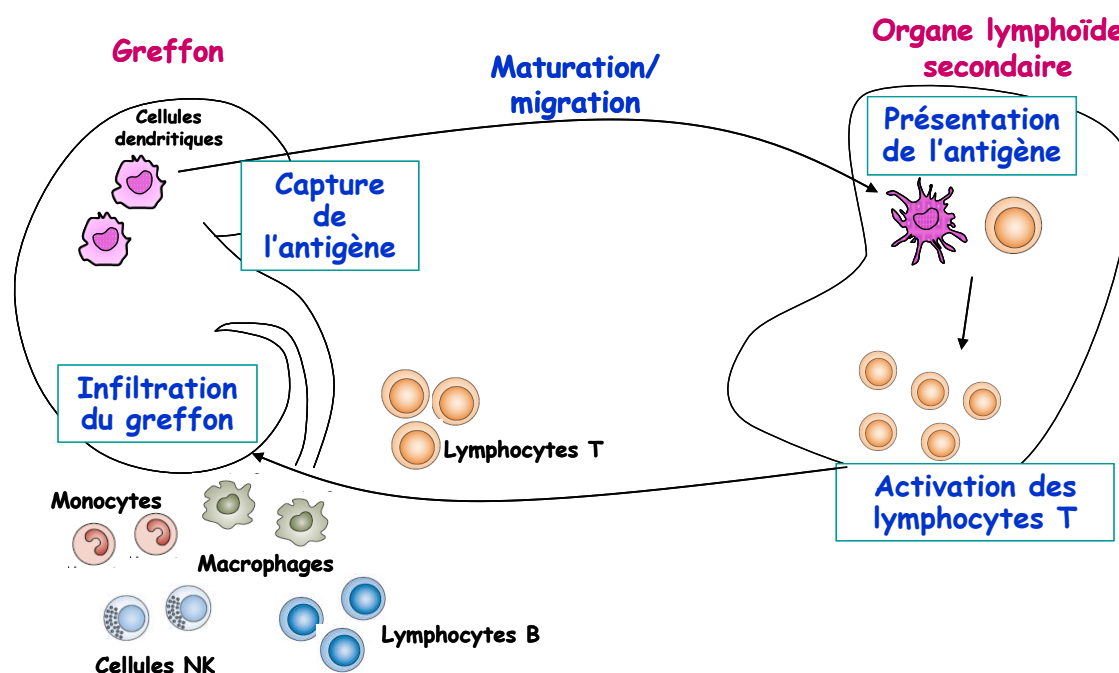
Le nombre d'organes greffés est utilisé comme indicateur d'activité de greffe. L'activité de greffe totale en France, tous organes confondus, est de 4945 greffes en 2011. Depuis 2006, le nombre de patients en attente de greffe ne cesse d'augmenter. Au 1<sup>er</sup> janvier 2012, 10506 patients étaient inscrits sur liste d'attente, la plus grande majorité en attente d'un rein (8942), (Table I, Bilan 2011 Agence de la BioMédecine (ABM)).

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Coeur	253	240	268	298	304	284	302
Coeur-poumons	29	35	30	35	26	21	20
Foie	486	540	574	669	806	932	941
Intestin	13	13	20	26	21	12	12
Pancréas	170	171	150	154	159	148	144
Poumon	91	131	139	173	178	164	145
Rein	5942	6157	6481	6869	7585	8436	8942
<b>Total</b>	<b>6984</b>	<b>7287</b>	<b>7662</b>	<b>8224</b>	<b>9079</b>	<b>9997</b>	<b>10506</b>

**Tableau I : Evolution du nombre d'inscrits au 1er janvier de 2006 à 2012 (ABM).** Depuis 2006, le nombre de patients en attente d'une transplantation d'organe solide ne cesse d'augmenter, les taux les plus importants étant de 91% en attente d'une greffe hépatique et de 60% en attente d'une greffe pulmonaire.

## La réponse immunitaire en allogreffe

La réponse immunitaire allogénique peut être divisée en 4 étapes : la capture de l'antigène, la présentation de cet antigène, l'activation lymphocytaire T et l'infiltration du greffon (Figure I).



**Figure I : La réponse immunitaire adaptative en allogreffe.** Dans un premier temps, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les cellules dendritiques (CD), vont reconnaître l'organe greffé comme du « non-soi » et capturer les antigènes. Cette étape va permettre la maturation et la migration des CD vers les organes lymphoïdes secondaires où elles pourront présenter les antigènes de l'organe greffé aux lymphocytes T naïfs, via les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Cette reconnaissance entraîne l'activation et la prolifération des lymphocytes T qui migrent à leur tour vers l'organe greffé pour l'infiltrer. L'infiltration du greffon se fait aussi par d'autres cellules

comme les lymphocytes B et les cellules de l'immunité innée tels les monocytes/ macrophages et les cellules Natural Killer (NK).

Il existe deux types de reconnaissance allogénique, une directe et une indirecte ; elles conduisent toutes deux à une activation lymphocytaire.

Suite à la revascularisation du greffon, les cellules dendritiques du donneur migrent dans les organes lymphoïdes secondaires du receveur et vont présenter les molécules allogéniques aux lymphocytes T du receveur, c'est la reconnaissance allogénique directe, principale réaction mise en jeu dans le rejet aigu. Les molécules allogéniques majoritaires sont les molécules du HLA.

De la même façon, lors de la revascularisation du greffon, des cellules dendritiques du receveur vont arriver dans le greffon et phagocyter les antigènes HLA des cellules mortes du donneur. Les cellules dendritiques vont alors mûrir, apprêter ces molécules et migrer vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur. C'est là qu'elles présenteront l'antigène du donneur aux lymphocytes du receveur, c'est la reconnaissance antigénique indirecte, principale réaction mise en jeu dans le rejet chronique.

## **Mécanismes immunitaires impliqués**

### **Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)**

Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) code des molécules permettant la présentation d'antigènes aux lymphocytes. Les molécules de CMH de classe I présentent les antigènes endogènes aux lymphocytes CD-8<sup>+</sup> alors que les molécules de CMH de classe II présentent les antigènes exogènes aux lymphocytes CD-4<sup>+</sup>, déclenchant ainsi une réponse immunitaire. Présente à la surface des cellules, la « carte d'identité moléculaire du CMH » est spécifique à chaque individu.

C'est en 1930 que Gorer introduit le concept selon lequel le rejet d'un tissu étranger (du Non-Soi) est le résultat d'une réponse immunitaire de l'hôte dirigée contre les molécules de surface cellulaire du greffon. En transplantation, il est nécessaire d'évaluer la compatibilité de CMH entre un donneur et un receveur d'organe afin de minimiser les risques de développer une réponse immunitaire contre le greffon. Deux tissus antigéniquement semblables sont décrits comme histocompatibles.

Les molécules de CMH comprennent les Human Leucocyte Antigen (HLA) déterminés pour chaque donneur et receveur en transplantation.

Les traitements immunosuppresseurs inhibent la réponse immunitaire de l'hôte, permettant ainsi d'obtenir une compatibilité optimum entre le donneur et le receveur. L'utilisation de traitements immunosuppresseurs augmente considérablement la durée de vie du greffon. Cependant, encore aujourd'hui, des rejets pour la plupart chroniques ne sont pas empêchés.

## **Les cellules**

Le système immunitaire est un système de défense complexe qui fait intervenir une grande diversité de cellules et de molécules. Dans le cas de la transplantation d'organe, une réponse effectrice se met en place afin d'éliminer le « corps étranger ».

Dans un premier temps, suite à l'acte chirurgical de transplantation, l'inflammation locale attirera par chimiotactisme les cellules de l'immunité innée tels que les macrophages, les lymphocytes Natural Killer (NK), les cellules dendritiques (CD), ainsi que le système du complément (Kindt, *Immunologie* 2009).

Les cellules dendritiques, véritables sentinelles de notre organisme, ont la capacité de distinguer le « soi » du « non soi » et d'apprêter les molécules du « non soi » afin que ces dernières puissent être présentées aux lymphocytes, déclenchant ainsi une réponse immunitaire adaptative. On les appelle aussi les cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

Une fois les lymphocytes TCD-4 helper (Th) activés par la reconnaissance de l'antigène du « non soi » présenté par les CPA, ils vont sécréter plusieurs cytokines afin d'orienter et d'amplifier la réponse immunitaire. En fonction des cytokines sécrétées, les lymphocytes Th vont activer et/ou amplifier la différenciation des TCD-4 et TCD-8 en lymphocytes T cytotoxiques (Tc, majoritairement des TCD-8), des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps et l'activation des macrophages.

Les lymphocytes TCD-8, dit cytotoxiques (Tc), ont la capacité de détruire des cellules infectées par des agents pathogènes. Suite à la reconnaissance de fragments antigéniques associés aux molécules de CMH de classe I, le lymphocyte activé prolifère et se différencie d'une part en TCD-8 mémoires et d'autre part en TCD-8 cytotoxiques. Ces lymphocytes, aussi appelés « cellules tueuses », communiquent avec leurs cellules cibles. Le TCD-8 présente à sa surface la protéine CD178 (molécule Fas). Cette dernière va se lier au CD95 présenté par la cellule cible induisant ainsi la mort de la cellule via la voie des caspases. Un

autre mécanisme de mise à mort des TCD-8 fait intervenir des molécules contenues dans les granules du cytoplasme : perforine et granzymes. Une fois libérée par le TCD-8, la perforine va créer un canal dans la membrane de la cellule cible par lequel pourront passer les granzymes (protéases à sérines), capables d'activer les enzymes impliquées dans la dégradation de l'ADN et l'apoptose.

## **Les cytokines**

La réponse immunitaire est très finement mise en place, orientée et régulée. Une telle précision nécessite une organisation et par conséquent une importante communication entre tous les acteurs du système immunitaire (Kindt, *Immunologie* 2009). La communication intercellulaire est réalisée en partie grâce aux cytokines. Ce sont des protéines ou glycoprotéines qui peuvent participer à l'activation, l'orientation et la régulation du développement des cellules immunitaires effectrices ou posséder des fonctions effectrices directes.

Dans le cas de la transplantation d'organe solide, une inflammation locale est créée alertant les cellules de l'immunité innée et déclenchant la réponse immunitaire adaptative. Diverses cytokines sont sécrétées par les cellules situées dans la zone d'inflammation:

- L'interleukine-1 (IL-1), produite par les monocytes, macrophages, cellules endo- et épithéliales ; l'IL-1 cible l'endothélium vasculaire afin de favoriser la diapédèse.
- Le TNF alpha (Tumor Necrosis Factor), produit par les macrophages ; Le TNF alpha cible l'endothélium vasculaire, induit l'apoptose de nombreux types cellulaires et active les neutrophiles.
- L'interleukine 12 (IL-12), produite par les macrophages ainsi que par les cellules dendritiques. L'IL-12 cible les cellules NK et oriente l'immunité adaptative vers une réponse Th1.
- L'interleukine 6 (IL-6), produite par les cellules présentatrices d'antigène et les cellules endothéliales oriente l'immunité adaptative vers une prolifération des LB et une production d'anticorps.
- L'interféron alpha (IFN alpha) et l'interféron bêta (IFN bêta), sécrétés par les macrophages et les fibroblastes respectivement. Ils augmentent les cellules du CMH de classe I, activent les NK et présentent une activité antivirale.

D'autres cytokines, plus spécifiques de l'immunité adaptative permettent l'orientation et l'amplification de la réponse immunitaire (les interleukines 2, 4 et 5, l'interféron gamma).

Elles sont majoritairement sécrétées par les lymphocytes T. L'une d'elles nous intéressera plus particulièrement : l'interféron gamma (IFN gamma).

L'IFN gamma peut être produite par les lymphocytes non spécifiques NK de l'immunité innée, ainsi que par les lymphocytes spécifiques Th1 et CD8<sup>+</sup> de l'immunité adaptative. L'IFN gamma possède des effets antiviraux de par l'induction de protéines antivirales limitant la réplication virale. Cette cytokine augmente aussi des molécules de la famille B7 et l'expression du CMH de classe I et II sur les lymphocytes B et les macrophages. A forte dose, l'IFN gamma permet l'augmentation de la présentation antigénique.

## **Rejet hyper aigu**

Le rejet hyper aigu, où le greffon est rejeté très rapidement, en quelques minutes voire quelques heures, survient rarement aujourd'hui. Cette réponse rapide du système immunitaire est due à la présence d'anticorps anti-antigènes du greffon, déjà présents dans le sérum du receveur avant la transplantation. Ces anticorps sont dirigés vers les CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) du donneur d'organe : lors de la revascularisation du greffon, ces anticorps vont se fixer sur les cellules endothéliales. Les complexes immuns antigènes-anticorps formés vont activer le complément et conduire à une destruction de l'endothélium et à une thrombose du greffon.

La présence de ce type d'anticorps au sein du receveur est principalement due à des transfusions sanguines répétées, cependant on peut aussi les retrouver chez des patients qui ont déjà reçu une greffe. Plus rarement, ces anticorps peuvent être produits immédiatement après la greffe, on parle alors de rejet accéléré.

Il n'existe pas de traitement curatif de ce type de rejet, seule la prévention est possible par la recherche systématique des anticorps anti-HLA chez le patient lors du bilan de pré-transplantation, par l'exclusion des donneurs qui possèdent des molécules HLA contre lesquelles est immunisé le receveur et enfin par la réalisation d'un cross-match juste avant la transplantation. La technique du cross-match consiste à mettre en présence le sérum du receveur avec les lymphocytes du donneur et le complément. La lyse des lymphocytes est observée si les anticorps présents dans le sérum du receveur reconnaissent les molécules HLA du donneur. Un cross-match positif constitue une contre-indication à la transplantation.

## **Rejet aigu**

Le rejet aigu des allogreffes peut survenir quelques jours à quelques mois après la transplantation. C'est un rejet dit à médiation cellulaire car il fait intervenir directement les cellules du système immunitaire telles les macrophages et les lymphocytes de l'immunité adaptative. L'organe transplanté est dans un premier temps revascularisé. L'inflammation locale va permettre une infiltration massive de lymphocytes, de macrophages, de neutrophiles et d'autres cellules inflammatoires. Les lymphocytes T du receveur vont directement reconnaître les allo-antigènes du donneur, c'est ce que l'on appelle l'immunisation cellulaire du receveur. Les lymphocytes et les macrophages vont attaquer le greffon induisant sa nécrose et, par conséquent, son rejet.

Ce type de rejet doit être dépisté le plus tôt possible car un retard de prise en charge peut conduire à des lésions irréversibles du greffon et à sa destruction. L'apparition des traitements immunosuppresseurs a permis de fortement diminuer ce type de rejet. Tout arrêt de traitement conduit dans près de 100% des cas à un rejet aigu avec perte de fonction du greffon rénal et le retour à la dialyse.

## **Rejet chronique**

### **Définition**

Le rejet chronique reste la cause principale de la perte du greffon à long terme. Il s'inscrit dans le temps, les mécanismes du rejet chronique peuvent se développer des mois, voire des années après la transplantation, même après que les réactions de rejet aigu aient cessé. Il s'accompagne d'une lente dégradation de la fonction du greffon et s'intègre dans une entité plus largement nommée dysfonction chronique du greffon. La perte de fonction du greffon peut être multifactorielle : rejet chronique, toxicité des traitements immunosuppresseurs, hyper-tension artérielle...

Le rejet chronique regroupe deux types de réponses immunitaires provenant du receveur : la réponse à médiation humorale et la réponse à médiation cellulaire. Et c'est la combinaison de ces deux réponses qui aboutit, à long terme, au rejet de la greffe.

## **Rejet chronique en transplantation rénale**

Le dysfonctionnement chronique du greffon est la cause principale du rejet chronique d'allogreffe en transplantation rénale (Fadili *et al.*, 2013). Il est caractérisé par une perte lente et progressive du taux de filtration glomérulaire, la plupart du temps associée à une protéinurie ainsi qu'à une hypertension artérielle. Sur le plan histologique, l'atteinte vasculaire est quasi constante entraînant une endartérite oblitérante le plus souvent associée à des lésions de fibroses, d'atrophies tubulaires et glomérulaires.

Le dysfonctionnement chronique du greffon rénal possède trois causes immunologiques principales : le rejet chronique actif à médiation humorale, le rejet chronique actif à médiation cellulaire via les cellules T, la fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire sans étiologie spécifique. Ces causes immunologiques sont souvent associées à d'autres facteurs de risques qui vont accélérer la mise en place du dysfonctionnement chronique du greffon comme la néphrotoxicité des traitements immunosuppresseurs (principalement due à la ciclosporine A et au tacrolimus), l'hypertension artérielle ou encore certaines infections chroniques (polyomavirus...). L'historique clinique de la transplantation peut aussi intervenir fortement par la survenue d'un rejet aigu en amont, par les lésions d'ischémie-reperfusion, un diabète sucré préexistant ou encore une infection à cytomégalovirus (CMV) (Womer *et al.*, 2000).

L'âge du donneur a aussi été décrit comme étant un facteur de risque : plus le patient est âgé, plus il risque de faire un dysfonctionnement chronique du greffon (Ferlicot *et al.*, 2003), l'hypothèse de la sénescence répllicative est la plus répandue. Elle est basée sur un épuisement cellulaire conduisant à une dysfonction des cellules endothéliales et épithéliales et ainsi à la persistance d'un stimulus profibrotique.

Les mesures préventives du dysfonctionnement chronique du greffon rénal sont premièrement d'ordre médical et chirurgical. L'amélioration des techniques de transplantation permet de réduire l'incidence de la fonction retardée du greffon (DGF : delayed graft function). De plus la stratégie de compatibilité HLA en transplantation consiste à donner le rein d'un donneur qui possède le maximum de molécules HLA en commun avec celles du receveur, réduisant ainsi la réponse immunitaire dirigée contre les molécules du « non soi ». De la même façon un cross-match est réalisé. En parallèle, la recherche sur la combinaison des molécules immunosuppressives et sur la mise au point de nouveaux immunosuppresseurs permettraient de diminuer les toxicités liées aux traitements. D'autres mesures préventives sont directement dépendantes du patient, de son hygiène de vie et de sa compliance aux traitements.



## Rejet chronique en transplantation pulmonaire

En transplantation pulmonaire, la survenue des rejets aigus et chroniques est très fréquente : le rejet aigu peut toucher jusqu'à 80% des patients et le rejet chronique environ 50% à 3 ans post-transplantation. Il existe deux types de rejets chroniques, le rejet vasculaire chronique et le rejet chronique des voies respiratoires (Hayes, 2011).

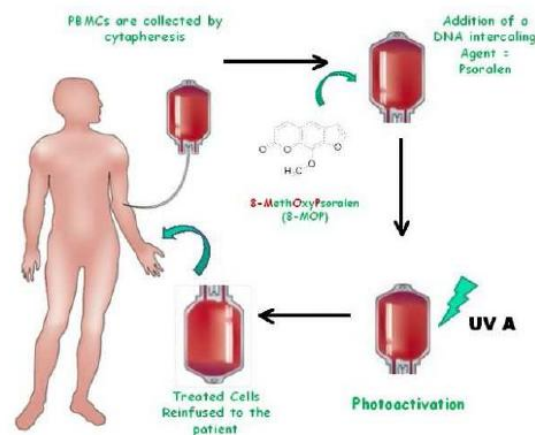
Le rejet chronique des voies respiratoires est le plus fréquent et se traduit par un dysfonctionnement chronique du greffon nommé syndrome de bronchiolite oblitérante (BO ou BOS). La bronchiolite oblitérante peut être associée, à des degrés variables, à la fibrose interstitielle, à la bronchite proximale et à la vasculopathie chronique. Elle est la conséquence d'un processus fibro-inflammatoire centré sur les bronchioles respiratoires et terminales aboutissant à l'oblitération totale de la lumière bronchique avec destruction des constituants de la paroi. La symptomatologie se limite à une toux, mais reste le plus souvent asymptomatique évoluant de façon variable vers une dyspnée d'effort tardive (la BO étant d'autant plus rapide qu'elle est précoce). La BOS est détectée par mesure du VEMS (Volume Expiratoire Maximale en 1 seconde), tomographie et peut être confirmée par biopsie (Theodore *et al.*, 1990). Il existe quatre stades dans la BOS, dépendants de l'avancée de la pathologie et deux sous-groupes : le grade O pour une VEMS > à 90% de la VEMS maximale, le grade O-p pour une VEMS comprise entre 81 et 90% de la valeur maximale, le grade 1 pour une VEMS comprise entre 66 et 80%, le grade 2 pour une VEMS entre 51 et 65% et le grade 3 pour une VEMS inférieur à 50% de la valeur maximale.

La pathogénicité de la BOS implique des mécanismes immunitaires et non-immunitaires. Le facteur de risque principal du développement d'une BOS est la survenue d'un rejet aigu. D'autres facteurs de risques immunologiques, comme le fort mésappariement HLA entre donneur et receveur, mais aussi non immunologiques, tels les infections virales (Cytomégalovirus Epstein Barr Virus), bactériennes ou fongiques (*Aspergillus*), le type de transplantation réalisée (poumon simple, double...), les lésions d'ischémie-reperfusion (défaillance primaire du greffon), le reflux gastro-oesophagien ou encore les altérations physico-chimiques locales peuvent conduire au rejet chronique. (Hayes, 2011, Reynaud-Gaubert, 2003)

La BOS est traitée principalement par renforcement (anticorps anti-lymphocytaires, bolus de méthylprédnisolone) et modification d'immunosuppresseurs. Une étude a démontré que la substitution de la ciclosporine par le tacrolimus stabilisait les mesures spirométriques (Cairn *et al.*, 2003). D'autres traitements existent, comme l'utilisation d'azithromycine permettant d'améliorer la VEMS de patients atteints de BOS après 6 mois de

traitement (Gottlieb *et al.*, 2008) ou encore la photo-chimiothérapie (photophérèse extracorporelle).

La photophérèse extracorporelle est une immunothérapie qui a montré son efficacité dans le traitement de maladies auto-immunes telles que les lymphomes, la sclérose en plaque... Son principe consiste à séparer les cellules mononucléées du sang périphérique afin de les mettre en contact avec un agent photosensible (8-méthoxypsoralène dit 8-MOP). Ces cellules sont ensuite exposées à un rayonnement ultra-violet avant d'être réinjectées au patient (Figure II).



**Figure II : Principe de la photophérèse extracorporelle (HAS, 2009).**

Suite aux ultra-violets, les lymphocytes du patient vont subir une apoptose alors que les monocytes se différencient en cellules dendritiques immatures (CDI). Les lymphocytes apoptotiques sont reconnus par les CDI qui les englobent et deviennent semi-matures. Une fois toutes ces cellules traitées réinjectées chez le patient, les CDI semi-matures vont migrer aux ganglions lymphatiques et présenter les peptides antigéniques aux LT naïfs tout en sécrétant de fortes quantités de TGF bêta et d'interleukine 10 (cytokines anti-inflammatoires). Grâce à cet environnement cytokinique, les LT naïfs se différencient en LT régulateurs (LTreg) les empêchant de devenir des LT effecteurs.

Les recherches en nouvelles thérapies ont permis de mettre en place la prise d'immunosuppresseurs par aérosol. Une étude récente montre que le tacrolimus administré par aérosol est associé à une amélioration de la capacité fonctionnelle et de l'oxygénation chez un patient atteint de BOS (Hayes *et al.*, 2010). D'autres travaux sont également en cours sur la recherche de nouvelles thérapies via les anticorps monoclonaux.

## Traitements immunosuppresseurs

Découverts dans les années 1960, les traitements immunosuppresseurs ont permis de fortement augmenter l'espérance de vie suite à une transplantation. Donnés à forte dose dans la semaine qui suit la transplantation d'organe, appelé traitement d'induction, les doses se font plus faibles par la suite. Cependant, leur toxicité à long terme reste un problème préoccupant. Les profils de toxicités sont différents en fonction du principe actif utilisé, mais les effets secondaires les plus souvent rencontrés sont :

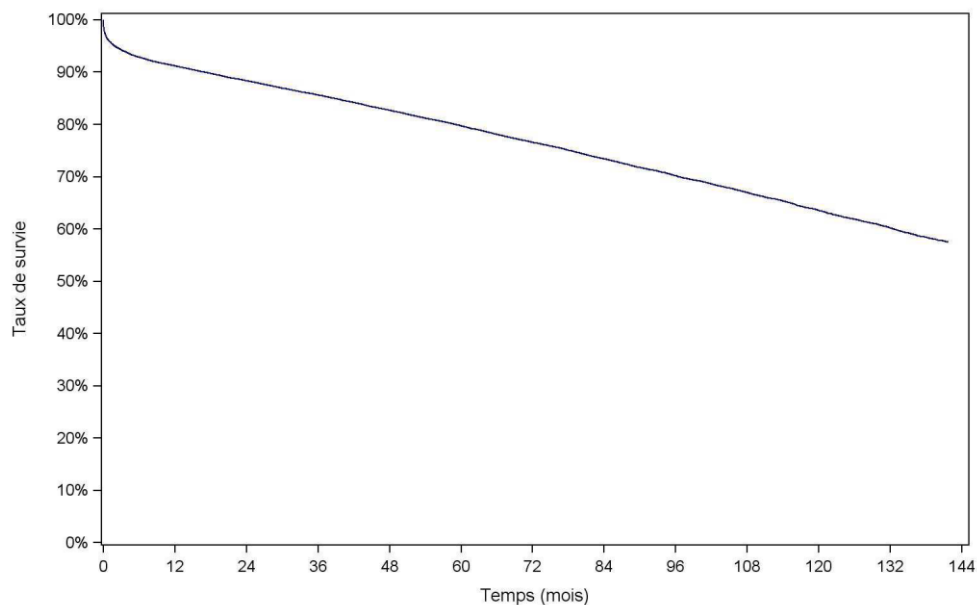
- la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine conduisant à une insuffisance rénale chronique chez les patients transplantés cardiaques, hépatiques ou encore pulmonaires. Dans le cas de la transplantation rénale, cette néphrotoxicité participe à la diminution de la survie des greffons à long terme et, d'un point de vue histologique, il est très difficile de différencier les lésions liées au rejet chronique de celles liées à la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine.
- une hypertension artérielle (HTA) pouvant être due à la ciclosporine, le tacrolimus et les corticoïdes.
- une ostéoporose, principalement due à la prise d'inhibiteurs de la calcineurine, mais aussi à la prise de corticoïdes.
- d'ordre hématologique en ce qui concerne l'azathioprine, le mycophénolate myofétil et la rapamycine (anémie, leucopénie, thrombopénie).
- d'ordre métabolique par l'apparition d'un diabète dû à la ciclosporine, au tacrolimus et aux corticoïdes ou par l'apparition d'une hyperlipidémie due à la ciclosporine, la rapamycine et les corticoïdes.

Les traitements immunosuppresseurs peuvent être associés à d'autres traitements afin d'éviter les complications précoces de la transplantation. C'est le cas des traitements antibiotiques et antiviraux.

# La transplantation rénale

## Historique

Le rein est historiquement le premier organe greffé. En France, la première transplantation rénale enregistrée dans Cristal date de 1959 et jusqu'à 2011, 64 124 greffes ont été réalisées. En France, c'est l'Agence de la BioMédecine (ABM) qui organise les prélèvements et la greffe. La transplantation rénale apporte au patient une meilleure qualité de vie, une meilleure survie par rapport aux patients restés sous dialyse et une meilleure gestion des coûts pour le système médical (un patient greffé ayant, à long terme, un coût de soin moindre qu'un patient dialysé).



**Figure III : Survie globale du greffon rénal entre 1993 et 2010** (ABM, rapport annuel de 2011). La survie du greffon en fonction du temps post transplantation est réalisée par analyse Kaplan-Meier. Elle présente, à 1 an, une survie de plus de 90% et, à 10 ans, une survie entre 60 et 70%.

## **Principales pathologies conduisant à une transplantation rénale**

### **Diabète insulino-dépendant**

Le diabète de type I, nommé diabète insulino-dépendant, est une maladie auto-immune. De nombreux facteurs de risques génétiques et environnementaux (infections, toxines...) favorisent le démarrage de la réaction auto-immune. Cette dernière aboutit à la destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans.

Le diabète insulino-dépendant conduit à la transplantation rénale lorsque la pathologie s'aggrave et crée une néphropathie diabétique. L'exposition à une hyperglycémie chronique n'est pas suffisante pour induire cette complication. Il existe des prédispositions génétiques et des défauts mécanistiques : des anomalies hémodynamiques, traduites par l'augmentation du débit sanguin rénal et de la pression des capillaires; et des modifications histologiques conduisant à une détérioration du rein et à terme à une perte de la fonction rénale (Rodier, 2001).

La cause diabétique conduisant à une transplantation rénale est en augmentation de par le fait d'une augmentation des malades ayant un diabète de type II (ABM, rapport annuel 2011). Elle représente 14% des nouveaux inscrits en attente d'une greffe rénale.

### **Glomérulonéphrite**

La glomérulonéphrite (ou glomérulite) est une atteinte des glomérules accompagnée d'un syndrome inflammatoire histologique et parfois clinique. Les glomérules peuvent être lésés par trois types de dépôts : les complexes immuns circulants antigène-anticorps, les anticorps circulants et les anticorps spécifiques dirigés contre les structures glomérulaires. Le complexe immun circulant antigène-anticorps représente le cas le plus fréquent : les complexes sont préformés dans le plasma et se déposent au niveau des glomérules. Le dépôt des anticorps circulants se fait sur des antigènes déjà fixés, dits « plantés », au niveau des glomérules ; c'est le cas pour la maladie du *Lupus*. Enfin, plus rarement, ce sont des anticorps spécifiques qui sont directement dirigés contre la membrane basale des glomérules, ils induisent alors une glomérulonéphrite rapidement progressive. En parallèle de l'atteinte immunologique, il peut survenir une coagulation intra-vasculaire, c'est-à-dire une obstruction massive des capillaires glomérulaires, et une atteinte dégénérative correspondant à la fibrose. (Fourcade, 2006)

Lorsque la cause de la glomérulonéphrite est connue, c'est-à-dire que l'atteinte rénale survient suite à une maladie identifiée, on parle de glomérulopathie secondaire. Par contre, lorsque l'atteinte rénale est isolée et sans étiologie connue on parle de glomérulopathie primitive ou idiopathique.

La glomérulonéphrite chronique est la cause principale de maladie rénale primitive conduisant à la transplantation, elle représente 21% des nouveaux patients inscrits sur liste d'attente de greffe rénale (ABM, rapport annuel 2011).

### **Polykystose rénale**

La polykystose rénale est une maladie génétique héréditaire, autosomique et dominante, caractérisée par le développement de multiples kystes intra-parenchymateux pouvant affecter simultanément les deux reins et parfois le foie.

Deux gènes sont impliqués dans cette pathologie: *PKD<sub>1</sub>* (85%) et *PKD<sub>2</sub>* (15%), localisés sur les chromosomes 16 et 14 respectivement et codant pour les protéines Polycystine 1 et Polycystine 2. Ces protéines sont impliquées dans la différenciation des cellules de l'épithélium tubulaire. Ces mêmes protéines altérées, ou manquantes, isolent les cellules épithéliales des néphrons formant des cavités kystiques. L'atteinte rénale est la conséquence du développement progressif de multiples kystes. La maladie polykystique conduit à l'insuffisance rénale chronique (IRC) qui peut évoluer en insuffisance rénale terminale amenant à la transplantation d'organe. Sa survenue dépend de l'âge du patient et du gène muté.

La polykystose rénale est une des pathologies principales conduisant à la greffe d'organe : elle représente 14,7% des patients nouvellement inscrits sur liste d'attente d'une greffe rénale.

### **La dialyse**

La dialyse, ou hémodialyse, est un traitement substitutif de la fonction rénale utilisé comme traitement ponctuel de l'insuffisance rénale aiguë et comme traitement à vie pour les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique ne pouvant être transplantés. La dialyse consiste à épurer le sang des déchets azotés (créatinine, urée), à corriger les déséquilibres en électrolytes et à évacuer l'excédent en eau stocké anormalement et non éliminé.

La dialyse implique d'importantes contraintes pour le patient. Des séances journalières d'une durée de 2 heures pour la dialyse aiguë, et trois séances par semaine d'une durée pouvant aller jusqu'à 5 heures pour la dialyse chronique. Lors de ces séances, divers problèmes peuvent survenir: agitation, convulsions, malaises, vomissements, céphalées, infections, crampes musculaires, arrêt cardio-respiratoire (liste non-exhaustive).

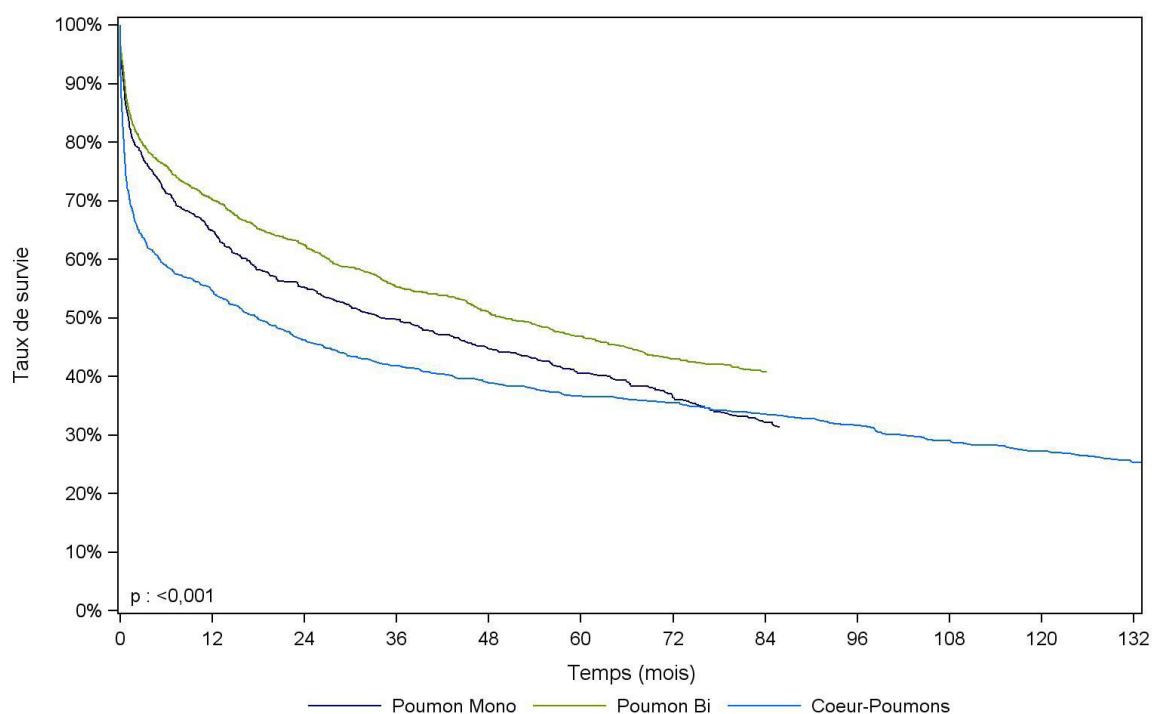
Il est donc intéressant pour les patients pouvant être transplantés d'être inscrits sur liste d'attente de greffe. De plus, la transplantation rénale apporte aux patients une meilleure qualité de vie quel que soit leur âge et une meilleure survie par rapport aux patients restés sous dialyse. C'est par ailleurs une économie pour le système médical puisqu'un patient greffé est à long terme moins coûteux qu'un patient dialysé.

## La transplantation pulmonaire

### Historique

Le premier essai de greffe pulmonaire a été réalisé en 1963 par Hardy aux Etats-Unis (Hardy *et al.*, 1963). Le patient a subi une transplantation mono-pulmonaire et il est décédé 18 jours plus tard. C'est en 1971 que (Derom *et al.*, 1971) a décrit une survie de 10 mois, démontrant ainsi la possibilité d'une espérance de vie plus longue des patients grâce à l'amélioration des techniques de transplantation et à l'évolution des connaissances vis-à-vis des événements cliniques post-greffe. Le poumon étant un organe de taille importante, il a posé de nombreuses complications et, pendant longtemps, la survie des patients n'était pas de longue durée. L'introduction de la ciclosporine, découverte par Borel en 1982 (Borel *et al.*), au sein des traitements immunosuppresseurs a permis d'augmenter cette durée de vie post transplantation. Cependant, il faudra attendre les années 90 pour que la transplantation pulmonaire s'étende comme traitement des atteintes respiratoires terminales, grâce à la technique de greffe bi-pulmonaire séquentielle.

En France, la première greffe pulmonaire enregistrée dans Cristal date de 1987 et depuis, 2961 greffes de poumons ont été réalisées (ABM rapport annuel 2011). Grâce aux nombreux progrès de ces dernières années dans le domaine de la recherche médicale, le nombre de transplantations pulmonaires réalisées augmente chaque année : +28% en 2011 (ABM rapport annuel 2011).



**Figure IV : Courbe de survie du receveur selon le type de greffe pulmonaire (1993-2010).** Un an après la greffe, 65% des malades greffés en mono-pulmonaire entre 1993 et 2010 étaient toujours vivants contre 70% en bi-pulmonaire et 55% en cœur-poumons. (ABM rapport annuel 2011)

## Principales pathologies conduisant à une transplantation pulmonaire

### La Mucoviscidose

La mucoviscidose est une des pathologies initiales principales conduisant à la transplantation pulmonaire (mono ou bi), cardio-pulmonaire voire multi viscérale. Elle représente 31% des greffes pulmonaires réalisées en France en 2011 (ABM, rapport annuel 2011). C'est une maladie génétique pour laquelle une base de données nationale très détaillée permet de connaître précisément l'épidémiologie de l'insuffisance respiratoire amenant la transplantation pulmonaire.

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomique récessive touchant le gène CFTR du canal chlore (chromosome 7). La mutation la plus fréquente (70% des patients) est la DF508, cependant, il existe plus de 1300 mutations identifiées. Le canal chlore muté présente un défaut quant au transfert ionique au niveau de l'apex des cellules épithéliales. Cette anomalie entraîne une déshydratation du mucus respiratoire et par conséquent un



encombrement bronchique important avec de forts risques d'infections et d'inflammation. A terme, le patient peut souffrir d'insuffisance respiratoire chronique. La mucoviscidose entraîne également une diarrhée chronique et une hypotrophie staturo-pondérale.

Il n'existe pas de traitement curatif de la Mucoviscidose, les traitements doivent assurer les fonctions nutritives et digestives du patient ainsi que prévenir la dégradation de la fonction respiratoire (kinésithérapie quotidienne, fluidifiant, anti-inflammatoire et antibiotique si nécessaire). Au stade le plus avancée de la Mucoviscidose les patients peuvent être sous oxygénothérapie et être inscrits sur liste d'attente d'une greffe pulmonaire.

Les critères de transplantation pulmonaire dans la Mucoviscidose sont les suivants : une VEMS<30% de la valeur prédite, une PaO<sub>2</sub><55 mmHg et une PaCO<sub>2</sub>>50 mmHg indiquant une survie spontanée à 2 ans de 50% (Kerem *et al.*, 1992).

### **Les BPCO (BronchoPneumopathie Chronique Obstructive)**

Les BronchoPneumopathie Chronique Obstructive sont définies par une limitation expiratoire permanente des débits aériens (obstruction lente et progressive des voies aériennes et des poumons). Les formes les plus sévères engagent le pronostic vital et représentent 30% des greffes pulmonaires réalisées en France en 2011 (ABM, rapport annuel 2011). La BPCO touche 3,5 millions de personnes en France en 2011 (INSERM). L'emphysème pulmonaire ainsi que la bronchite chronique composent les BPCO. La définition anatomique de l'emphysème est un élargissement permanent et anormal des espaces aériens associé à une destruction des parois alvéolaires sans fibrose pulmonaire. D'étiologie diverses, l'emphysème pulmonaire est fréquent et fait généralement suite à une bronchite chronique. Cependant, l'emphysème panlobulaire est une maladie autonome parfois due à un déficit en alpha-1-trypsine.

La cause principale des BCPO est le tabagisme (80 à 90% des cas), le tabac créant une réaction inflammatoire chronique des voies aériennes (bronchioles). Les BCPO se traduisent par une destruction de la matrice extracellulaire du poumon associée à une inflammation bronchique conduisant à des lésions anatomiques bronchiques. La pathogénie de l'emphysème par déficit en alpha-1-antitrypsine est la dégradation incontrôlée du tissu élastique pulmonaire par l'élastase neutrophilique. A terme, l'insuffisance respiratoire terminale qui en résulte mène automatiquement à la transplantation pulmonaire, seule thérapie possible.

## **La fibrose pulmonaire**

Il existe plusieurs types de pneumopathies interstitielles diffuses, certaines de causes connues (prolifération néoplasique, insuffisance cardiaque gauche, infections, pneumoconioses, alvéolite allergique extrinsèque et pneumopathies médicamenteuses) et d'autres de causes inconnues, dont la pneumopathie interstitielle diffuse idiopathique chronique. C'est au sein de cette dernière catégorie que va se trouver la fibrose pulmonaire idiopathique (Cottin & Cordier, 2006).

La fibrose pulmonaire idiopathique est une pathologie fibro-proliférative. Elle est à la fois la forme la plus fréquente et la plus sévère des pneumopathies interstitielles diffuses idiopathiques d'évolution chronique. Elle apparaît rarement avant 50 ans et sa symptomatologie regroupe une dyspnée d'effort d'installation progressive, une toux non productive et, dans 50% des cas, un hyppocratisme digital. La fibrose pulmonaire idiopathique ne possède aucun traitement curatif efficace, elle va évoluer progressivement vers une insuffisance respiratoire chronique, puis mener au décès (Cottin & Cordier, 2006).

La fibrose pulmonaire représente 22% de l'activité de transplantation en greffe pulmonaire (ABM, rapport annuel 2011).

## **La transplantation mono-pulmonaire**

La transplantation mono-pulmonaire se fait du côté droit ou gauche et dépend des antécédents chirurgicaux du patient, de la maladie initiale et de la présence ou non d'une infection chronique. On préférera une transplantation mono-pulmonaire en cas de fibrose, par exemple, et une transplantation bi-pulmonaire en cas d'emphysème.

Un des avantages de la transplantation mono-pulmonaire est « l'économie d'organe ». En effet, avec ce type de greffe, deux receveurs peuvent bénéficier des poumons sains d'un seul donneur. De plus, l'intervention est plus rapide et ne nécessite pas toujours la mise en place d'une CEC (Circulation Extra-Corporelle).

En 2011, la transplantation mono pulmonaire a représenté 26% de l'activité de greffe pulmonaire (Table II).

Année de greffe	Nombre de greffes de coeur-poumons	Nombre de greffes de poumon	Greffes bipulmonaires	Greffes monopulmonaires	Dont nombre de greffes avec donneurs vivants
1997	25	65	46	19	1
1998	26	88	52	36	0
1999	28	71	40	31	1
2000	25	70	38	32	1
2001	26	91	63	28	2
2002	20	89	54	35	1
2003	16	76	61	15	0
2004	22	145	98	47	1
2005	21	184	118	66	0
2006	22	182	129	53	0
2007	20	203	154	49	0
2008	19	196	143	53	0
2009	21	231	175	56	0
2010	19	244	184	60	0
2011	12	312	230	82	0

**Tableau II : Evolution de l'activité de greffe pulmonaire et cardio-pulmonaire** (Agence de la BioMédecine 2011).

## La transplantation bi-pulmonaire

C'est la transplantation pulmonaire la plus fréquente (soit 73% de l'activité de greffe pulmonaire). Elle présente de meilleurs résultats sur la survie post-greffe que la transplantation mono-pulmonaire (Table II).

La technique de transplantation bi-pulmonaire en « bloc » est décrite en 1988 par Patterson et al (Patterson *et al.*, 1988), puis elle a évolué au début des années 1990 en transplantation bi-pulmonaire séquentielle ou bilatérale. Son principe consiste à utiliser le « meilleur » des deux poumons du receveur pour maintenir l'oxygénation durant la greffe du premier poumon du donneur. Ainsi, le premier poumon greffé sera directement fonctionnel et permettra l'oxygénation durant la greffe du second poumon du donneur. Cette technique chirurgicale permet de ne pas avoir recours à la CEC.

A la fin des années 1990, Couetil propose la transplantation lobaire bi-latérale qui sera par la suite perfectionnée (Couetil *et al.*, 1997).

## **La transplantation pulmonaire multi viscérale**

La transplantation pulmonaire multi-viscérale peut être de plusieurs types, le poumon pouvant être transplanté en même temps que d'autres organes (cœur, foie, rein, îlots de Langerhans...).

La plus fréquente est la transplantation cœur-poumon pour le traitement des Hyper Tension Artérielles (HTA).

# Eléments de génétique

## Généralités

### Historique

Initiées par les travaux de Mendel reposant sur des croisements de variétés de petits pois (1865), les découvertes portant sur la génétique, l'hérédité, et par conséquent l'évolution, se sont succédées. Ainsi les chromosomes, porteurs cellulaires des gènes, assurent l'hérédité c'est-à-dire la transmission à la descendance des caractères parentaux. Il est acquis aujourd'hui que chaque gène peut exister sous une diversité de formes appelées « allèles ». Ces différentes formes proviennent de changements héréditaires, nommés « mutation », qui touchent le gène lui-même. Une mutation est une modification soudaine et transmissible d'information génétique.

L'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) est décrit comme support de l'information génétique la première fois en 1944 par Avery, microbiologiste, à partir des observations originales des travaux de Griffith de 1928. La mise en commun des observations de Watson et Crick leur a permis d'établir que l'ADN possède une conformation en hélice double brin. L'ADN est constitué de 4 bases azotées, d'une part des purines l'Adénine (A) et la Guanine (G), et d'autre part des pyrimidines la Cytosine (C) et la Thymines (T). Chacune des bases existe sous deux conformations en équilibre que l'on appelle des tautomères. Cet équilibre est fortement déplacé vers les structures conventionnelles, qui sont les configurations prédominantes et essentielles pour l'appariement des bases (A étant apparié avec T et C avec G). La possibilité de former des tautomères est une source d'erreurs durant la synthèse de l'ADN, lors de sa réplication.

La génomique est l'étude de la structure, du contenu et de l'évolution des génomes. Un de ses objectifs est d'évaluer la variabilité de l'ADN à l'intérieur d'une même espèce. Il existe une grande variété de polymorphismes génétiques, ceux impliquant plusieurs bases telles que les microsatellites, les répétitions longues de séquences, les insertions d'éléments transposables, les délétions allant de quelques bases à plusieurs mégabases... et le

polymorphisme génétique impliquant une base unique nommée SNP (prononcé « snip ») pour Single Nucleotide Polymorphism. Cette dernière catégorie représente à elle seule 90% de l'ensemble des polymorphismes génétiques humains (Frazer *et al.*, 2007). Dans cette étude, nous nous intéressons tout particulièrement à ce type de polymorphisme.

## **Le Single Nucleotide Polymorphism (SNP)**

Le SNP est la source la plus importante de variations héréditaires à l'échelle moléculaire. Il en existe de différents types : substitution, insertion ou encore délétion. Les SNP sont classés en fonction de la nature et de l'emplacement du nucléotide modifié. Ainsi les SNP non codants, se situent dans les régions 5' ou 3' non transcrites, les régions 5' ou 3' non traduites, dans les introns ou encore dans les régions intergéniques. Ces mutations sont principalement silencieuses, c'est-à-dire sans effet, cependant certaines peuvent se situer dans des zones de régulation de la transcription du gène et par conséquent avoir une influence, on les appelle SNP non codants, non silencieux. Les SNP dits codants se situent dans les régions transcrites et traduites de l'ADN. Ils peuvent être silencieux, lorsque la substitution ne modifie pas l'acide-aminé initialement traduit (grâce à la dégénérescence du code génétique) ; ou au contraire modifier la chaîne d'acides-aminés lors de la traduction. C'est le cas des délétions/insertions car ces mutations décalent le cadre de lecture et peuvent créer un codon STOP, empêchant ainsi d'obtenir une protéine complète (ce qui peut aussi être le cas avec la substitution). La découverte de la séquence complète du génome humain a permis de comparer le génome de deux individus. Ainsi, 99,9% de notre séquence d'ADN est commune avec un second individu. Les 0,1% restant contiennent des allèles pouvant être associés à un facteur de risque augmenté de développer une pathologie complexe telles les maladies auto-immune (MS, 2006).

## **Le projet HapMap**

Le projet HapMap international, composé de 9 groupes à travers le monde, a été développé dans le but de simplifier les recherches en association génétique et suit 4 étapes de travail. La première permettant d'établir une carte des haplotypes au sein du génome humain à partir de quatre populations : Caucasiennes, Chinoises, Japonaises, Nigérianes ; soit 269

individus au total. La seconde étape utilise la base de données précédente afin d'identifier toute les 5000 paires de base (pb), des SNP communs c'est-à-dire présents chez plus de 5% de la population. La troisième étape est de déterminer les SNP marqueurs (tag SNP) et la dernière étape consiste à développer de nouvelles technologies de génotypage, d'analyse ainsi que d'aider à la conception d'études cliniques et de guide d'éthique (MS 2006).

La première phase du projet HapMap a déterminé un million de SNP dans au moins une des 4 populations participant à l'étude. Lors de la phase II, près de 3 millions de SNP supplémentaires ont été mis en évidence (MS, 2006).

## **Etablissement d'une étude génétique**

Afin d'aider les chercheurs à réaliser une étude génétique forte et valable, un groupe international de travail s'est intéressé à rassembler toutes les étapes importantes nécessaires pour appuyer des associations mise en évidence entre SNP et évènements cliniques.

## **Strengthening the reporting of genetic associations (STREGA)**

L'objectif du STREGA est d'homogénéiser les démarches réalisées pour les études d'associations génétiques afin de donner plus de validité, de transparence aux résultats indépendamment des choix effectués lors de la conception de l'étude, de sa réalisation et de son analyse. Le STREGA est une évolution du STROBE spécifique des études épidémiologiques (Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology) par ajout de divers items caractéristiques d'études d'association génétique. Le rapport STREGA, soutenue par de grands journaux scientifiques tels The Lancet ou Nature Genetics, est le fruit d'un groupe de travail rassemblant plusieurs spécialités : généticiens, épidémiologistes, statisticiens, scientifiques et cliniciens. Les études génétiques ne sont pas dans l'obligation de suivre la démarche proposée par STREGA, cependant, suivre ces recommandations peut donner plus de valeur au travail réalisé.

Les recommandations de STREGA portent notamment sur la sélection de la population, la variation de la modélisation des haplotypes, l'équilibre d'Hardy-Weinberg, la cohorte de répliation, la justification du choix des gènes et variants, les effets du traitement à l'étude de caractères quantitatifs, les méthodes statistiques, la parenté, la communication des

données descriptives, les résultats et le volume des émissions de données qui sont importants à considérer dans les études d'association génétique.

## **Equilibre d'Hardy-Weinberg**

L'équilibre d'Hardy-Weinberg est un principe fondamental en génétique des populations établi par Hardy et Weinberg qui soutient que les fréquences génotypiques à un locus donné demeurent constantes au sein d'une génération d'accouplement aléatoire (le choix de son partenaire ne dépend pas de son génotype). Afin de conserver cette stabilité de génération en génération, cinq conditions doivent être respectées : une population de grande taille, une absence de sélection naturelle, de mutation et de migration (c'est-à-dire qu'aucune copie allélique n'est apportée de l'extérieur), et enfin des unions aléatoires entre les individus (Valérie Jomphe, 2006).

On appelle déséquilibre d'Hardy-Weinberg un écart par rapport à l'indépendance entre allèles pour un seul locus. Lorsque des allèles situés à minimum 2 loci ne sont pas transmis de façon indépendante, on parle de déséquilibre de liaison (DL). En d'autre terme, le DL mesure la fréquence avec laquelle les allèles de deux polymorphismes se retrouvent sur le même chromosome ou haplotype. Le DL est influencé par le phénomène de recombinaison lors de la méiose et il diminue proportionnellement à la distance séparant les polymorphismes.

## **Etude d'association**

Une étude d'association vise à mesurer une différence de fréquence allélique entre un groupe témoin et un groupe cas, l'ensemble composant d'une population entière. Cette approche présente des résultats plus précis et puissants lorsque les variations en cause ont un risque relatif (RR) faible par rapport à une étude de déséquilibre de liaison (restreinte à quelques familles).

En génétique, les études dites d'association sont réalisées à partir de SNP ayant une fréquence de l'allèle mineure supérieur à 1% au sein de la population étudiée. De nombreuses recherches sont réalisées sur les SNP afin d'établir leur « rôle » au sein de pathologies, l'objectif étant de mettre en évidence des marqueurs génétiques de risques de développer la maladie.



## Etudes génétiques et transplantation

En transplantation d'organe solide, peu de recherches d'association de SNP et d'évènements cliniques post transplantation sont réalisées du fait du faible nombre de patients qui constituent les cohortes et de l'absence de validation des données par une cohorte de réplification.

A partir des années 1980, des études d'association génétiques sont apparues dans le domaine de transplantation d'organe afin de déterminer s'il existait des facteurs de risque génétiques prédisposant à la perte de greffe, c'est-à-dire favorisant les rejets (aigu et chronique), la reprise retardée de la fonction du greffon, les infections virales et bactériennes. La première étude, portée par Dausset, a décrit le polymorphisme présent au sein du gène du CMH.

Le polymorphisme présent au sein du gène du TGF bêta a été décrit au sein de différentes cohortes de transplantation. Le TGF bêta est une cytokine clé dans l'inflammation aiguë, elle inhibe les médiateurs pro-inflammatoires et la prolifération des cellules T dépendantes de l'IL-2 et pourrait jouer un rôle important dans l'initiation et le développement du rejet aigu et chronique. Le SNP décrit au sein du gène du TGF bêta (codon 25 : G915C) montre que l'allèle variant C a été associé à une forte diminution de TGF bêta circulant, les patients homozygotes GG en produisant deux fois plus que les patients homozygotes CC. La forte concentration en TGF bêta conduit à la mise en place d'une fibrose au sein du greffon, conduisant au rejet chronique au sein de différentes cohortes de transplantation d'organe (rénale, pulmonaire et hépatique). Cependant, dans l'étude de Benza et.al, 2010, réalisée chez des patients transplantés cardiaques l'effet inverse est constaté pour les patients âgés de plus de 55 ans. Les patients homozygotes GG effectuent moins de rejets aigus que les patients possédant un allèle variant C.

Une étude plus récente (Allam *et al.*, 2013) a été réalisée chez des patients transplantés hépatiques infectés par le virus de l'hépatite C (n=327). Le polymorphisme rs12979860 (C>T), présent au sein du gène de la protéine IL28B (aussi appelé interféron lambda 3), est associé à la survie des greffons hépatiques et au retard de la « récurrence » du virus de l'hépatite B. Les patients homozygotes mutants (TT) présentent une moins bonne survie des greffons hépatiques et une expression plus faible de l'ARNm de la protéine IL28B, par

rapport aux patients possédant au moins un allèle sauvage C. Cet effet étant absent chez les patients transplantés hépatique non infectés par le VHC (n=293).

Etude génétique en transplantation rénale : récemment, Goldfarb *et al.*, 2010, a rassemblé toutes les études réalisées sur la recherche de facteurs de risques génétiques influençant le rejet aigu du greffon rénal. De nombreux SNP, présents au sein des gènes codant pour les cytokines (IL-2, IL-8, IL-18), ont été associés au rejet aigu du greffon. Cependant, le manque de cohorte de validation empêche de statuer sur l'association réelle de ces polymorphismes. De même pour le SNP présent au sein des gènes codant pour la protéine Fas. En ce qui concerne les gènes codant pour l'IFN gamma, le TNF bêta 1, IL-6 ou encore le TGF, il existe les deux types d'études : des études décrivant une association des SNP avec le rejet aigu et un nombre équivalent démentant cet effet. Le sujet est encore plus controversé en ce qui concerne 3 SNP présents dans le gène de l'IL-10 (-1082A/G, -819C/T et -592C/A) puisque 7 études décrivent une association contre 6 études qui la démentent (détection de faux positifs ?) ou encore les SNP présents au sein du gène du TNF alpha avec 9 études décrivant une association et 7 études établissant l'absence de mutation. C'est en 2011 qu'une étude multicentrique permet de statuer sur la plupart de ces polymorphismes (Oetting *et al.*, 2011). La mutualisation de 5 centres a permis de rassembler 969 patients et seul le SNP présent au sein du gène codant pour le facteur V de coagulation est décrit comme étant associé au rejet aigu du greffon rénal suite à une analyse multivariée, aucune association n'a été observée pour les SNP présents au sein des gènes codant pour l'IL-10 et le TNF alpha.

La survie à long terme suite à une transplantation pulmonaire est la moins bonne de toutes les survies à long terme. Plusieurs études ont été réalisées afin de mettre en évidence des facteurs génétiques pouvant influencer le devenir du greffon : les SNP présents au sein des gènes codant pour l'interféron gamma (A874T), le TGF bêta1 (G915C) et l'IL-6 (-174GC) ont été associés à la fibrose post transplantation pulmonaire et à la mise en place de la BOS (Kastelijjn *et al.*, 2012). D'autres SNP ont été étudiés au sein des gènes codant pour Toll-Like receptors, CD14, « lectine liant le mannose », « killer immunoglobuline like receptors » et « matrix metalloproteinase » et associés à la mise en place de la BOS. Cependant le manque de cohorte de validation ne permet pas d'affirmer ces associations.

# Le Cytomégalovirus

## Généralités

Le cytomégalovirus humain, hCMV, aussi appelé herpèsvirus humain 5 (HHV-5), appartient à la famille des béta herpèsviridae. Le CMV humain dérive d'un *Herpes viridae* ancêtre direct des CMV qui a coévolué avec l'espèce humaine depuis 80 millions d'années et a ainsi développé des mécanismes d'adaptation à l'hôte. Il est le plus grand des virus herpès, il contient un génome d'ADN double brin linéaire d'environ 240 kpb contenu dans une nucléocapside icosaédrique elle-même enveloppée par une matrice protéique dite tégument (Chen *et al.*, 1999, Crough & Khanna, 2009). Environ 165 gènes codent pour des protéines virales exprimées aux phases « immediate early (IE), early (E) et late (L) ». Le génome du CMV contient plus de 200 cadres de lecture à partir desquels de nombreuses protéines effectrices vont être générées, et la majorité d'entre elles vont moduler les réponses innées et adaptatives de l'hôte (Varani & Landini, 2011).

La transmission se fait par contact direct ou indirect avec des fluides corporels infectés. L'incidence de primo-infection au CMV augmente avec l'âge aussi 60 à 100% de la population adulte est infectée par le CMV qui établit une période de latence rythmée par des réactivations récurrentes tout au long de la vie de l'hôte (impliquant les étapes de primo-infection, latence et réactivation). A la phase aiguë de l'infection, plusieurs types cellulaires peuvent être infectés notamment les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les neurones, les hépatocytes, le trophoblaste, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques (Varani & Landini, 2011).

Il existe deux risques majeurs liés directement au CMV : l'infection à CMV et la maladie à CMV. L'infection à CMV est l'isolement du virus ou la preuve d'une réplication active du virus par des techniques de biologie moléculaire, immunologiques ou encore par séroconversion du patient. La maladie à CMV présente des signes histologiques d'invasion tissulaire, une culture cellulaire positive ou encore un syndrome caractéristique d'une pathologie à organe imputée au CMV.

L'incidence du CMV en transplantation d'organe peut varier de 30 à 86% avec un taux de mortalité de 2 à 12%.

## Cycle viral

Il existe trois formes d'infection active du CMV: la primo-infection, l'infection endogène d'individus séropositifs qui développent une réactivation de la latence, et la réinfection exogène d'individus précédemment infectés qui déclarent une infection à partir d'une souche différente du virus. A l'inverse de la phase active de l'infection, le virus n'établit une latence à vie que dans un nombre limité de types cellulaires comme les progéniteurs hématopoïétiques, les monocytes et possiblement l'endothélium.

La pénétration du CMV dans les cellules nécessite l'expression à leur surface du récepteur PDGFRa (Soroceanu *et al.*, 2008). Toutes les cellules où le CMV est entré ne sont pas permissives pour une réplication complète et pour la production de particules virales ; les fibroblastes et les cellules de la lignée macrophages/DC constituent les cellules les plus permissives.

Après être entré dans une cellule, le CMVh a deux voies possibles : une infection productive (dans une large gamme de types de cellules) ou latente (dans un nombre limité de types cellulaires).

Les études récentes sur les réponses immunitaires lymphocytaires T-CMV-spécifiques ont révélé que le CMV est probablement l'antigène immunodominant le plus rencontré par le système immunitaire humain (Sylwester *et al.*, 2005). Suite à l'infection, le CMV entraîne une forte expansion de la population lymphocytaire T-CMV-spécifiques. De ce fait, une part importante du répertoire immunitaire est réquisitionnée lors des épisodes de réplication virale. Ce phénomène n'est pas sans conséquence étant donné qu'il pourrait provoquer une réduction de la disponibilité et de la diversité du répertoire TCR sur le long terme, surtout chez les personnes âgées.

## L'infection à CMV chez le sujet immunocompétent

L'infection à CMV peut être symptomatique chez le sujet immunocompétent. Elle se traduit en général par un syndrome « mononucléosique » associant fièvre, parfois élevée à 40°C, asthénie, toux sèche, adénopathies et des signes biologiques (neutropénie, thrombopénie, cytolyse hépatique). Certaines complications ont été décrites au cours de la primo-infection, notamment une polyradiculonévrite de type Guillain-Barré, des myocardites

et des colites ulcéreuses. Par ailleurs, une association entre infection à CMV et installation de désordres auto-immuns a été évoquée chez des sujets auparavant en bonne santé. L'infection à CMV active a été corrélée à des vascularites. Ces dernières années, l'accent a été mis sur la fonction pathogène de la réplication du CMV dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et leurs formes sévères. L'inflammation chronique associée aux maladies auto-immunes pourrait fournir un microenvironnement favorable pour la réactivation du CMV à partir des macrophages ; cette inflammation peut induire la maturation des DC et ainsi entraîner une réactivation du virus (Varani & Landini, 2011).

## **L'infection à CMV chez le patient immunodéprimé**

Les patients dits immunodéprimés regroupent tous les individus ayant un fort déficit immunitaire dont les sidéens et les patients transplantés. Les infections CMV appartiennent aux infections opportunistes les plus communes survenant après une greffe. Chez ces patients, elle se traduit par un large éventail de symptômes, allant de la virémie asymptomatique à la maladie tissulaire invasive pouvant conduire parfois au décès. Les syndromes cliniques sont différents selon les types de greffe et le degré d'immunosuppression. Les formes les plus sévères se développent chez des receveurs de moelle allogénique.

## **Le CMV dans un contexte d'inflammation**

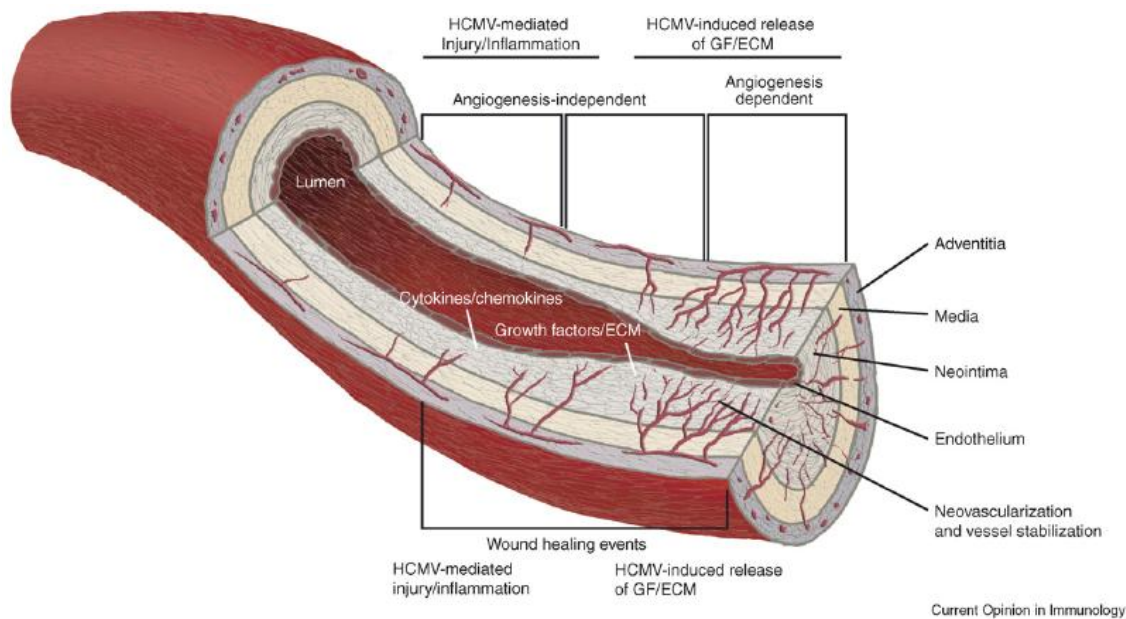
Très adapté à son hôte, le CMV humain, généralement asymptomatique chez les individus immunocompétents, déclenche des effets néfastes chez les patients immunodéprimés. Ces effets se répartissent en 2 catégories. Une première caractérisant une infection aiguë avec présence de signes cliniques (fièvre, la mononucléose et la maladie d'organe invasive) et une seconde catégorie couvrant un large éventail d'effets dits indirects. Ce sont ces derniers qui, à long terme, induisent de graves conséquences à la fois sur l'allogreffe et sur le système immunitaire des receveurs (Rubin, 1989).

## Les effets directs du CMV

Les effets directs se manifestent essentiellement par des symptômes infectieux aigus comme la fièvre et des signes d'atteinte d'organes cibles (cytolyse hépatique, diarrhée, pneumopathie aigue). La maladie CMV invasive est suspectée par l'association d'une symptomatologie évocatrice et d'une charge virale élevée. Sa confirmation se fait par détection du virus par immunohistochimie dans les organes cibles (poumons, colon, rétine...). Le traitement par ganciclovir est efficace sur cette symptomatologie par inhibition de la synthèse de l'ADN polymérase virale. Il permet donc de traiter une maladie active mais pas une infection latente.

## Les effets indirects du CMV

Le CMV est aussi associé à des effets indirects (Freeman, 2009), indépendants du niveau de virémie et qui regroupent l'ensemble des effets liés à de longues périodes de réplication virale active à bas bruit et en partie causée par la réponse immunitaire de l'hôte. Ils sont de trois types : d'une part, l'infection à CMV augmente l'immunosuppression systémique prédisposant ainsi à des surinfections opportunistes ; d'autre part, elle soulève aussi le risque de certaines formes de cancer, en particulier le syndrome lymphoprolifératif B lié à l'EBV dont l'incidence pourrait être augmentée de 7 à 10 fois par l'infection à CMV (Carstens *et al.*, 2006, Rubin, 1989) ; et, enfin, elle pourrait contribuer à une atteinte du greffon par la promotion de la vasculopathie qui possède un rôle déterminant dans la longévité de l'allogreffe (Carstens *et al.*, 2006) (Pereyra & Rubin, 2004) (Li *et al.*, 2007). Un modèle du rôle du CMV dans l'accélération de la mise en place du rejet chronique de l'allogreffe a été décrit par Streblow en 2007 (Streblow *et al.*, 2007) (Figure V).



**Figure V : Rôle du cytomégalovirus dans l'accélération de la mise en place du rejet chronique de l'allogreffe** (Current Opinion in Immunology, (Streblow *et al.*, 2007)). Chez les patients transplantés d'un organe solide infectés de façon chronique au CMV, le virus peut se réactiver à partir de monocytes infectés de manière latente ou à partir des cellules endothéliales (CE) en présence d'environnement inflammatoire. La blessure des CE, créée lors de l'acte de greffe, est cruciale dans le développement de la maladie vasculaire associée au rejet chronique. Sa « réparation » implique la libération locale de facteurs de croissance, de chimiokines et de cytokines, ainsi que la régulation positive des molécules d'adhésion à la CE, qui favorisent ainsi la migration des monocytes / macrophages et l'adhésion des plaquettes au site blessé. La cicatrisation des plaies et les processus d'angiogenèse conduisent à la migration des cellules et à leur prolifération au lieu de l'inflammation, ce qui conduit à un rétrécissement éventuel du vaisseau pouvant aboutir à son occlusion, et à terme à un échec de la greffe due à une ischémie.

## Réactivation, latence et inflammation

L'initiation d'une réplication virale à partir d'un état de latence n'est pas due à l'immunosuppression mais est liée à l'activation du système immunitaire. La différenciation cellulaire ainsi que les signaux cytokiniques proinflammatoires (TNF $\alpha$  notamment) mènent à la sortie de latence du virus. Dans le contexte de la greffe, il a été montré que l'inflammation stérile induite par l'ischémie/reperfusion est un facteur de sortie de latence, le promoteur du CMV est exprimé secondairement à la production de ROS (Kim *et al.*, 2005). Dans les modèles animaux il est maintenant bien établi que la transplantation sans immunosuppression déclenche la sortie de la latence virale (Hummel *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2008b). L'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B est cruciale pour l'activation du promoteur précoce immédiat majeur (MIEP) du CMV (DeMeritt *et al.*, 2004). NF- $\kappa$ B est présent dans le

cytoplasme des cellules sous forme inactive lié à un inhibiteur I $\kappa$ B. Après liaison du TNF $\alpha$  à son récepteur membranaire, une levée d'inhibition de NF- $\kappa$ B est induite par l'action de l'enzyme I $\kappa$ B kinase, NF- $\kappa$ B transloque vers le noyau où il se fixe à la région enhancer IE du CMV pour initier la réplication virale. La liaison de particule virale à la surface cellulaire semble avoir la même action, induisant une autoamplification de la production virale.

Le rôle de l'inflammation comme facteur de la réactivation CMV a été depuis confirmé par de nombreuses études cliniques chez l'homme. Ainsi, ces études indiquent clairement que l'immunosuppression n'est pas nécessaire pour déclencher la réactivation CMV, c'est bien plutôt l'activation immunitaire qui constitue le facteur important de la réactivation du CMV.

## Le CMV en transplantation d'organe

Le CMV est l'agent pathogène principal responsable d'infections fréquentes chez les patients transplantés. L'infection latente à CMV est transmise plus efficacement par la transplantation d'organes solides que par la greffe de moelle osseuse. Particulièrement en greffe de poumon, ce dernier présentant une charge particulièrement élevée du génome viral latent (Thomas *et al.*, 2009).

Dans le contexte de transplantation d'organe, il a été rapporté une sensibilité particulière des greffons face au virus du CMV par rapport aux organes natifs. L'organe greffé qui est le siège d'une réponse alloimmune constitue probablement un milieu favorable à la réactivation itérative indépendamment de toute virémie (Baron *et al.*, 2010). L'infection à CMV entraîne une immunosuppression transitoire potentialisant les surinfections de divers pathogènes. L'utilisation d'une prophylaxie anti-CMV a montré une amélioration dans la prévention d'infections bactériennes et fongiques (Varani & Landini, 2011). L'action immunosuppressive du CMV se déroule à plusieurs niveaux de la réponse immunitaire. Les patients atteints de mononucléose à CMV diminuent leur réaction d'hypersensibilité retardée aux antigènes de rappels, et réduisent leur réponse lymphoproliférative aux mitogènes et aux antigènes spécifiques.

In vitro, le CMV agit sur la réponse T en réduisant la prolifération lymphocytaire en réponse aux mitogènes. Les cellules présentatrices d'antigènes infectées par le CMV vont diminuer leur capacité de phagocytose, de différenciation, de migration, de maturation et de présentation antigénique par une réduction de l'expression des molécules CMH à la surface



cellulaire. Son implication dans le développement de syndromes lymphoprolifératifs post-greffe associé à la réplication EBV a été rapporté mais reste un sujet de controverse (Varani & Landini, 2011). Cependant l'impact clinique des effets immunosuppresseurs du CMV à long terme en transplantation d'organe reste difficile à évaluer.

## **CMV et transplantation cardiaque**

La participation du virus à l'inflammation interstitielle dans les organes greffés a été rapportée et semble varier selon le type d'organe transplanté, le cœur étant l'organe pour lequel le lien a été le plus clairement établi. Ainsi, de nombreuses études expérimentales animales ont permis d'établir un lien physiopathologique entre l'infection à CMV et la dysfonction des greffons. Cependant en clinique ce lien reste discuté, essentiellement du fait de l'absence d'analyse systématique de la réplication virale dans les greffons. Le système vasculaire semble cependant être central et l'action du CMV pourrait se faire à plusieurs niveaux : par dysfonction des cellules endothéliales infectées, par mort cellulaire, par agression cytokinique pro-inflammatoire de la paroi du vaisseau et par action du CMV sur un autre type cellulaire (Baron *et al.*, 2010). Chez l'homme, une infection CMV qu'elle soit symptomatique ou asymptomatique a un impact négatif sur la survie à long terme des allogreffes cardiaques, et est associée à une artériopathie du transplant.

En transplantation cardiaque, la sclérose vasculaire chronique du transplant (en anglais CAV), est fortement associée au CMV (Valantine, 2004). Elle se caractérise histologiquement par une prolifération intimale concentrique et entraîne une hypoperfusion diffuse responsable de la dysfonction du greffon. Ainsi il a été rapporté que l'ADN viral est fréquemment retrouvé dans l'intima des explants cardiaques ayant une vasculopathie d'allogreffe et qu'une réponse immunitaire précoce chez des patients recevant une prophylaxie par gancyclovir limite la vasculopathie d'allogreffe cardiaque. Une étude importante de 2009 en greffe cardiaque chez la souris a montré que l'infection latente par le CMV des souris receveuses de greffe cardiaque diminuait fortement la survie des greffons chez des animaux qui recevaient un protocole d'induction de tolérance (Cook *et al.*, 2009). Les auteurs ont par ailleurs montré que la majorité des cœurs qui provenaient de souris donneuses non infectées présentaient une réplication virale active et une forte production d'IFN $\alpha$  au sein du greffon responsable de la régulation de la réponse immunitaire locale.

## CMV et transplantation rénale

Deux écoles quant à l'impact du CMV sur les greffons rénaux : la première considère que l'infection à CMV en transplantation rénale accélère la mise en place de la dysfonction chronique du greffon (rejet chronique) alors que la seconde école récuse toute influence du CMV sur le devenir des greffons rénaux.

Une étude chez 63 receveurs d'une allogreffe rénale humaine a signalé que la persistance de l'infection à CMV dans les greffons affectait la survie du greffon (Helanterä *et al.*, 2006). Fait intéressant, dans 17 des 48 patients (35%) ayant des antécédents d'infection à CMV, ces auteurs ont constaté que le CMV a persisté dans l'allogreffe rénale plus de 2 mois après la dernière antigénémie CMV positive dans le sang ou l'urine. Ce résultat est en accord avec les données expérimentales sur des animaux montrant que l'infection des tissus pourrait être détectée longtemps après la disparition de CMV dans le sang. Ainsi, ces études ont suggéré sans le démontrer qu'une bonne maîtrise de l'infection à CMV locale peut influencer le devenir de la greffe et il semble que certaines personnes ont un meilleur contrôle que d'autres.

Lors d'une autre étude, les patients séronégatifs pour le CMV (R-) recevant un greffon de donneurs ayant aussi une sérologie négative pour le CMV (D-) présentent un taux de survie du greffon 10% plus important que les patients R- ayant reçu un greffon d'un donneur à sérologie positive pour le CMV (D+) (Pascual *et al.*, 2012). Suite à la transplantation rénale, une maladie à CMV peut conduire à diverses modifications au sein des cellules immunitaires favorisant le rejet aigu (Salvadori *et al.*, 2005). De même, une autre équipe décrit que le dysfonctionnement chronique du greffon rénal est également accéléré par une infection à CMV, ce virus étant associé à une régulation positive des facteurs de croissances TGF bêta et PDGF (Platelet Derived Growth Factor) dans les cellules endothéliales ainsi que du facteur de croissance du tissu conjonctif dans les fibroblastes (Inkinen *et al.*, 2005).

Plusieurs études de cohorte ont montré que l'infection CMV était associée à un risque accru de rejet de greffe en transplantation rénale, pulmonaire et hépatique. Enfin, une étude de notre centre, portant sur 1232 patients greffés rénaux de Tours a montré que recevoir le rein d'un donneur infecté par le CMV était un facteur de risque significatif de perte de greffons rénaux à long terme ( $p=0,008$ ). Une étude multivariée a permis de montrer que l'effet restait significatif (hazard ratio=1,4,  $p=0,01$ ) dans un modèle d'ajustement comprenant l'âge du donneur, le type de traitement immunosuppresseur (Mycophenolate mofetil, cyclosporine,

tacrolimus), la survenue d'un rejet aigu et l'année de greffe (manuscrit en soumission). Cette étude aux côtés des nombreuses publications sur des modèles animaux suggère donc un rôle pour la réplication virale au sein du greffon (microinfection du greffon) comme facteur de perte de greffons en greffe rénale chez l'homme (Baron *et al.*, 2010).

La prophylaxie au Ganciclovir diminue et retarde la mise en place de l'infection à CMV mais ne peut pas totalement la prévenir notamment chez les patients transplantés rénaux D+R- (Carstens *et al.*, 2005).

## **CMV et transplantation pulmonaire**

L'incidence du CMV sur le devenir du greffon dans la transplantation pulmonaire est encore aujourd'hui controversée, cependant de nombreuses études décrivent ce virus comme ayant un rôle direct dans la mise en place du syndrome de bronchiolite oblitérante (BOS), qui révèle la survenue du rejet chronique du greffon pulmonaire. Trois principaux facteurs de risque de développement de BOS ont été décrits par le consortium ISHLT (International Society for Heart and Lung Transplantation) en 2001 : le rejet aigu, la maladie pulmonaire à CMV et la bronchite lymphoïde (Estenne *et al.*, 2002). L'évolution de l'utilisation de traitements prophylactiques anti-viraux a permis de diminuer les pneumonies à CMV. Cependant, une étude récente réalisée chez 192 patients transplantés pulmonaires a démontré que, malgré une prophylaxie anti-CMV courte (3-5 mois), 41% des patients ont développé des signes de réplication du CMV au sein du greffon et que toute détection de la réplication du CMV dans le liquide broncho-alvéolaire était associée à un risque accru de développement de BOS (Paraskeva *et al.*, 2011).

De la même façon, au sein d'une étude réalisée afin d'étudier la prophylaxie anti-CMV (Thomas *et al.*, 2009) chez 78 patients transplantés pulmonaires, une association significative est mise en évidence entre l'infection à CMV et la dysfonction chronique du greffon même chez les patients séropositifs au CMV (la prophylaxie à l'acyclovir ponctué de bolus de GCV est efficace chez les patients R+ mais c'est un échec cuisant pour les D+R-).

Une étude scandinave menée par Johansson (Johansson *et al.*, 2010) et réalisée à partir d'une cohorte de 187 patients transplantés pulmonaires a étudié l'impact du CMV sur le devenir du greffon. En fonction de la sérologie CMV des donneurs (D+/D-) et des receveurs (R+/R-), l'impact du virus n'est pas le même. En effet au sein de cette cohorte, 88% des patients D+R- ont développé une maladie à CMV par rapport à 40% des patients double

positifs (D+/R+) et à 26% des patients D-R+. Les auteurs ont démontré une association entre la maladie à CMV et le risque accru de développer un rejet chronique tel le BOS.

Enfin, très récemment un travail a été réalisé sur la durée optimale de la prophylaxie à CMV chez les patients à haut risque, c'est-à-dire des patients séronégatifs au CMV recevant un greffon de donneur séropositif (R-D+) ou des patients séropositifs au CMV (R+) (Hammond *et al.*, 2012). Lors d'une durée de prophylaxie de 6 mois seuls quelques patients R+ ont développé une maladie à CMV. En revanche, même avec une prophylaxie de 12 mois, les patients D+R- restent les plus à risque de développer une maladie à CMV.

A contrario, une étude a démontré que l'infection à CMV traitée par le gancyclovir n'est pas associée à l'apparition d'une BOS (Tamm 2004). En effet, la fréquence des infections à CMV a fortement diminuée depuis la mise en place de la prophylaxie anti-CMV comme le décrit une étude multicentrique espagnole (Aguilar-Guissado, 2007, AJT). Aujourd'hui, tous les patients à risques (donneur séropositif et receveur séronégatif au CMV) reçoivent une prophylaxie à base de gancyclovir. Une étude plus récente, réalisée chez 175 patients transplantés pulmonaires de Zurich (entre 1992 et 2005), démontre qu'une prise prolongée de cette prophylaxie diminue l'incidence de l'infection ainsi que la maladie à CMV ( $p < 0,001$ ) par rapport aux patients d'autres études présentes dans la littérature (regroupant 274 patients n'ayant pas reçu de traitement prophylactique anti-CMV) (Chmiel *et al.*, 2008). La prophylaxie par le gancyclovir (GCV) ou le valgancyclovir (VCV) diminue aussi l'apparition de BOS ( $p = 0,002$ ) augmentant de cette façon la survie à long terme du greffon ( $p = 0,036$ ).

## **CMV et résistance aux antiviraux**

Cependant deux problèmes principaux subsistent : la prophylaxie permet l'émergence de souches virales du CMV résistantes aux antiviraux tels le GCV ou le VCV ce qui ne fait que retarder la survenue d'infection et de maladie à CMV chez certains patients. Le traitement prophylactique GCV ou VCV n'est pas donné en continu tout au long de la vie du patient post-transplantation. Etant en balance avec les traitements immunosuppresseurs, il n'est administré qu'un temps retardant l'action du CMV qui peut encore profiter des périodes « vierges » en antiviraux pour émerger de son état de latence. L'apparition de souches du CMV résistantes aux antiviraux se multiplie, principalement en transplantation pulmonaire (Humar & Snyderman, 2009), il en existe deux grands groupes ciblant l'UL97 et l'UL54. La

région UL97 code pour une phosphotransférase indispensable à l'activation du GCV, la présence d'une mutation peut nuire au bon fonctionnement de l'antiviral. D'un autre ordre, les mutations présentes au sein de la région UL54 conduisent à une modification de l'ADN polymérase causant ainsi une résistance aux antiviraux tels le GCV (Avery, 2007). L'importance de la résistance dépend de la localisation des mutations responsables. Le mésappariement des sérologies CMV des donneurs et receveurs, une prophylaxie prolongée au GCV oral ou encore une intense immunosuppression sont des facteurs de risques de développement de souches résistantes.

Récemment, une étude de la résistance aux antiviraux chez les patients transplantés rénaux a été publiée (Couzi *et al.*, 2012). L'incidence des résistances est évaluée chez des patients séronégatifs au CMV et recevant un rein d'un donneur séropositif en fonction qu'ils aient reçu 3 mois de traitements prophylactique au Valganciclovir (32 patients) ou qu'ils suivent une thérapie préemptive (80 patients). Les facteurs de risques de développer une résistance aux antiviraux établis au terme de l'étude sont une thérapie préemptive pour les patients qui présentent une forte charge virale et la détection de l'ADN virale 8 semaines après le début du traitement prophylactique.

## **Réponse immune anti-CMV et échappement immunitaire du virus**

Le CMV humain, qui a coévolué avec son hôte, a développé des mécanismes d'adaptation très diversifiés contribuant au maintien de la réplication virale. L'échappement immunitaire dans le cadre d'infection virale chronique nécessite des actions coordonnées de plusieurs types cellulaires.

Les cellules CD4+ jouent un rôle central dans ce processus puisqu'elles orchestrent la réponse immunitaire (Gamadia *et al.*, 2001). En cas de primo-infection CMV, la formation de lymphocytes T CD4 spécifiques du CMV précède l'apparition d'anticorps spécifiques. Leur rôle dans certaines infections virales chroniques a été approché aussi bien par des modèles animaux qu'en pathologie humaine. Les souris CD4 KO infectées par le LCMV présentent des CD8 spécifiques du virus déficients. De la même façon, lors de l'infection VIH, le maintien d'une réponse cytotoxique T et le contrôle de la virémie sont facilités par une forte réponse CD4 initiale.

Les cellules CD8 éliminent les cellules infectées par le virus et sont les cellules majeures du contrôle des infections persistantes. Communément, l'auto-renouvellement

régulier des cellules CD8 mémoires est sous le contrôle de l'IL 7 et de l'IL 15 (Shin *et al.*, 2007). En cas d'infection chronique, la différenciation des cellules T CD8 antigène spécifique peut se faire différemment. En effet, l'expression des récepteurs à l'IL 7 et L'IL 15 (respectivement CD127 et CD122) sont sous-exprimés en cas d'infection virale chronique. En cas d'infection CMV, de nombreuses cellules CD8 cytotoxiques différenciées sont formées lors de la primo-infection et se multiplient tout au long de la vie de l'hôte. Il a été suggéré que le maintien des cellules T hautement différenciées nécessitait une stimulation antigénique chronique, cela donnerait à penser que le virus n'atteint jamais une latence complète et durable mais se réactive plutôt de façon itérative à basse fréquence et est contrôlé par les CD8 de l'hôte. L'appréciation du phénotype des cellules T lors de la primoinfection par le CMV chez un hôte non immunodéprimé est difficile puisque la primo-infection est le plus souvent asymptomatique. Cependant, la situation de greffe « mismatch » pour le CMV avec donneur séropositif au CMV, permet de connaître la date de la contamination mais seulement chez des patients immunodéprimés. L'étude réalisée par Van Leeuwen *et al.*, a pu ainsi estimer le phénotype des cellules CD8 spécifique du CMV dans cette situation (van Leeuwen *et al.*, 2006). Ils ont pu mettre en évidence une modification des marqueurs membranaires en fonction du temps et confirment une baisse de l'expression du récepteur de l'IL7 à la surface des CD8 mémoires. Ces résultats suggèrent la nécessité d'un contact antigénique fréquent pour entretenir un pool de CD8 spécifique du CMV.

La capacité du CMV à moduler la réponse immunitaire de l'hôte lui permettant de survivre est un phénomène décrit depuis de nombreuses années, cependant les mécanismes sont multiples et seulement partiellement compris (Varani & Landini, 2011). Le phénomène d'épuisement clonal induit par les stimulations antigéniques répétées lors d'infections virales chroniques est un mécanisme clé pour l'échappement viral. Ce phénomène rend les cellules progressivement incapables d'induire une réponse immunitaire antivirale effectrice efficace (Wherry, 2011). La protéine Programmed Cell Death-1 (PD-1) a été montrée *in vitro* comme étant très importante dans ce phénomène. Récemment en clinique humaine, il a été établi récemment une participation majeure de la protéine Programmed Cell Death-1 (PD-1) dans le contrôle de la charge virale de virus persistants dont le VIH (Quigley *et al.*, 2010).

# Programmed Cell Death-1 (PD-1) protein

## Généralité

La protéine Programmed-cell Death-1 est une molécule de co-inhibition codée par le gène *PDCDI* présent sur le chromosome 2. Elle appartient à la super famille B7-CD28 et est exprimée à la surface des cellules T et B activées. La liaison de la protéine PD-1 à ses ligands (PD-L1 ou PD-L2) exprimés sur les cellules présentatrices d'antigènes (APC) résulte en un signal négatif dans le lymphocyte lorsque le TCR ou le BCR sont simultanément engagés. L'inhibition de la réponse immune par PD1 est encore incomplètement comprise et ne résultent pas uniquement d'une modulation directe du signal TCR.

## PD-1 et la réponse immunitaire

### Généralités

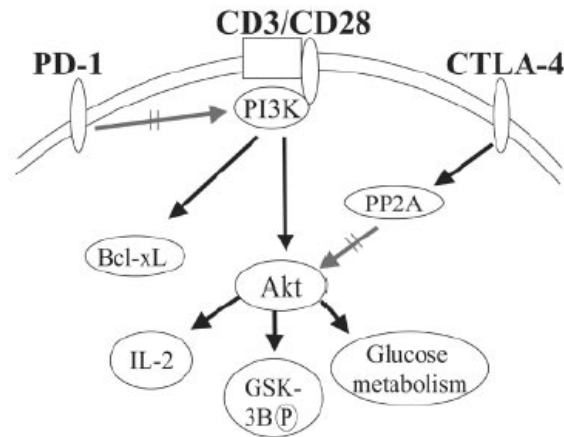
La protéine Programmed Cell Death-1 (PD-1) par sa liaison avec ses ligands PD-L1/PDL2 induit des signaux inhibiteurs au LT importants pour la régulation de la réponse immunitaire et au maintien de la tolérance au soi (Lieping 2004).

Ce récepteur de surface PD-1, aussi appelé CD279, appartient à la superfamille B7. Il est inductible après activation à la surface des cellules T CD4+ et CD8+, des cellules Natural Killer, des lymphocytes B et enfin des monocytes. Son expression est induite après engagement du récepteur T (TCR) ou B (BCR) et est augmentée après stimulation par le TNF $\alpha$ . Il se lie à deux ligands, PD-L1 et PD-L2 dont le profil d'expression diffère, l'expression de PD-L2 étant plus restreinte que celle de PD-L1. PD-L2 (ou B7-DC ou CD 273) est inductible à la surface des DC, macrophages et mastocytes, alors que l'expression de PD-L1 (ou B7-H1 ou CD 274) est plus large avec une expression constitutive sur les cellules T et B, les DC, les macrophages, les mastocytes et les cellules souches mésenchymateuses (Sharpe *et al.*, 2007). PD-L1 est aussi surexprimé après activation cellulaire. Une autre

différence entre les ligands de PD-1 est la large expression de PD-L1 par des cellules non hématopoïétiques telles que les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules musculaires, les hépatocytes, les cellules des îlots pancréatiques, les astrocytes et au niveau des sites de privilèges immunitaires (oeil et placenta). Cette expression étendue de PD-L1 à la surface des tissus non lymphoïdes suggère que PD-L1 pourrait participer à la régulation des cellules T et B auto-réactives et à la régulation de l'inflammation aussi bien dans les tissus que dans les organes lymphoïdes. Les interférons  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  induisent une surexpression de PD-L1, et dans une moindre mesure, de PD-L2. L'IL-4 et le GM-CSF induisent une surexpression de PD-L2 à la surface des DC in vitro. Les ligands de PD-1 à la surface des DC influencent la fonction de ces cellules. In vitro, la culture de cellules dendritiques avec une forme soluble de PD-1 entraîne une diminution des marqueurs de maturation des DC (CD40, B7-1, B7-2) et augmente la production d'IL-10 par les DC. Enfin, lors d'une réponse immunitaire active, comme une infection aiguë ou un rejet de greffe, PD-L1 est largement exprimé sur les splénocytes.

PD-1 est un récepteur de surface monomérique constitué d'un seul domaine variable « Immunoglobuline-like » et d'un domaine intra cytoplasmique contenant deux motifs Tyrosine. Par sa liaison à ses ligands et l'engagement simultané du TCR ou du BCR, il transmet des signaux inhibiteurs aux lymphocytes, importants pour la régulation de la réponse immunitaire et au maintien de la tolérance au soi. Après liaison à ses ligands, la phosphorylation du deuxième résidu Tyrosine induit le recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2. Le recrutement des phosphatases conduit à la déphosphorylation de molécules effectrices activées par le TCR ou le BCR (comme Syk ou PI3-kinase-OH). Le signal PD-1 réduit l'activation médiée par CD-28 de la PI3-kinase-OH, supprimant ainsi la phosphorylation d'Akt, le métabolisme du glucose et l'expression du gène codant pour la protéine de survie Bcl-xL (Parry *et al.*, 2005).





**Figure VI : Modèle de l'inhibition des lymphocytes T médiée par la protéine PD-1** (Parry *et al.*, 2005). La protéine PD-1 inhibe directement l'activité de la PI3K (phosphatidylinositol-3- kinase) réalisant une inhibition de la fonction des lymphocytes T peut-être plus globale que via CTLA-4.

Des études ont été réalisées afin de comprendre ce phénomène d'inhibition de la réponse immune par la protéine PD-1. Il a été suggéré par Parry *et. al* (Parry *et al.*, 2005), que la protéine PD-1 associée à l'activation du CTLA-4 limite le métabolisme du glucose grâce à la liaison de son domaine ITSM (Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif), avec des facteurs encore inconnus induisant un effet antagoniste à la voie des PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase), bloquant ainsi l'activation de la sérine/thréonine kinase Akt essentielle, entre autres, à la synthèse de l'interleukine 2 et au métabolisme du glucose (Figure VI).

Une étude (Quigley *et al.*, 2010) a démontré que la liaison de PD1 avec PDL1 induisait une augmentation d'expression de certains gènes comme celui de *B-ATF* (Basic Leucine Transcription Factor) au sein des lymphocytes T à l'origine d'une inhibition de l'activation de ce dernier. La protéine B-ATF appartient à la super famille de facteurs de transcriptions AP-1 (Activating protéine 1)/ATF) et inhibe la fonction des facteurs de transcription AP-1 et donc la prolifération des lymphocytes T (Echlin *et al.*, 2000). Dans ce cas précis il est supposé que l'augmentation de B-ATF dans la cellule lymphocytaire va engendrer une hétéro dimérisation des protéines B-ATF avec les membres de la famille des protéines Jun qui entrent en compétition avec les hétéro dimères Fos/Jun pour la même cible d'ADN. A la différence des protéines Fos, B-ATF ne possède pas de domaine d'activation de la transcription. Le dimère B-ATF/Jun a donc pour effet d'empêcher la fonction des facteurs de transcription d'AP-1.

## PD-1, tolérance et auto-immunité

La voie PD-1/PD-L1/2 est impliquée dans le maintien de l'équilibre entre les signaux de stimulation et d'inhibition des réponses immunitaires anti-infectieuses et la tolérance au soi. Son implication dans la tolérance est à la fois centrale et périphérique. La voie PD-1/PD-L1/2 semble jouer un rôle majeur dans la tolérance périphérique par le biais de plusieurs mécanismes (Chen 2004). PD-1 et PD-L1 sont fortement exprimés au niveau des sites de privilèges immuns que sont l'œil et le placenta. Chez la femme gestante, PD-L1 est fortement exprimé au niveau du syncytiotrophoblaste et PD-L2 au niveau des cellules endothéliales placentaires. L'administration d'anticorps anti PD-L1 à des souris gestantes augmente le taux d'avortement et est associée à une infiltration accrue des cellules T dans le placenta. L'utilisation d'anticorps bloquants PD-1 ou PD-L1 accélère le rejet d'allogreffe de cornée. Par contre, la protéine de fusion PD-L1-Ig qui inhibe l'activation des cellules T in vitro prolonge la survie des allogreffes de cornée in vivo et supprime l'infiltration par des cellules inflammatoires.

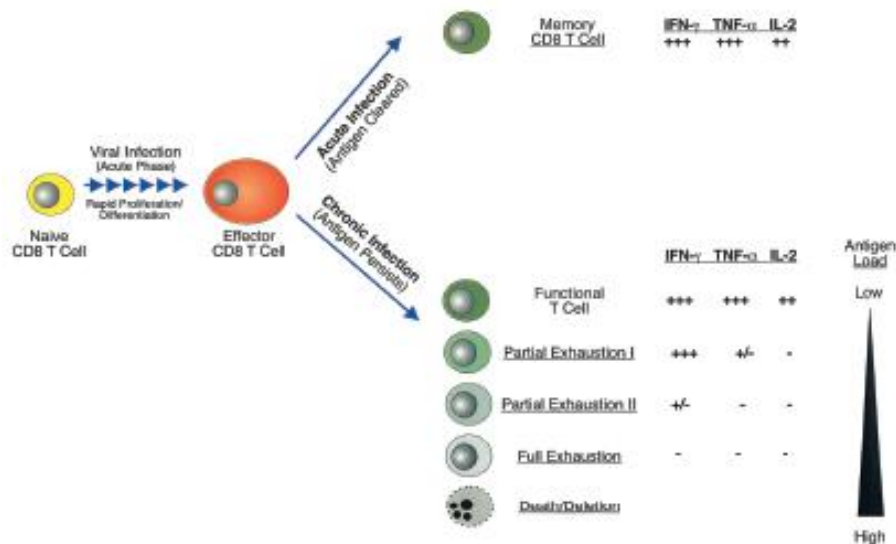
En dehors de ces sites particuliers, la voie PD-1/PD-L1/2 joue un rôle tout aussi important dans la tolérance. Des études portant sur des modèles murins d'auto-immunité ont permis d'apprécier davantage le rôle de la voie PD-1/PD-L (Sharpe *et al.*, 2007). Chez des souris *PDCDI*<sup>-/-</sup>, un déficit en PD-1 conduit au développement spontané d'une maladie lupus-like d'apparition tardive et d'une cardiomyopathie dilatée associée à des auto-anticorps anti-troponine. Ainsi, l'interaction PD-1/PD-L1/2 jouerait un rôle important à la phase initiale d'activation et de prolifération des cellules T auto-réactives et influencerait également les fonctions des T effecteurs auto-réactifs. Cela aurait un impact sur les lésions tissulaires induites par la réponse inflammatoire locale.

Les études chez des patients atteints de maladies auto-immunes suggèrent également d'importantes fonctions régulatrices de PD-1 et de ses ligands. L'expression de PD-L1 sur des monocytes humains non activés est faible et son expression est fortement augmentée par l'IFN- $\beta$ . Chez des sujets atteints de scléroses en plaques traités par IFN- $\beta$  pendant 6 mois, l'étude de l'expression d'ARNm PD-L1 avant et après traitement a rapporté une augmentation de 8 fois la quantité de transcrite produite après traitement, faisant évoquer qu'une partie de l'effet anti-inflammatoire de l'IFN- $\beta$  serait due à l'expression de PD-L1 (Sharpe *et al.*, 2007). L'ensemble de ces résultats suggère que la fonction inhibitrice de la voie PD-1/PD-L1/2 contribue au développement de maladies auto-immunes.

## PD-1 et échappement viral

### Généralités

De nombreux pathogènes responsables d'infections chroniques exploitent la voie PD-1/PDL1/2 pour se soustraire aux mécanismes immunitaires effecteurs de l'hôte. Il semble également que cette voie pourrait réguler les lésions tissulaires immuno-induites au cours des infections virales. Dans un modèle murin d'hépatite infectieuse, les souris *PDCD1*<sup>-/-</sup> infectées par l'adénovirus guérissent plus rapidement mais développent des lésions tissulaires plus sévères que le type sauvage (Sharpe *et al.*, 2007). Les infections virales chroniques se caractérisent souvent par un dysfonctionnement des cellules T, aussi appelé épuisement clonal (clonal exhaustion) (Wherry, 2011). Au cours de l'infection chronique à LCMV, les cellules CD8<sup>+</sup> spécifiques du virus perdent la capacité de produire des cytokines, de lyser les cellules infectées et de proliférer, d'une manière progressive et très hiérarchisée dans le temps. Typiquement, les fonctions telles que production d'IL-2, capacité de prolifération et cytotoxicité sont perdues en premier (Blackburn 2010). D'autres propriétés, comme la capacité de produire du TNF, sont perdues aux étapes intermédiaires de la dysfonction. L'épuisement sévère conduit finalement les cellules T spécifiques des virus à perdre partiellement ou totalement la capacité de produire de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ou à dégranuler, le stade final de l'épuisement étant la suppression physique des lymphocytes T spécifiques du virus (Wherry *et al.*, 2003) (Wherry, 2011). De telles cellules T épuisées ont été retrouvées au cours de nombreux types d'infections virales chroniques.



**Figure VII: Modèle de la perte de fonction des lymphocytes T de façon hiérarchique durant une infection virale chronique** (Wherry, 2003). Les cellules T mémoires qui persistent en absence de l'antigène, suite à une infection aiguë, sont entièrement fonctionnelles et capables de synthétiser de manière immédiate de l'IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , et d'IL-2 lors d'une nouvelle rencontre avec l'antigène dont elles sont spécifiques (en haut). La persistance du virus induit différents niveaux fonctionnels des lymphocytes TCD8 (en bas). Les cellules T fonctionnelles peuvent coexister avec le virus si les rencontres avec l'antigène sont rares. L'épuisement partiel I représente l'étape durant laquelle les sécrétions d'IL-2 et de TNF $\alpha$  sont affaiblies alors que la capacité de produire de l'IFN $\gamma$  reste inchangée. L'épuisement partiel II représente l'étape où la production d'IFN $\gamma$  devient à son tour compromise. A ce stade, certaines cellules fonctionnelles peuvent être détectées par la sécrétion d'IFN $\gamma$ . L'épuisement total est la perte complète de toutes les fonctions effectrices y compris la production de l'IL-2, du TNF $\alpha$  et de l'IFN $\gamma$ . Au final, la suppression des cellules CD8 épito-spécifique pourrait survenir si la présentation de l'épitope était trop longue ou élevée. Cette perte de fonction de façon hiérarchique est considérablement influencée par l'antigène même en présence d'une faible concentration du virus.

In vivo il a été établi récemment que la protéine Programmed Cell Death-1 (PD-1) jouait un rôle majeur dans les mécanismes d'échappement par le virus HIV (Benedict *et al.*, 2008, Quigley *et al.*, 2010). L'expression de B-ATF dans les lymphocytes T CD8 spécifique du HIV est évaluée *in vivo* au sein d'une cohorte de patients séropositifs HIV comprenant des « progressseurs » (patients ne contrôlant pas l'infection) et des « contrôleurs » (patients contrôlant l'infection). Il est observé que des LT CD8 spécifique du HIV des patients progressseurs expriment plus fortement B-ATF que ceux des patients « contrôleurs ». Il est par la suite démontré que cette augmentation d'expression de B-ATF coïncide avec la régulation positive de la protéine PD-1.

## PD-1 et CMV

L'étude de Sester *et al* (Sester *et al.*, 2008) suggère indirectement un rôle *in vivo* de PD-1 dans le contrôle de l'infection CMV humaine chez des patients transplantés rénaux. Cette étude a démontré que chez des patients présentant une virémie positive au CMV, les cellules T CD4 spécifiques du CMV possèdent une surexpression de la protéine PD-1 à leur surface, une diminution de l'expression de l'IFN $\gamma$  ainsi qu'une forte baisse de production d'IL-2. Plus récemment, l'étude de Krishnan *et.al* (Krishnan 2010) rapporte une diminution significative de la prolifération des cellules T CD4 et T CD8 spécifiques du CMV lorsque l'hôte déclare une maladie à CMV. Et c'est durant cette période qu'une augmentation de l'expression de PD-1 est observée à la surface des cellules T spécifiques du CMV ainsi qu'un haut niveau d'IL-10 dans le plasma de l'hôte.

Chez la souris, les données de l'étude de Benedict *et.al* (Benedict *et al.*, 2008) suggèrent que le CMV murin (mCMV) exploite la balance de co-signalisation pour induire des cellules dendritiques suppressives et inhiber l'induction de réponses de cellules T antivirales, par down-regulation des molécules de CMH et de co-stimulation associé à un maintien de PD-L1.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que toute modification de l'expression de PD-1 pourrait affecter le niveau de répllication et de charge virale en CMV dans les greffons en clinique humaine. Et donc en tenant compte des données sur le rôle du CMV, une modification de l'expression de PD-1 sur les LT anti CMV pourrait altérer la survie des greffons.

## Le polymorphisme génétique au sein du gène *PDCDI*

La publication de la séquence du génome humain en 2001 et les travaux plus récents du « consortium international sur le génome humain » ont démontré qu'il existait d'importantes variations génétiques appelées polymorphismes (Venter *et al.*, 2001). A l'opposé des mutations somatiques, ces polymorphismes sont stables et héritées de façon mendélienne. Les variations interindividuelles dans le génome peuvent concerner le nombre de copies de gènes (les micro ou mini satellites), ou consister en des insertions/délétions ou plus fréquemment des substitutions de base unique (SNP). Ces dernières représentent environ

90% des variations du génome humain. Ces substitutions peuvent 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 en modifiant la dynamique d'expression du gène en agissant sur la régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Un 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<sub>m</sub>), ainsi que de la protéine.

De nombreuses études ont démontré que le polymorphisme génétique avait un fort impact sur le risque de survenue et l'évolution de nombreuses pathologies mais aussi sur la réponse aux traitements (Glinsky, 2006) Van Ness 2008, Liu 2008). Cependant, dans le contexte particulier de la transplantation d'organe peu de gènes ont été analysés (Kruger 2008) et les études sont réalisées sur des cohortes de patients comprenant un nombre de patients souvent limité et le plus souvent sans cohorte de réplication.

Un SNP a été caractérisé dans l'intron 4 de *PDCDI* (rs 1568821) et appelé PD-1.3 (Prokunina *et al.*, 2002). 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). Ces données associées aux nôtres (Hoffmann *et al.*, 2010) nous permettent d'estimer de façon fiable la fréquence de l'allèle A dans notre pays: environ 12-15%.

Cette substitution de G en A au nucléotide 7809 (numéro GenBank : AF363458) crée un site de restriction pour l'enzyme *PstI* et supprime un site de fixation pour le facteur de transcription Runx1. L'allèle A entraîne ainsi une diminution de l'activité transcriptionnelle de *PDCDI* (Bertsias *et al.*, 2009), mais aussi une diminution de sa fonction inhibitrice dans des LT CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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 plaques (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 le polymorphisme du gène de la protéine PD-1 a été impliqué dans le contrôle de l'infection par le virus de l'hépatite B (HBV) et est associé au risque de survenue de cirrhose B (Zhang *et al.*, 2008a).

## Ménage à trois

A présent associons les différentes données provenant du CMV et de la protéine PD-1 dans le contexte particulier qu'est la transplantation d'organes.

Les patients transplantés sont en immunosuppression, c'est-à-dire que leur système immunitaire est très affaibli pouvant permettre aux infections opportunistes de croître. Certains patients ont été infectés par le CMV antérieurement à la greffe et donc peuvent contenir le virus en latence au sein de leurs cellules. D'autres patients, n'ayant jamais vu le CMV avant la transplantation peuvent recevoir un greffon provenant d'un donneur séropositif pour le CMV et donc qui peut potentiellement contenir des virus CMV en latence, au sein de ses cellules. Comme nous l'avons décrit précédemment, l'inflammation permet au CMV de se réactiver via la voie NFκB, or, la transplantation d'un organe crée localement une forte inflammation. La protéine PD-1 est une molécule de co-inhibition de la réponse immunitaire et dans le cas du CMV murin, le virus utilise cette protéine afin de mieux échapper aux cellules immunitaires et ainsi passer « inaperçu » (Benedict *et al.*, 2008). La mutation présente au sein du gène *PDCDI* diminue la fonctionnalité de la protéine (Bertsias *et al.*, 2009) et par conséquent empêche l'inhibition de la réponse immunitaire.

Il est établi que le CMV est la principale infection suite à une transplantation d'organe, et que cette dernière crée une forte inflammation locale et donc permet au virus de se réactiver. La protéine sauvage PD-1 joue un rôle majeur dans la co-inhibition de la réponse immunitaire et dans l'épuisement clonal (Wherry, 2011), ce qui favorise le cycle viral du CMV pouvant conduire à une maladie d'organe et dans ce contexte particulier au rejet de la greffe. La mutation présente au sein de cette protéine diminue sa fonctionnalité et par conséquent diminue son impact dans la co-inhibition de la réponse immunitaire ainsi que dans l'épuisement clonal. Les patients portant cette mutation voient leur réponse immunitaire moins inhibée, et de ce fait devraient pouvoir mieux contrôler la réplication virale locale du CMV.

# OBJECTIF DE TRAVAIL

Comme il a été décrit précédemment, l'implication du CMV dans l'accélération de la mise en place du rejet chronique chez les patients transplantés reste très controversée, principalement en greffe rénale, et largement incomprise. L'objectif de ce travail de thèse est d'apporter des éléments nouveaux sur l'impact du CMV sur la fonction des greffons à long terme.

Pour atteindre cet objectif, nous nous sommes posé deux questions :

- Le CMV présent dans les greffons participe t'il à l'altération de la fonction des organes greffés à long terme ?
- L'efficacité de la réponse immunitaire de l'hôte joue t'elle un rôle dans la modulation de cet impact ?

Pour tenter d'apporter des éléments de réponse à ces deux questions, nous avons choisi une approche indirecte suivant deux axes.

Le premier axe de recherche est basé sur une étude purement clinique réalisée au sein d'une cohorte de patients transplantés rénaux de Tours avec pour objectif de mesurer les conséquences cliniques liées au fait de recevoir un rein d'un donneur CMV+. Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec le service de Néphrologie et Transplantation du CHU Bretonneau de Tours et principalement avec le Dr. Philippe Gatault.

Le second axe de recherche s'appuie sur l'identification de facteurs en liaison avec la réponse immunitaire de l'hôte favorisant les conséquences observées au sein de la première étude. Le rôle de certains agents immunosuppresseurs et le rôle de facteur génétique à travers une étude gène candidat qui a analysée un polymorphisme présent au sein d'un gène codant pour une protéine impliquée dans la mise en place de l'épuisement clonal de la réponse antivirale chez des patients greffés d'organe solide en fonction du statut sérologique CMV du donneur.



De nouveaux travaux favorisant une meilleure compréhension du rôle du CMV en transplantation d'organe permettraient de définir les conditions nécessaires pour développer une réponse immunitaire anti-CMV efficace et amener à terme à modifier les conditions de distribution des organes en fonction des statuts sérologiques CMV du couple donneur/receveur.

## **PATIENTS ET METHODES**

# Mise en place de l'étude

## Autorisation de la mise en place de l'étude

Cette étude génétique rétrospective établit le polymorphisme de gènes à partir de prélèvements déjà effectués (utilisation secondaire d'échantillons biologiques). De ce fait, le comité de protection des personnes de Tours déclare ne pas à avoir à donner d'avis (Annexe 1).

## Centres de transplantation participant à l'étude

Les patients transplantés rénaux proviennent tous du CHRU Bretonneau de Tours, service de néphrologie dirigé par le professeur Jean-Michel Halimi.

Les patients transplantés pulmonaires proviennent de trois centres différents :

- a. L'hôpital FOCH, service de pneumologie dirigé par le professeur Marc Stern
- b. L'hôpital européen Georges Pompidou (HEGP), service de chirurgie cardiaque dirigé par le professeur Romain Guillemain
- c. Le CHRU de Nantes via l'hôpital Laënnec, service de pneumologie dirigé par le professeur Antoine Magnan.

Les données cliniques des patients ont été recueillies directement au sein de ces services. En ce qui concerne les échantillons biologiques, ils nous ont été confiés par les centres EFS de Nantes et de Tours et par le Laboratoire d'immunologie et d'histocompatibilité de l'hôpital Saint Louis à Paris (pour les patients des hôpitaux de FOCH et de l'HEGP) après réception des consentements éclairés et signés des patients.

## **Population de patients et consentements**

La population de patients transplantés rénaux rassemble les 1281 patients greffés au centre CHRU Bretonneau de Tours entre 1985 et 2008. Les informations nécessaires au premier axe de recherche sont connus pour 1279 d'entre eux et celles nécessaires pour le second axe pour 1120 patients.

La population de patients transplantés pulmonaires rassemble des patients greffés au sein d'un des trois centres précédemment cités entre 1992 et 2009, 82% des patients de cette cohorte ont été transplantés après 2001.

Le formulaire de consentement (Annexe 2) donné au patient est accompagné d'une lettre informative détaillant l'objectif de l'étude, les techniques réalisées utilisant leur ADN et ce que pourrait apporter ces recherches dans la prise en charge des patients transplantés (Annexe 3).

## **Banques d'ADN et bases de données cliniques**

### **Banque d'ADN**

Tous les échantillons d'ADN des patients sont conservés dans un congélateur -20°C au sein du laboratoire EA4245 Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes du CHRU de Tours. Les échantillons de sang sont stockés dans des cryotubes au congélateur -80°C de ce même laboratoire.

### **Items cliniques communs (rénaux et pulmonaires)**

Les données caractéristiques des patients regroupent le numéro EFS, la date de naissance, la date de greffe, l'âge à la greffe, le sexe du patient, la maladie sous-jacente ayant conduit à la transplantation d'organe, le rang de greffe (c'est-à-dire le nombre de transplantation auquel est rendu le patient), la date de perte de vue du patient, les antécédents de cancer, le nombre de grossesses pré-transplantation et enfin l'existence ou non d'une transfusion sanguine avant la greffe.

Les données pré-greffe du receveur contiennent l'indice de masse corporelle (IMC), le groupe sanguin, le rhésus et le typage HLA du patient, la présence d'anticorps anti-HLA de classe I et II en pré- et en post-greffe avec la technique utilisée, la date de positivité, la date du dernier sérum testé, la présence d'antigène HbS et la présence d'anticorps anti-HCV.

Les caractéristiques du donneur donnent des informations quant à la cause du décès, au groupe sanguin, au rhésus, au typage HLA ainsi que la sérologie CMV du donneur de greffon.

Les informations concernant le CMV chez le receveur sont regroupées sous plusieurs items : la sérologie pré-transplantation et dans le cas d'une sérologie négative du receveur, on va surveiller tout le long de la greffe sa sérologie anti-CMV et dans le cas d'une séroconversion on précisera la date ; l'antigénémie et si elle est positive le nombre de noyaux présents (nombre de noyaux de polynucléaires positifs à la présence de la phosphoprotéine virale pp65); la DNAémie (recherche du nombre de copies d'ADN virale dans le sang des patients), les différents traitements préventifs qui ont pu être donnés au patient (gancyclovir, valgancyclovir, acyclovir, rovalcyte, immunoglobulines anti-CMV polyvalentes) ; la(es) date(s) de(s) l'infection(s) au CMV durant toute la durée de la greffe et de même dans le cas de maladies à CMV.

Les données cliniques de greffe concernent les temps d'ischémies froides (associés à chaque organe transplanté), les traitements immunosuppresseurs (ciclosporine, mycophénolate mofétil (MMF), azathioprine, tacrolimus, rapamycine, corticoïdes) et les traitements d'induction (anticorps anti-récepteur à l'Il-2, sérum anti-lymphocytes (SAL)) administrés aux patients durant les premiers jours de la greffe.

## **Items cliniques spécifiques de transplantation rénale**

Les items cliniques spécifiques de la transplantation rénale concernent notamment le type de donneur (si le rein provient d'un donneur vivant ou décédé), l'origine de l'organe greffé (droit ou gauche) et la présence de diabète en pré-transplantation.

Les informations concernant la surveillance post-greffe sont différentes en fonction du type d'organe réalisé. Ainsi, en transplantation rénale, les paramètres cliniques surveillés sont les suivants : la créatinine sérique, la protéinurie et le poids qui sont relevés à 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 et 120 mois.

La reprise de diurèse et de fonction rénale est en règle générale immédiate, cependant des complications, notamment dues aux lésions d'ischémie / reperfusion, peuvent survenir. De ce fait, la date où la créatinine passe sous 250 µM/L est recueillie (indiquant une bonne reprise de la fonction rénale), ainsi que la NGF (Non Graft Function), la SGF (Short Graft Function représentée par une créatinine >250 µM/L à 7 jours post-transplantation), la DGF (Delayed Graft Function traduite par un retour en dialyse avant 7 jours), l'échec de greffe (AFG<7jours), protéinurie, et la clairance.

En ce qui concerne les complications à long terme, la survenue de cancer est très surveillée (cancer de la peau, cancer d'organe solide, lymphome). De même l'apparition du diabète après la greffe (appelé NODAT : nouveaux cas de diabète après la transplantation) est recherchée, le diabète influant sur la survie du greffon rénal.

Enfin, les items cliniques tels le retour en dialyse (notifié par la date et la cause), le rejet aiguë (date) ou encore le décès du patient sont recueillis, en précisant si le greffon rénal était encore fonctionnel au moment du décès ou non.

## **Items cliniques spécifiques de transplantation pulmonaire**

Dans les données caractéristiques des patients spécifiques de la transplantation pulmonaire, le type de greffe permet de différencier les greffes mono- des bi-pulmonaires, les greffes du bloc cœur/poumons ou encore les greffes de transplantation multi-organes, associant la transplantation pulmonaire avec une transplantation rénale ou de foie, le temps passé sur la liste d'attente de transplantation d'organe et la durée d'hospitalisation.

Au sein des données pré-greffe du receveur, les items cliniques spécifiques de transplantation pulmonaire sont les suivants : le dernier volume expiratoire maximum seconde (VEMS) pré-transplantation permettant d'évaluer la capacité respiratoire du patient et donc la mise sous oxygène ou non, la présence d'une gastrotomie ou d'une sonde naso-gastrique (SNG), le dernier examen cytobactériologiques des crachats (ECBC) révélant les bactéries Pyogenes, Staphylococcus, Burkdoferia cepacia et l'information quant à la pan-résistance de la bactérie pyocyanique et la résistance à la méthicilline des staphylocoques.

Les informations concernant la surveillance post-greffe sont différentes en fonction du type d'organe réalisé. Aussi, en transplantation pulmonaire, les paramètres cliniques surveillés vont permettre de déterminer si le(s) poumon(s) retrouve(nt) leur capacité ou si des difficultés se présentent. Les items sont donc les suivants : le nombre de jours passés sous ventilation,

en réanimation, le jour où le greffon est devenu fonctionnel (c'est-à-dire lorsque le patient a pu respirer par lui-même), les résultats de biopsies de greffon du jour 7 et des mois 1, 6, 12 et 24 permettant d'évaluer d'un point de vue histologique la présence ou non d'un rejet, et les VEMS des mois 1, 6 12 et 24 permettant d'évaluer la capacité respiratoire obtenue après la transplantation.

Enfin, les évènements cliniques post-greffe ont été recherchés, rassemblant ainsi les complications post opératoires immédiates : hémorragies, dysfonction aiguë primitive du greffon (DAPG) représentée par un infiltrat radiologique diffus du poumon transplanté, qui ressemble à un œdème pulmonaire associé à une augmentation du gradient alvéocapillaire en oxygène ; la distension aiguë du poumon natif (DAPN) qui aboutit à un déplacement du médiastin vers le greffon et à un aplatissement du diaphragme, anastomoses, sténoses vasculaires ou bronchiques (rétrécissement anatomique vasculaire ou bronchique), rejet aigu pulmonaire (degrés du rejet, date et traitement administré) mais attention le rejet aigu peut apparaître après le premier mois (le tableau clinique et les épreuves fonctionnelles respiratoires ne permettent pas de différencier le rejet aigu des infections, le diagnostic différentiel repose sur l'imagerie et la bronchoscopie avec lavage broncho-alvéolaire et biopsies transbronchiques). Les complications qui peuvent survenir plus tardivement : la paralysie diaphragmatique (étant parfois une complication immédiate), l'épanchement pleural, le rejet chronique (degrés du rejet, date et traitements administrés), infections (virales, bactériennes, fongiques, parasitaires), autres. En dernier lieu arrive les complications à long terme regroupant le syndrome de bronchiolite oblitérante (BOS), les infections aspergillaire, les lymphomes et les cancers d'organe solide.

L'ultime complication est le décès du patient, différents items cliniques ont été nécessaires à la réalisation de cette étude : la date et la cause de survenue du décès, l'âge du patient et si le greffon était encore fonctionnel au moment du décès.

# Méthodes utilisées

## Diagnostic du CMV

De 1984 à 1994, le diagnostic de l'infection à CMV systémique s'appuyait sur la culture du CMV optimisée sur des cellules humaines MRC5 et mis en évidence grâce à une coloration de la plaque par immunofluorescence indirecte, en utilisant un anticorps monoclonal de souris E13 dirigé contre la protéine IE1 72 du CMV. Les noyaux marqués étaient observés après 24 et 48H d'incubation. Etant une technique plus rapide et plus directe que l'évaluation de la virémie à CMV, la recherche de l'antigénémie à CMV (CMV-Ag) a été ajoutée en 1995. Brièvement, après lyses des globules rouges, les leucocytes du patient sont collectés et normalisés à  $10^6$  cellules/ml puis centrifugés sur une « spot slide ». L'immunofluorescence indirecte est ensuite réalisée avec les anticorps monoclonaux murins C10 et C11 dirigés vers la poly-protéine pp65 du CMV. Le nombre de cellules marquées enregistré est rapporté par  $2.10^5$  leucocytes. La surveillance hebdomadaire de l'antigénémie à CMV a été réalisée pendant 4 à 6 mois post-transplantation chez les patients R+ et D+R-.

## Détermination du génotype du SNP PD-1.3

### Extraction d'ADN et PCR

Les échantillons biologiques provenant des centres EFS et du laboratoire HLA pouvaient arriver sous deux formes : soit directement sous forme d'ADN purifié du patient, soit sous la forme d'un tube de sang du patient (notamment pour les patients transplantés rénaux de Tours).

Afin de pouvoir extraire de l'ADN, les tubes de sang ont été traités avec le kit Qiagen (Courtaboeuf, France) QIAamp DNA Blood Midi Kit. Il s'agit d'une extraction sur colonne utilisant dans un premier temps la Qiagen Protease, l'éthanol absolu ainsi que les tampons AL, AW1, AW2 et enfin AE permettant de conserver l'ADN au congélateur  $-20^{\circ}\text{C}$ . La



composition des tampons n'est pas communiquée par le fournisseur. Ce kit permet de traiter 0,3 à 2 mL de sang pour une colonne et extrait un ADN d'une bonne pureté.

Une fois tous les ADN des patients récupérés, ils sont dosés par spectrophotométrie (Aventec) pour les premiers échantillons analysés, puis par nanodrop en mesurant l'absorbance à 260 et 280 nm afin d'évaluer leurs concentrations. L'absence de contamination protéique est vérifiée en mesurant le rapport de l'absorption à 260nm/280nm qui doit être compris entre 1,7 et 2,0. Tous les échantillons ont été conservés à -20°C en attendant d'être utilisés.

## **Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)**

Pour les premiers échantillons d'ADN des patients transplantés rénaux, le polymorphisme PD-1.3 a été déterminé par la technique de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Elle est utilisable lorsque le SNP étudié affecte un site de restriction (création ou suppression) comme c'est le cas pour PD-1.3. La substitution de G en A crée un site de restriction pour l'enzyme *PstI*. De ce fait, pour chaque patient la région contenant le polymorphisme est amplifiée par PCR (Polymerase Chain Reaction) puis digérée par l'enzyme. Une migration des fragments nucléotidiques sur gel d'agarose à 2% pendant 1h30 à 90V et une révélation de 30 à 45 minutes au BET (bromure d'éthidium) permettent de déterminer le génotype en comptant le nombre de bandes obtenues (suite à la coupure ou à l'absence de coupure de l'enzyme *PstI*). Les patients homozygotes sauvages (G/G), c'est-à-dire sans site de restriction, présentent une bande unique de 331 paires de bases. A contrario, les patients homozygotes variant (A/A) présentent deux bandes, l'une à 276 et l'autre à 55 paires de bases. Enfin, les patients hétérozygotes (G/A) présentent les trois bandes à 331, 276 et 55 paires de bases.

L'amplification du gène codant la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) est utilisée comme témoin interne de la digestion. Contenant un site de restriction pour l'enzyme *PstI*, deux bandes sont présentes sur le gel, l'une à 406 et l'autre à 201 paires de bases en cas de complète digestion. Les détails du protocole sont indiqués dans les différents articles de Thomas W. Hoffmann (Hoffmann et. al, 2009 et Hoffmann et. al, 2008).

## Oligonucleotide Ligation Assay (OLA)

Pour la deuxième partie des patients transplantés rénaux ainsi que pour l'ensemble des patients transplantés pulmonaires, le génotype du SNP PD-1.3 a été établi suivant la technique OLA (Oligonucleotide Ligation Assay) décrite par Iannone (Iannone *et al.*, 2000) et mise en place au laboratoire par le Dr Thomas W. Hoffmann.

Le principe de cette technique est l'association entre une ligation et de la cytométrie en flux (Figure IX). Le test de ligation, ou OLA (pour « Oligonucleotide Ligation Assay »), utilise une sonde-piège ainsi qu'une sonde reportrice. La première sonde contient une séquence nucléotidique en partie complémentaire de l'ADN du patient, avec le dernier nucléotide testant l'un des deux allèles du polymorphisme étudié ; et en partie non complémentaire, cette région étant appelée ZipCode. La seconde sonde est 100% complémentaire de l'ADN du patient, elle 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 deux allèles du polymorphisme sont testés dans des tubes séparés avec deux 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, appelé 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 deux 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 deux tubes.

Les séquences des sondes ainsi que des amorces utilisées dans la PCR pour le SNP PD-1.3 ont été créées via le logiciel Vector NTI (version 6) et sont présentées ci-dessous :

Amorces PCR sens : 5'-CCAGGCAGCAACCTCAATC-3'

Amorces PCR anti-sens : 5'-GTCCCCCTCTGAAATGTCC-3'

Sonde piège « G »: 5'- **CGGTCGACGAGCTGCCGCGCAAGATGCACCCCCGAGACC**-3'

Sonde piège « A »: 5'- **CGGTCGACGAGCTGCCGCGCAAGATGCACCCCCGAGACT**-3'

Sonde rapportrice : 5'-GCAGGTGGGCTG-3'

ZipCode : région de la sonde piège mis en caractère gras

cZipCode : 5'- CAGGCCAAGTAACTTCTTCGATCTTGCGCGGCAGCTCGTCGACCG-3'

En amont de la technique OLA, il est nécessaire de coupler les billes aux oligonucléotides contenant le cZipCode. Dans 62 µL de MES (acide 2-[N-morpholino] éthanesulfonique) à 0,1 M, 2,5 millions de billes fluorescentes carboxylées (Luminex®) sont mises en contact avec 5 nmol d'oligonucléotides 5'-aminés. S'ajoute au mélange 10 µL d'EDC (1-éthyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride) à 30 mg/mL (préparé extemporanément). 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). Pour finir les billes sont reprises dans 200 µL de tampon TE pour un stockage à 4°C dans l'obscurité. Le SNP PD-1.3 est étudié avec la bille 77 et le couple ZipCode/cZipCode 3.

Pour chaque patient, la région contenant le SNP PD-1.3 est dans un premier temps amplifiée par PCR dans le même tube. Puis, dans le test de ligation, les deux allèles de chaque polymorphisme sont testés pour chaque patient dans deux tubes séparés avec les deux sondes-pièges différentes : un tube pour l'allèle sauvage G et un autre pour l'allèle variant A. 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. Le produit de ligation est mis en contact avec 12.500 billes couplées et incubé pendant 2 min à 96°C puis 2h30 à 45°C pour l'hybridation, cette étape utilisant le couple ZipCode/cZipCode. Enfin, nous observons l'association de la fluorescence des billes avec celle des sondes reportrices sur un cytomètre en flux.

## Analyse statistique

Une fois les génotypes des patients établis, différents tests statistiques ont été mis en place. Dans un premier temps, il a fallu vérifier que le sous-groupe de patients homozygotes sauvages G/G présentait une homogénéité avec le sous-groupe de patients possédant au moins un allèle mutant (G/A et A/A) par rapport aux données descriptives cliniques des patients. Pour cela, les tests Khi2 et Mann and Whitney ont été appliqués avec un risque relatif  $\alpha$  de 0,5%. Lorsque le test présente un  $p < 0,05$  il est alors considéré comme statistiquement significatif.

Afin de mettre en évidence une association entre un polymorphisme et un événement clinique post-transplantation, un test de survie Kaplan-Meier est appliqué avec un risque relatif  $\alpha$  de 0,5%. Lorsque le test présente un  $p < 0,05$  il est alors considéré comme statistiquement significatif.

# Recherche de l'éventuel effet biologique du SNP PD-1.3

## Appariement des patients transplantés rénaux de Tours

Pour cette étude rétrospective nous avons pris en compte tous les patients transplantés rénaux au CHRU de Tours de 1985 à 2008. Parmi cette cohorte nous avons identifié les patients qui répondaient aux critères d'inclusion suivants :

- Patient vivant, suivis dans le service, greffon fonctionnel.
- Patient avec génotypage connu du SNP PD-1.3 du gène *PDCDI*.

Tous les patients répondant aux critères d'inclusion et homozygote pour l'allèle variant A (n=9) du SNP PD-1.3 du gène *PDCDI* ont été sélectionnés. Pour l'ensemble de ces patients, un ou plusieurs patients de génotype GG ont été appariés afin de réaliser des couples d'études comparables. Grâce à la base de données cliniques des patients transplantés rénaux de Tours, les critères d'appariement ont été les suivants : la sérologie CMV du receveur avant la transplantation, la sérologie CMV du donneur, traitement immunosuppresseur, l'âge, l'année de transplantation et la durée de suivi post-greffe.

## Etude par technique ELISpot

La technique ELISpot (enzyme-linked immunospot) est une méthode immunoenzymatique permettant l'exploration de l'activité des lymphocytes T CD8+. Elle permettra l'évaluation de la fonction de sécrétion de cytokines après activation spécifique des effecteurs par l'antigène viral. Son principe se fonde sur la détection des cellules produisant une cytokine. Les cellules sont déposées sur la membrane au fond des puits puis mises en contact d'un activateur. La cytokine sécrétée par la cellule activée est immédiatement piégée par un anticorps de capture situé sous la cellule et qui recouvre la membrane de la plaque à forte concentration. Une fois les cellules retirées, la présence de la cytokine est révélée par un deuxième anticorps couplé à une enzyme dont l'action provoquera l'apparition d'un produit

coloré. Ainsi, chaque spot représente l’empreinte d’une cellule productrice de la cytokine étudiée.

## **Isolement des PBMC des patients**

Les prélèvements sanguins ont été recueillis en hôpital de jour lors des consultations programmées pour chaque patient sélectionné pour l’étude. Le recueil des prélèvements s’est effectué sur 6 mois (de décembre 2011 à mai 2012). Un volume de 10 mL de sang sur tube sec hépariné était recueilli pour chaque donneur et traité dans la matinée.

L’isolement des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) à partir de sang de patients transplantés est une technique adaptée à celle dite de « l’anneau » couramment utilisée au laboratoire. Dans un premier temps le sang est dilué de moitié dans du RPMI (1640, sans glutamine, GIBCO) puis coulé délicatement sur un volume égal de Ficoll (milieu de séparation des lymphocytes). La centrifugation va permettre aux différents composants du sang de se séparer en fonction de leur gradient de densité. Les globules rouges tombent au fond du tube, séparé de l’anneau de PBMC par le ficoll. Cet anneau de cellules est récupéré délicatement par aspiration puis lavé avec du RPMI deux fois de suite. A la dernière centrifugation, le surnageant est jeté et le culot est repris dans du RPMI 5% (c'est-à-dire contenant 5% de sérum de veau fœtal dit SVF, 50UI/ml de Pénicilline, 50µg/ml de Streptomycine ICN et 2mM de L-glutamine Bio Whittaker Vervier Belgique). Les cellules sont ensuite comptées au bleu trypan via une cellule de Mallassez.

Une fois les cellules comptées, elles sont soit directement mises en culture, soit préparées pour une mise en congélation à -80°C. La congélation des cellules doit se faire rapidement et le stockage à -80°C ne permet pas de garder les cellules viables plus de quelques mois. Pour cela les cellules sont reculottées suite au comptage puis à nouveau suspendue dans 900µl de SVF (pas plus de 2 millions de cellules par culot de 1ml congelé). Est ajouté au mélange 100µl de DMSO (Diméthylsulfoxyde) avant de placer très rapidement le tube au congélateur.

## Mise en culture des cellules

A partir des cellules du  $-80^{\circ}\text{C}$ , l'étape de décongélation doit être rapide. Le cryotube contenant le glaçon de cellule est légèrement placé au bain marie à  $37^{\circ}\text{C}$ . Une fois que le glaçon se détache des bords du tube, il est aspiré et placé dans vingt fois son volume en milieu complet puis centrifugé 5 minutes à 1600 rpm. Le surnageant est jeté et le culot suspendu dans 1 ml de milieu complet, complété par la suite jusqu'à 20 ml. Cette étape de lavage est renouvelée deux fois. A la seconde, le culot est resuspendu dans 1 ml de milieu complet puis les cellules sont comptées via la cellule de Mallassez.

A partir des cellules fraîches directement obtenues à la suite du Ficoll, il suffit de les compter via la cellule de Malassez avant la mise en culture.

Une fois les cellules comptées, elles sont mises en puits dans du milieu complet (c'est-à-dire du RPMI contenant 10% de sérum de veau fœtal dit SVF, 50UI/ml de Pénicilline, 50 $\mu\text{g/ml}$  de Stréptomycine ICN et 2mM de L-glutamine (Bio Whittaker Vervier Belgique) sur la nuit (plaque de culture dépendante du nombre de cellules totales comptées préalablement). Ce temps permettra aux cellules affectées par la congélation / décongélation, de mourir. Le lendemain matin, les cellules sont reprises et à nouveau comptées afin de placer le plus précisément  $1,5 \cdot 10^5$  cellules par puits de la plaque ELISpot.

## ELISpot<sup>PLUS</sup> for Human Interferon- $\gamma$

Le kit « Human IFN $\gamma$  ELISpot<sup>PRO</sup>® » du laboratoire MABTECH a été utilisé. Chaque plaque possède 96 puits. La membrane au fond des puits étant recouverte avec l'anticorps de capture fixant l'IFN $\gamma$ , une étape initiale de blocage avec le milieu de culture utilisé est nécessaire : milieu complet composé de RPMI, glutamine, Streptomycine et sérum de veau fœtal.

Après blocage, nous avons déposé  $1,5 \cdot 10^5$  PBMC dans chaque puits. Ces cellules ont été cultivées et stimulées selon quatre conditions pendant 24 heures à l'étuve (étape 1). Les cellules ont été stimulées par un anticorps monoclonale anti-CD3 comme contrôle positif. Le contrôle négatif sans ajout d'agent stimulant a permis d'apprécier le bruit de fond de la technique et la spécificité de la réponse antigénique. Les peptides d'intérêt étaient les

Peptivator CMV pp65 et ppIE1 human® du laboratoire MILTENYI. Les cellules reconnaissant l'antigène qui vont sécréter de l'IFN $\gamma$  qui sera piégé localement.

Après une période de culture de 24 heures en étuve à 37°C, les cellules sont retirées des puits de culture. Un deuxième anticorps, dit de révélation, reconnaissant un épitope distinct de celui de l'anticorps de capture, est ajouté. L'anticorps monoclonal de détection est couplé à la biotine et est conjugué à la phosphatase alcaline elle-même couplée à la streptavidine qui a une forte affinité pour la biotine (étape d'amplification du signal). Après une période d'incubation de deux heures, le substrat de l'enzyme est ajouté. Transformé par l'enzyme, il se colore et révèle les zones de production d'IFN $\gamma$ . Les points qui apparaissent correspondent chacun à un lymphocyte sécréteur.

La dernière étape consiste en la lecture de la plaque. Celle-ci est faite par le lecteur CTL S5 UV et le logiciel ImmunoSpot®. Après évaluation automatique du nombre de spots par puits, un contrôle qualité manuel est nécessaire. Il permet de clarifier les zones d'ombre rencontrées lors de la lecture initiale. C'est lors de cette étape que l'on valide les résultats. La limite de lecture est de 600 spots par puits pour l'IFN $\gamma$ , au delà la technique perd en spécificité. La technique a été réalisée en duplicate pour chaque condition.

La technique a été mise au point via des cellules de donneurs sains séropositifs ou non au CMV. Ces tests ont permis de mettre en évidence la spécificité de la stimulation via les peptides pp65 et PPIE1 ainsi que la spécificité de la technique. Le protocole de l'ELISpot est présenté en annexe 4.

## **Recherche d'IFN $\gamma$ par ELISA sur les surnageants**

Afin de vérifier si l'ensemble de l'IFN $\gamma$  produit par les cellules est bien capturé par les anticorps de la plaque ELISpot, à la fin de la technique, les surnageants ont été dosés par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) utilisant le kit pour l'IFN $\gamma$  eBiosciences, Montrouge, France.

Les plaques ELISA, 96 puits, sont coatées avec l'anticorps de capture anti-IFN $\gamma$  sur toute une nuit à 4°C. Au matin, après avoir soigneusement lavé les plaques, la solution servant à la dilution des échantillons est ajoutée dans chaque puits afin de bloquer les sites non spécifiques. Une fois l'heure passée à température ambiante, les plaques sont à nouveau lavées et prêtes à accueillir les échantillons (surnageants provenant de la plaque ELISpot)



ainsi que la gamme étalon de l'IFN $\gamma$ . Les plaques sont ensuite incubées durant deux heures à température ambiante. Passé ce délai, les plaques sont lavées puis l'anticorps de détection anti-IFN $\gamma$ , spécifique d'un autre épitope que l'anticorps de capture, est ajouté dans chaque puits. Après une heure d'incubation à température ambiante, les plaques ELISA sont à nouveau lavées et afin d'amplifier le signal, de l'avidin-HRP (HorseRadish Peroxydase) est placée dans chaque puits durant 30 minutes à température ambiante. Suite à une dernière série de lavage, le substrat est placé dans chaque puits, l'enzyme HRP va le dégrader produisant ainsi une couleur qui sera mesurable. La réaction est arrêtée grâce à l'ajout de la solution STOP (acide sulfurique 2N).

Les plaques sont enfin lues au lecteur ELISA à 450 nm de longueur d'onde.

# RESULTATS

## Caractéristiques des patients greffés à Tours depuis 1985

Entre 1985 et 2008, 1281 transplantations rénales ont été réalisées au CHRU de Tours. Les principales caractéristiques cliniques de ces patients sont présentées dans la table III. L'étroite collaboration entre notre équipe Cellules Dendritiques, Immuno-intervention et Greffe et le service de Néphrologie du CHRU Bretonneau de Tours nous a permis d'accéder à un nombre considérable d'informations cliniques sur les patients greffés qui sont répertoriées dans une base de données tenue à jour depuis l'ouverture du centre en 1985.

Données cliniques <sup>a</sup>	Tous patients N=1281
Age moyen donneur ± ET (années)	43±17
Donneur vivant (%)	19(1.5)
Age moyen receveur ± ET (années)	46±15
Sexe receveur (%homme)	788(61.5)
<b>Maladie rénale initiale</b>	
Diabètes (%)	64(5)
Glomérulonéphrites (%)	136(11)
Polykystose rénale (%)	218(17)
Néphropathie IgA (%)	132(10)
Autres (%)	728(57)
<b>Caractéristiques de la greffe</b>	
Rang de greffe >1 (%)	162(13)
Temps d'IF moyen ± ET (heure)	20±7
Moyenne de MM HLA AB ± ET	2.7±1
Moyenne de MM HLA DR ± ET	1.3±0.7
Immunsation anti-HLA (%)*	253(22)
<b>Devenir du greffon</b>	
Retard de fonction du greffon (%)	285(22)
Rejet aigu (%)	424(33)
Dialyse (%)	246(19)
<b>Traitements IS durant les 3 premiers mois</b>	
Immunoglobulines anti-lymphocytaires (%)	837(66)
Anticorps anti-récepteur à l'IL-2 (%)	370(29)
Ciclosporine (%)	898(70)
Tacrolimus (%)	308(24)
Mycophenolate mofetil (%)	817(64)
Azathioprine (%)	429(34)

**Tableau III : Caractéristiques cliniques des patients ayant reçu une greffe rénale à Tours entre 1985 et 2008 inclus.** Les données cliniques sont présentées en pourcentage ou en moyenne ± l'écart type. IF : ischémie froide ; MM : mésappariement ; HLA : Human Leukocyte Antigen; IS : immunosuppresseurs. \*Données de détection d'anticorps anti-HLA disponible pour 1164 patients.

Sur les 1281 greffes réalisées à Tours entre 1985 et 2008 inclus, toutes les données de notre étude sont connues pour 1279 patients. L'âge du receveur, du donneur, le mésappariement HLA entre le receveur et le donneur, la sérologie CMV et d'autres items cliniques sont rapportés dans la table III. Au moment de la greffe, 1219 patients étaient adultes et 62 mineurs ; 62% de la population totale était de sexe masculin. Parmi eux, 1118 (86%) ont bénéficié pour la première fois d'une greffe. L'âge des receveurs et des donneurs sont en moyenne de  $45.6 \pm 15.3$  et  $43.2 \pm 15.3$  ans respectivement. A 3 mois post-greffe, la moyenne de clairance de la créatinine estimée (eGFR) était de  $54.3 \pm 19 \text{ ml/min/1.73m}^2$ . Un rejet aigue vérifié par biopsie (BPAR) est survenu chez 28,3% de la population étudiée au cours de la première année et 5% après 1 an. Sur l'ensemble des patients, un rejet aigue est donc survenu chez 33% des patients. Sur la période de suivi clinique (entre 1985 et aout 2009), 22% des patients transplantés ont développé une insuffisance rénale terminale (table IV) et 11% sont décédés. La survie moyenne des greffons mort-censurée est de 78,9 mois soit 6, 5 ans.

Parmi les patients de l'étude, 644 receveurs (50%) présentaient une sérologie positive pour le CMV avant la greffe et 561 reins (44%) provenaient de donneurs séropositifs pour le CMV (pour simplifier, nous emploierons la terminologie « D+ et rein D+ » pour désigner un donneur séropositif pour le CMV et un rein provenant d'un D+ respectivement dans la suite du document).

## **Mise en évidence des impacts d'une infection à CMV du donneur sur le devenir clinique des receveurs**

Actuellement, malgré de nombreuses études, les impacts du CMV sur la fonction rénale à long terme n'est pas clairement défini. La mise en évidence du CMV dans la genèse des dysfonctions chroniques des greffons est une tâche extrêmement difficile pour des raisons propres à la biologie du virus : épisodes de réplifications locales très transitoires *non homogène au sein des organe* et grandes difficultés pour obtenir des échantillons de greffons séquentiels, intrication avec la réponse inflammatoire locale (cause et conséquence à la fois de la répllication virale), absence de marqueur systémique établi qui corrélait avec la répllication virale locale, difficultés d'évaluer séquentiellement la réponse immunitaire systémique anti-CMV sur des grandes cohortes. D'autre part de nombreux facteurs confondants potentiels existent comme par exemple l'augmentation de l'incidence de l'infection latente à CMV avec l'âge. L'ensemble de ces aspects font qu'il est très difficile de mettre en évidence de façon directe et définitive l'impact de l'infection par le CMV au sein du greffon sur la survie des organes transplantés.

Dans le cadre de notre travail de thèse, nous avons activement participé à une étude clinique dirigée par le Dr Baron et menée en collaboration avec l'ensemble du service clinique de greffe à Tours et tout spécialement le Dr P Gatault. L'objectif de ce travail a été de déterminer l'impact de l'infection à CMV du donneur sur la survie du greffon rénal et d'identifier certains facteurs de la réponse immunitaire de l'hôte qui pourraient moduler ce risque.

D'octobre 1985 à décembre 2008, 1281 greffes rénales consécutives ont été réalisées à Tours et parmi elles, 1279 patients possédaient les données nécessaires à l'étude. D'une part des caractéristiques cliniques des donneurs, receveurs, de la greffe ; et d'autre par la numération des cellules CD8+ à J0 de la transplantation et à l'anniversaire des 2 ans. Les caractéristiques cliniques des patients ont été comparées en fonction des sérologies CMV des donneurs et receveurs. Sans surprise, il est apparu que le groupe D-R- était significativement plus jeune que les autres groupes et qu'il a reçu des greffons provenant de donneurs plus jeunes que les autres groupes (Table IV). Il y avait une fraction plus importante de première greffe parmi les D-R- (91%) comparé aux autres groupes ( $p=0,04$ ). De façon logique, le

Prograf a été un peu moins souvent administré chez les patients D-R- que chez les autres patients du fait que ce produit était donné préférentiellement aux patients qui recevaient une seconde ou une troisième greffe.

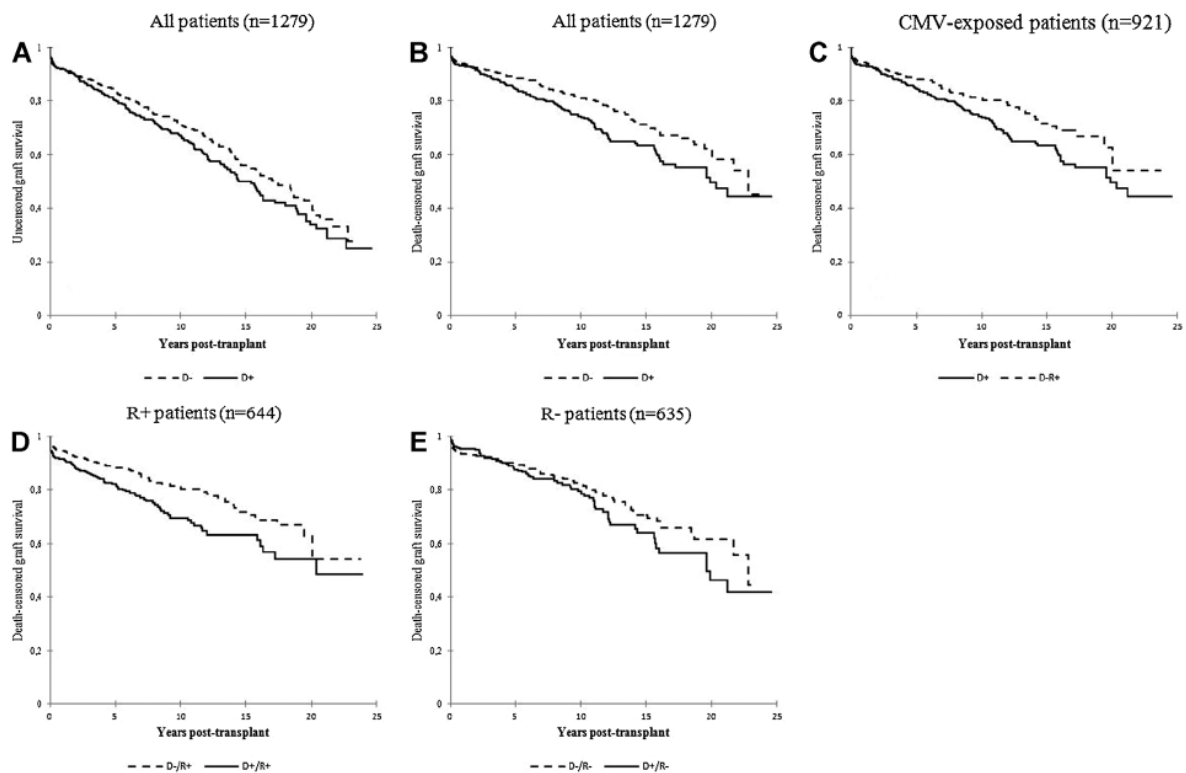
	Tous patients n=1279	D+R- n=277	D+R+ n=284	D-R+ n=360	D-R- n=358
<b>Caractéristiques du donneur</b>					
Age moyen ± ET (années)	43.2±15.3	43.6±17.6 <sup>†</sup>	46.4±16.8	43.9±15.5	39.7±17.5 <sup>§</sup>
Donneur vivant (%)	1.5	1.4	0.7	0.8	2.8
Sexe donneur (%homme)	63.5	61.4	61.7	61.9	67.3
<b>Caractéristiques du receveur</b>					
Age moyen ± ET (années)	45.6±15.3	44.5±15.9*	48.7±13.7	47.6±13.8	42.1±16.4 <sup>†</sup>
Sexe receveur (%homme)	61.5	64.3 <sup>†</sup>	55.3	57.5	68.4 <sup>†</sup>
Diabète mellitus (%)	9.0	6.0 <sup>†</sup>	12.0	12.5	7.9
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	24.1±4.3	23.8±4.1	23.6±4.2	24.0±4.4	24.2±4.4
<b>Caractéristiques du greffon</b>					
Rang de greffe (%)	86.1	88.4	85.6	84.4	90.7
Moyenne de MM HLA AB ± ET	2.7±1.0	2.6±1.1	2.8±1.0	2.8±1.0	2.7±0.9
Moyenne de MM HLA DR ± ET	1.3±0.7	1.3±0.6	1.3±0.7	1.2±0.7	1.2±0.7
DGF (%)	20.7	19.5	21.0	21.0	20.0
BPAR durant la première année (%)	28.3	28.2	25.4	29.2	30.2
Temps d'IF moyen ± ET (heures)	20.8±8.3	21.5±9.2	21.0±8.2	20.6±7.7	20.4±8.1
<b>Traitement immunosuppresseur initial</b>					
Immunoglobulines anti-lymphocytaires (%)	65.1	63.2	66.9	66.1	64.5
Anticorps anti-récepteur à l'IL-2 (%)	29.1	31.0	28.2	27.8	29.6
Cyclosporine (%)	70.0	69.0	64.8	68.9	76.8 <sup>§</sup>
Tacrolimus (%)	24.2	25.6	27.1	26.4	18.4 <sup>§</sup>
Mycophénolate mofétil (%)	65.9	65.0	69.7	69.2	60.3 <sup>†</sup>
Azathioprine (%)	33.4	33.2	29.2	30.8	39.4 <sup>†</sup>
Sirolimus (%)	2.3	1.8	3.5	1.7	2.5
<b>Variables cliniques et biochimiques à 3 mois</b>					
Pression artérielle systolique (mmHg)	138±17	137±17	139±17	139±17	137±17
Pression artérielle diastolique (mmHg)	80±11	80±11	80±10	81±10	80±11
Niveau de créatinine sérique (µmol/L)	132±48	134±51	137±55	130±40	129±47
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	54.3±19.0	54.7±20.9	51.0±17.6	53.0±15.9	57.7±20.6
Protéinurie (g/jour)	0.32±0.83	0.33±0.90	0.33±0.92	0.31±0.56	0.33±0.92

**Tableau IV : Caractéristiques cliniques des patients greffés rénaux en fonction du statut sérologique CMV du donneur et du receveur.** IMC : indice de masse corporelle ; IF : ischémie froide ; MM : mésappariement ; HLA : Human Leukocyte Antigen ; DGF : Delayed Graft Dysfunction ; BPAR: rejet aigu vérifié par biopsie ; eGFR:estimated creatinine clearance. Les données de détection d'anticorps anti-HLA étaient disponibles pour 1164 patients. D+/R+ : Donneur/Receveur séropositif au CMV ; D-/R- : Donneur/Receveur séronégatif au CMV. \*p<0.05 lorsque les données sont comparées entre les groupe D+R- et D-R+, <sup>†</sup>p<0,05 lorsque les données sont comparées entre les groupes D+R- et D+R+, <sup>§</sup>p<0,05 lorsque les données sont comparées entre tous les groupes et <sup>¶</sup>p<0,05 pour les données comparées avec les groupes D+R+ et D-R+. Les résultats sont exprimés en pourcentage ou moyenne ± l'écart type (ET) pour les variables distribuées normalement ou encore médiane et étendue pour les autres. Les données qualitatives ont été comparées à l'aide du test Khi2. Les données quantitatives entre deux groupes ont été comparées par le test Mann-Whitney, et lorsque plus de deux groupes devaient être analysés, nous avons utilisé une ANOVA (suivie d'une comparaison par paires en utilisant le test de Fisher PSLD).

## **L'infection à CMV chez le donneur est un facteur de risque de survenue de l'insuffisance rénale terminale, en particulier chez les patients R+**

La figure VIII indique qu'en analyse univariée par la méthode de Kaplan-Meier, la séropositivité du donneur est associée à un risque plus important de perte du greffon (mort non censurée,  $p=0.053$ ), avec une demi-vie de 14,5 et 17,0 ans pour les groupes D+ et D- respectivement (Figure VIII, A). Par contre, la survie des patients ne diffèrent pas entre les deux groupes ( $p=0.558$ ). La survie des greffons (mort-censurée) est très significativement plus faible lorsque les reins proviennent de donneurs D+ (figure VIII, B,  $p=0,005$ ). Ceci indique que le polymorphisme n'est pas associé à la mortalité des patients mais bien à la survenue de l'insuffisance rénale terminale. Ce résultat est toujours présent lorsque seuls les patients exposés au CMV sont analysés, c'est-à-dire en excluant les patients D-R- (figure VIII C  $p=0.023$ ).

Il est démontré que le répertoire des cellules immunitaires capable de reconnaître le CMV est très différent selon que le receveur est naïf pour le CMV (receveur séronégatif) ou infecté (receveur séropositif) au moment de la greffe. Nous avons donc analysé séparément les R+ et les R- pour estimer le risque de perte du greffon associé à une sérologie CMV positive du donneur. Ce risque est très significativement augmenté chez les R+ (figure VIII, D,  $p=0.008$ ) alors qu'il est non significatif chez les receveurs séronégatifs au CMV (figure VIII, E,  $p=0.21$ ).



**Figure VIII : Les reins provenant de donneurs séropositifs au CMV (D+) ont une survie plus faible chez les receveurs infectés par ce virus (R+).** Estimation de la survie par la méthode de Kaplan-Meier lorsque la mort avec greffon fonctionnel n'est pas censurée (A) et lorsqu'elle est censurée (B) chez 1279 patients transplantés consécutifs, entre 1985 et 2008 ( $p=0,053$  et  $p=0,005$  respectivement). (C) Estimation de la survie en mort-censurée chez 921 patients exposés au CMV, c'est-à-dire D-R- exclu ( $p=0,023$ ). Les deux graphes inférieurs correspondent à l'estimation de la survie en mort-censuré chez 644 receveurs séropositifs R+ (D,  $p=0,008$ ) et 635 receveurs séronégatifs R- pour le CMV (E,  $p=0,210$ ).

Il est intéressant de noter qu'à 1 et 2 ans post-greffe, les patients recevant un rein D+ ont un débit de filtration glomérulaire (eGFR) significativement plus faible que les patients recevant un rein D- ( $57.7 \pm 19.6$  vs  $62.5 \pm 19.2$  ml/mn et  $55.8 \pm 19.9$  vs  $60.8 \pm 19.1$  ml/mn respectivement,  $p < 0,0001$ ).

Nous avons ensuite identifié des variables associées au risque de perte du greffon en analyse univariée, liées aux traitements administrés ou aux variables cliniques propres des patients. Au niveau des immunosuppresseurs, l'utilisation des globulines anti-lymphocytaires (1,536 [1,129-2,092],  $p=0,006$ ), de mycophénolate mofétil (0,737 [de 0,566-0,957],  $p=0,022$ ) et de la cyclosporine (0,530 [0,404-0,694],  $p < 0,001$ ) est associée (positivement ou négativement) au risque de perte du greffon. De plus, le taux sérique de créatinine à 3 mois (HR 1,010 [IC 95% 1,008-1,012],  $p < 0,0001$ ), la protéinurie à 3 mois (HR en g/jour 1,267 [1,184-1,357],  $p < 0,0001$ ), la pression systolique artérielle à 3 mois (HR par 10 mmHg 1,011 [1,004-1,019],  $p=0,004$ ), le rejet aigu (HR 2,660 [2,062-3,437],  $p < 0,0001$ ) et la date de



transplantation (HR par an 0,964 [0,944-0,984], p=0,0005) sont les variables cliniques influençant significativement le devenir du greffon. En analyse multi-variée, après ajustement sur les variables citées précédemment et sur l'âge du donneur, le risque plus important de perte du greffon pour le groupe D+ reste significatif (table V). Pour 921 patients exposés au CMV (après exclusion des patients D-R-), recevoir un rein provenant d'un donneur séropositif au CMV reste un facteur de risque indépendant de perte du greffon (table V). De plus, chez les receveurs R+, le risque relatif était proche de 1,5 après ajustement pour les variables précitées (table V). Par conséquent, l'infection à CMV chez le donneur est un facteur de risque indépendant de la perte du greffon, en particulier chez les receveurs de greffe séropositif au CMV avant la transplantation (R+).

	Analyses uni-variées			Analyses multi-variées			
	HR	IC 95%	p	HR	IC 95%	p	
<b>Tous patients (n=1279)</b>	<b>1.393</b>	<b>1.104–1.759</b>	<b>0.005</b>	<b>Modèle 1</b>	<b>1.366</b>	<b>1.039–1.796</b>	<b>0.026</b>
				<b>Modèle 2</b>	<b>1.326</b>	<b>1.007–1.744</b>	<b>0.044</b>
				<b>Modèle 3</b>	<b>1.330</b>	<b>1.010–1.751</b>	<b>0.042</b>
<b>Patients D-R- exclus (n=921)</b>	<b>1.391</b>	<b>1.044–1.855</b>	<b>0.024</b>	<b>Modèle 1</b>	<b>1.442</b>	<b>1.025–2.029</b>	<b>0.036</b>
				<b>Modèle 2</b>	<b>1.423</b>	<b>1.011–2.004</b>	<b>0.043</b>
				<b>Modèle 3</b>	<b>1.417</b>	<b>1.007–1.995</b>	<b>0.046</b>
<b>Patients R+ (n=644)</b>	<b>1.550</b>	<b>1.121–2.144</b>	<b>0.008</b>	<b>Modèle 1</b>	<b>1.512</b>	<b>1.021–2.239</b>	<b>0.039</b>
				<b>Modèle 2</b>	<b>1.471</b>	<b>0.993–2.179</b>	<b>0.054</b>
				<b>Modèle 3</b>	<b>1.458</b>	<b>0.984–2.161</b>	<b>0.060</b>

**Tableau V : recevoir un greffon rénal d'un donneur séropositif au CMV est un facteur de risque indépendant de perte du greffon (mort-censurée).** HR: Hazard Ratio; IC 95%: intervalle de confiance à 95%; D+: donneur séropositif au CMV; R+: receveur séropositif au CMV.

Modèle 1: ajustement sur la créatinine, la protéinurie, la pression artérielle systolique à 3 mois, le rejet aigu au cours de la première année confirmé par biopsie (BPAR) et la date de la transplantation.

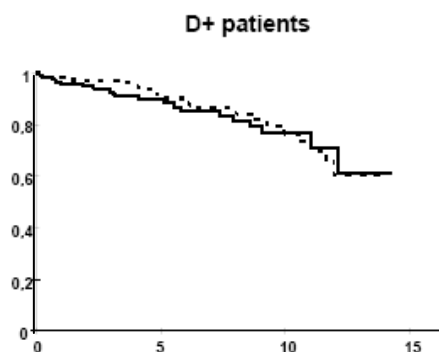
Modèle 2: Modèle 1 + ajustement sur le mycophénolate mofétil, la ciclosporine, l'utilisation des globulines anti-lymphocyte.

Modèle 3: Modèle 2 + ajustement sur l'âge du donneur.

## **Les greffons D+ augmentent le risque d'antigénémie-CMV chez les receveurs R+, cependant, le risque accru de perte de greffon des reins D+ est indépendant de cette virémie**

Nous avons analysé si l'infection à CMV chez les donneurs conférait un risque accru de réplication virale systémique (survenue d'antigénémie) chez les receveurs R+ (n=429) et si la survenue d'antigénémie augmentait le risque de perte de greffon chez les patients D+. Nos

résultats indiquent que recevoir un rein d'un donneur CMV-séropositif augmente de façon significative le risque d'antigénémie-CMV durant la première année chez le receveur R+ (D+R+ 68.5% vs D-R+ 49.6%,  $p < 0,0001$ ). Cependant, l'analyse univariée (figure IX) ainsi que multi-variée a révélé que l'antigénémie n'était pas un facteur de risque de perte de greffon chez les patients D+ ( $n=395$ : HR 1.27 [0.92-1.74],  $p=0.146$ )



**Figure IX : La survenue d'une antigénémie-CMV en post-transplantation n'influe pas sur la survie des greffons en mort-censurée chez les D+.** Analyse Kaplan-Meier de 395 patients ayant reçu des greffons provenant de donneur séropositif au CMV,  $p=0$ . Les lignes continues représentent les patients n'ayant pas fait d'antigénémie et les lignes pointillées les patients pour lesquels une antigénémie est survenue.

Nous avons ensuite évalué le risque de perte de greffon D+ chez les patients qui n'ont pas développé d'antigénémie. Le tableau VI en analyse multivariée montre qu'en l'absence de toute antigénémie-CMV durant la première année, les patients exposés au CMV qui ont reçu un rein D+ ont un risque relatif de perte de greffon très élevé (HR= 3,7-3,9).

Patients CMV Ag-	Analyses uni-variées			Analyses multi-variées			
	HR	IC 95%	p	HR	IC 95%	p	
Tous patients (n=547)	1.924	1.174–3.154	0.009	Modèle 1	2.452	1.424–4.221	0.001
				Modèle 2	2.337	1.354–4.036	0.002
				Modèle 3	2.321	1.344–4.008	0.003
Patients D-R- exclus (n=321)	2.239	1.138–4.468	0.020	Modèle 1	3.921	1.713–8.978	0.001
				Modèle 2	3.774	1.616–8.817	0.002
				Modèle 3	3.749	1.611–8.722	0.002
Patients R+ (n=216)	2.487	1.164–5.314	0.019	Modèle 1	3.349	1.377–8.148	0.008
				Modèle 2	3.243	1.322–7.959	0.010
				Modèle 3	3.319	1.349–8.164	0.009

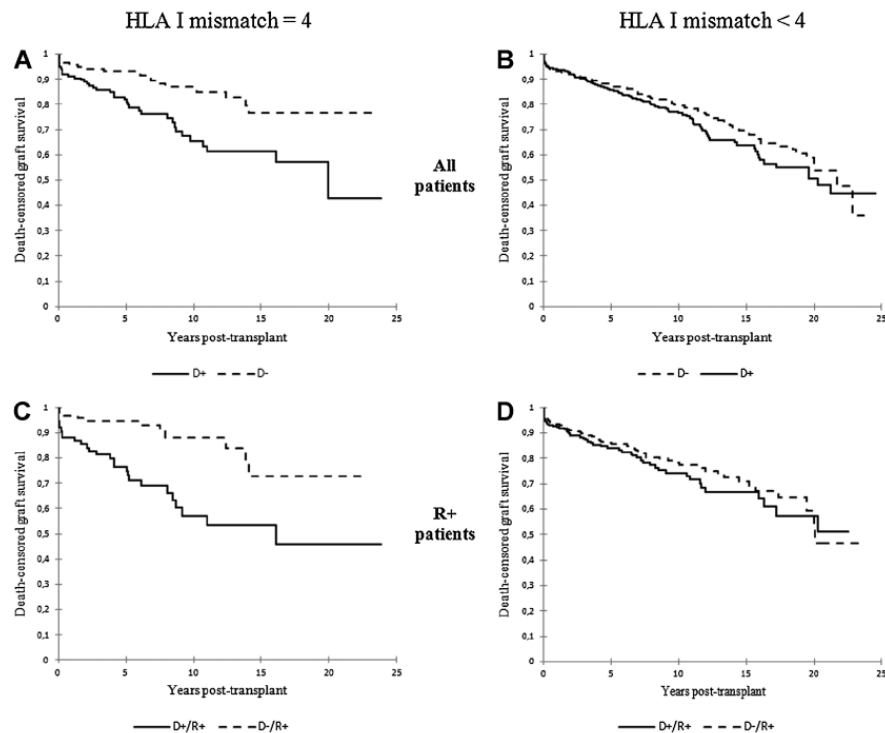
**Tableau VI : donneur D+ est un facteur de risque indépendant de perte de greffon en l'absence d'antigénémie CMV.** D+; R+ donneur ou receveur séropositif au CMV le jour de la greffe respectivement. Modèle 1: ajustement sur la créatinine, la protéinurie, la pression artérielle systolique

à 3 mois, le rejet aigu au cours de la première année confirmé par biopsie et la date de la transplantation. Modèle 2: Modèle 1 + ajustement sur le mycophénolate mofétil, la ciclosporine, l'utilisation des globulines anti-lymphocyte. Modèle 3: Modèle 2 + ajustement sur l'âge du donneur.

Ces résultats montrent que l'antigénémie n'est pas prédictive du risque de perte de greffon D+.

## **Un mésappariement complet pour les HLA classe I entre donneur et receveur augmente l'effet délétère de la transplantation d'un rein D+**

Le contrôle de la réplication virale du CMV au sein des tissus repose sur le recrutement de cellules compétentes et spécifiques et notamment de lymphocytes T CD8+ anti-CMV (Simon *et al.*, 2006) (Walter EA 1995) qui, pour la plupart, sont restreintes aux molécules de HLA de classe I exprimées par les cellules présentatrices d'antigène du receveur du fait de l'éducation intra thymique. Nous émettons l'hypothèse que l'interaction entre les cellules T CD8+ anti-CMV du receveur et les cellules infectées par le CMV du donneur pourraient être entravée par l'absence de compatibilité HLA entre donneur et receveur (quatre mésappariement entre les antigènes HLA-A et-B). La figure X montre en effet que le risque de perte du greffon (mort-censurée) chez les patients recevant un rein D+, est maximal pour les couples donneur/receveur présentant un mésappariement total de leur HLA classe I (graphe en haut à gauche,  $p=0,0004$ ), et cette association est encore plus prononcée chez les patients R+ (graphe en bas à gauche,  $p=0,0001$ ). Par ailleurs notons que le risque de RA en cas mésappariement complet en classe I est identique pour les D+ et les D-. En revanche, lorsque le couple donneur/receveur compte au moins un allèle HLA-I apparié, les courbes de survie sont similaires pour les D+ et les D- (Figure X, colonne de droite). Cet effet négatif du mésappariement complet en classe I est toujours observé après ajustement sur les variables du modèle décrit (HR 1,666 [1,359-5,234],  $p=0,004$ ; R+: HR 3,051 [1,012-7,254],  $p=0,012$ ). Il faut observer que le risque supplémentaire de perte de greffon lié au fait de recevoir un rein D+ est très élevé (HR=3) en cas de mésappariement complet en classe I chez les R+.

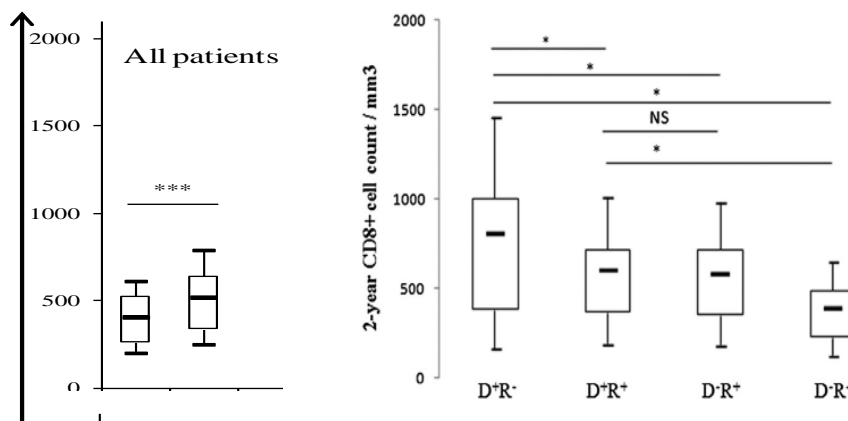


**Figure X : un mésappariement complet pour les antigènes HLA de classe I entre le donneur et le receveur augmente le risque de développer les effets délétères associés aux reins D+.** Survie du greffon (mort-censurée) chez les patients possédant un mésappariement complet des antigènes HLA de classe I (HLA mismatch=4 ; **A et C**) ou un mésappariement partiel (au moins une compatibilité ; HLA <4 mismatch **B et D**) en fonction de la sérologie CMV du donneur. Les panneaux supérieurs représentent tous les patients (310 mismatch complet HLA=4 et 969 pour mismatch partiel HLA<4), et les 2 graphes inférieurs les receveurs séropositif au CMV (n = 644). La survie du greffon chez les patients D+ est plus faible que chez les patients D- uniquement lorsque le mésappariement HLA est fort (A, p=0,0004; C, p=0,0001).

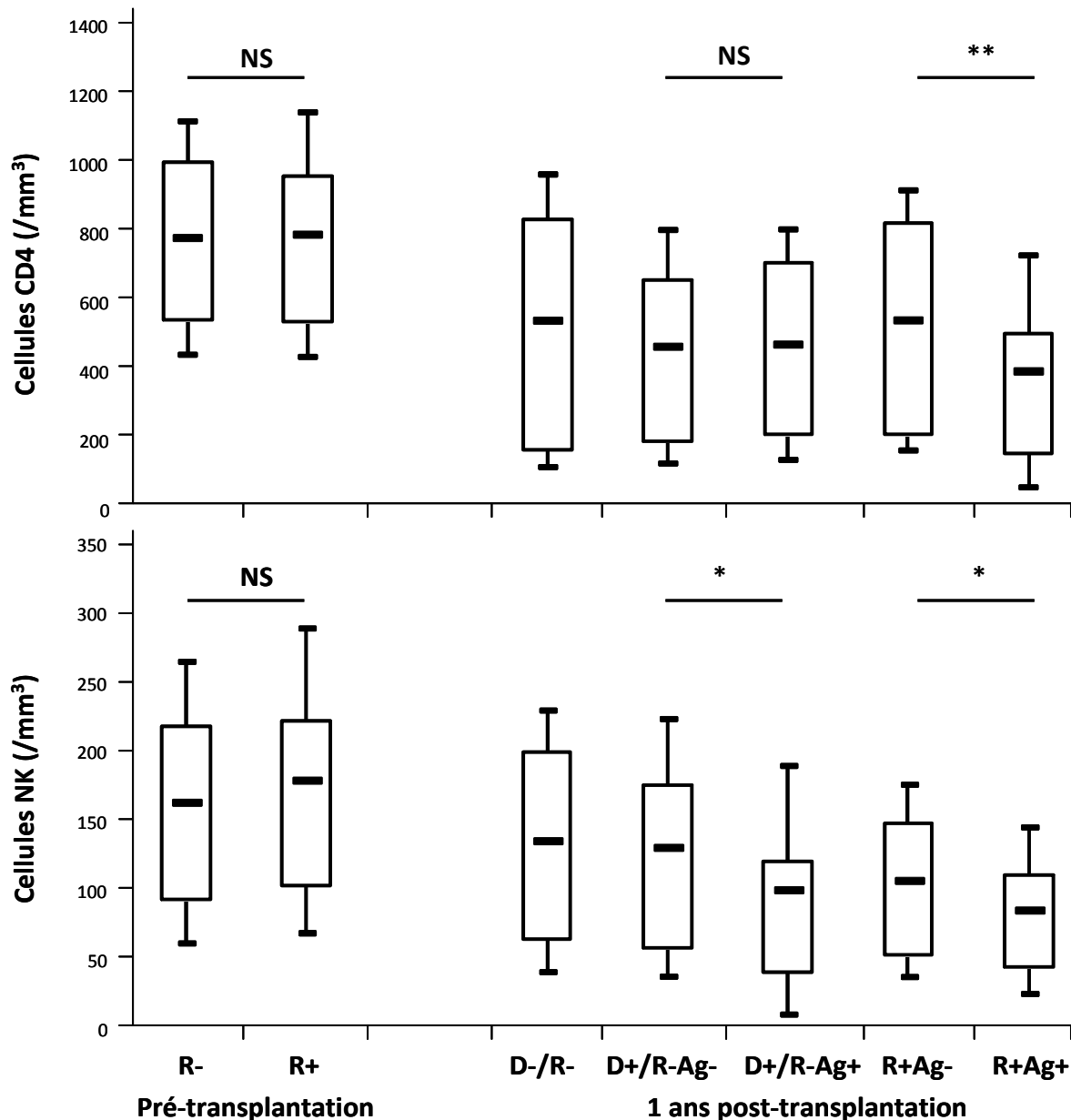
Les résultats mentionnés ci-dessus permettent de soulever l'hypothèse que la réponse anti-CMV des cellules CD8+ restreinte en classe I pourrait jouer un rôle dans la perte du greffon lié au CMV. Nous avons décidé d'explorer davantage cette réponse immunitaire au sein de notre cohorte de patients. Nous avons d'abord évalué les possibilités d'utiliser un marqueur simple à obtenir sur une large cohorte de patients et qui serait en corrélation avec l'exposition au CMV. Il a été précédemment rapporté qu'une fraction importante du répertoire CD8+ était consacrée à la défense contre le CMV (Khan *et al.*, 2004). Nous émettons l'hypothèse que la taille du « compartiment » des cellules CD8+ serait corrélée avec la réponse anti-CMV.

## Exposition au CMV et numération des cellules CD8+ circulantes

Les numérations cellulaires CD8+ enregistrés chez 663 patients à J0 sont plus élevées chez les receveurs R+ que chez les R- ( $520 \pm 270$  vs  $407 \pm 206/\text{mm}^3$  respectivement;  $p < 0,0001$ ) figure XI A. A 2 ans post-transplantation, l'analyse statistique ANOVA nous indique que la numération cellulaire CD8+ est plus faible pour les patients D-R- par rapport au groupe des patients exposés au CMV ( $p < 0,0001$ ). En revanche, à 2 ans ni la taille du compartiment de cellules NK ni celle des cellules CD4+ ne sont affectés par l'exposition au CMV (figure XII).



**Figure XI : Les patients non exposés au CMV (D-R-) ont moins de LT CD8 circulants comparés à tous les autres groupes de patients exposés au CMV.** Chaque graphique représente le nombre de cellules CD8+/mm<sup>3</sup> (A) en prégreffe et (B) à deux années post-transplantation en fonction de la sérologie CMV des donneurs (D+/D-) et receveurs (R+/R-). La moyenne est représentée par une barre noire, avec les premier et troisième quartiles. Les moustaches supérieures et inférieures représentent l'écart type. NS: non significatif, \* $p < 0,0001$ ; test de Fisher.



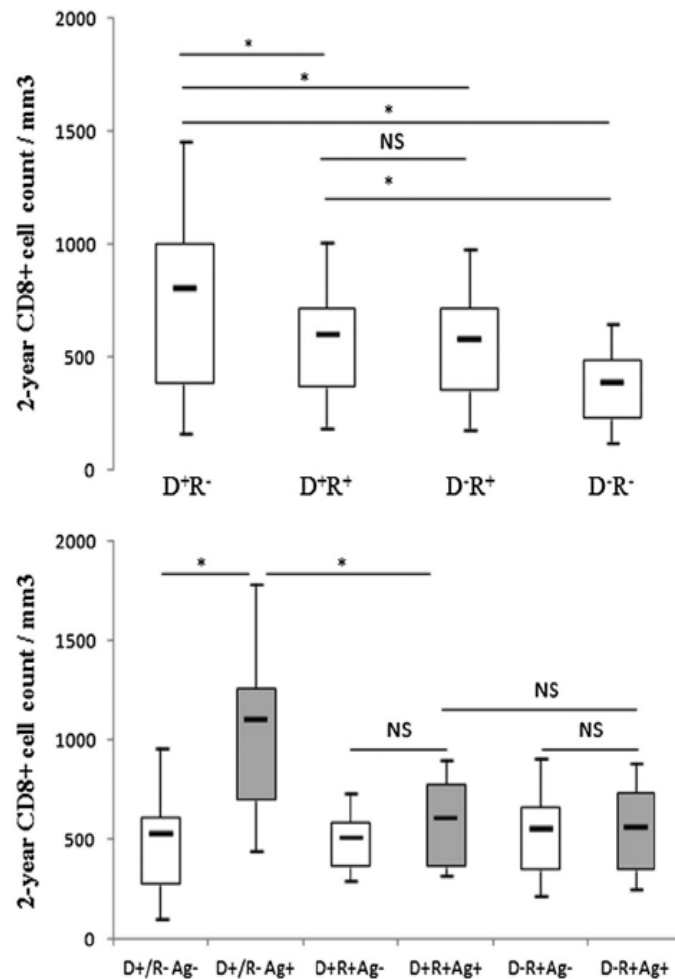
**Figure XII: Numérations cellulaires des « compartiments » NK et CD4 similaires quel que soit le statut sérologique CMV.** Le graphique supérieur représente le nombre de cellules CD4+/mm<sup>3</sup> et le graphique inférieur le nombre de cellules NK/mm<sup>3</sup>. Au sein de chaque histogramme les données sont organisées en pré-greffe et à un an post-transplantation en fonction de la sérologie CMV des donneurs (D+/D-) et receveurs (R+/R-). La moyenne est représentée par une barre noire, avec les premier et troisième quartiles. Les moustaches supérieures et inférieures représentent l'écart type. NS: non significatif, \*p < 0,0001; test de Fisher.

Après avoir établi qu'il existe un lien étroit entre la taille du compartiment CD8 et l'exposition au CMV, nous avons ensuite analysé ce paramètre à 2 ans après la greffe ainsi que son évolution temporelle en fonction des sérologies CMV des donneurs et receveurs (c'est-à-dire D-R-, D+R-, D-R+, D+R+).

## Compartiment cellulaire CD8+ circulant à 2 ans post-transplantation en fonction des sérologies CMV des donneurs et receveurs et de la survenue d'une antigénémie

Nous avons analysé le nombre de cellules CD8+ circulantes à l'anniversaire des 2 ans post-transplantation en fonction des sérologies CMV des donneurs et receveurs (c'est-à-dire D-R-, D+R-, D-R+, D+R+, Figure XIII, histogramme supérieur). Fait intéressant, le nombre de cellules CD8+ à 2 ans est beaucoup plus faible chez les D+R+ que chez les D+R- ( $599 \pm 410$  vs  $811 \pm 647$ /mm<sup>3</sup>,  $p < 0.0001$ ).

Nous avons aussi analysé l'influence de l'antigénémie sur le compartiment des cellules CD8 circulantes à 2 ans après la greffe. A deux ans post-transplantation, les numérations cellulaires CD8+ ont été enregistrées pour 164 D-R-, 128 D+R- (dont 51 Ag+), 169 D-R+ (dont 69 Ag+) et 130 D+R+ (dont 71 Ag+). Chez les D+R-, les patients qui ont développé une antigénémie ont un nombre beaucoup plus élevé de LT CD8 que ceux qui n'en ont pas développée ( $1112 \pm 678$ /mm<sup>3</sup> vs  $530 \pm 432$ /mm<sup>3</sup>,  $p < 0.0001$ ). En revanche, chez les R+ la survenue d'une antigénémie n'est pas associée à un nombre plus élevé de CD8+ ( $605 \pm 296$ /mm<sup>3</sup> vs  $510 \pm 224$ /mm<sup>3</sup>,  $p = 0.221$  pour les D+R+ et  $567 \pm 318$ /mm<sup>3</sup> vs  $558 \pm 350$ /mm<sup>3</sup>,  $p = 0.902$  pour les D-R+). En outre, en valeur absolue du nombre de CD8 circulants, la différence entre D+R+Ag+ et D+R-Ag+ est très significative ( $605 \pm 296$ /mm<sup>3</sup> vs  $1112 \pm 678$ /mm<sup>3</sup>  $p < 0.0001$ ), alors qu'aucune différence n'est observée entre D+R+Ag+ et D-R+Ag+ ( $p = 0.574$ ). Ces résultats indiquent que les patients D+R- ont de façon durable un nombre plus élevé de cellules CD8+ comparé aux patients D+R+. Ces résultats pourraient suggérer que, les patients D+R- gardent, longtemps après la phase initiale de la réplication du CMV, un nombre plus élevé de cellules CD8+ consacrées à la défense anti-CMV par rapport aux patients D+R+.



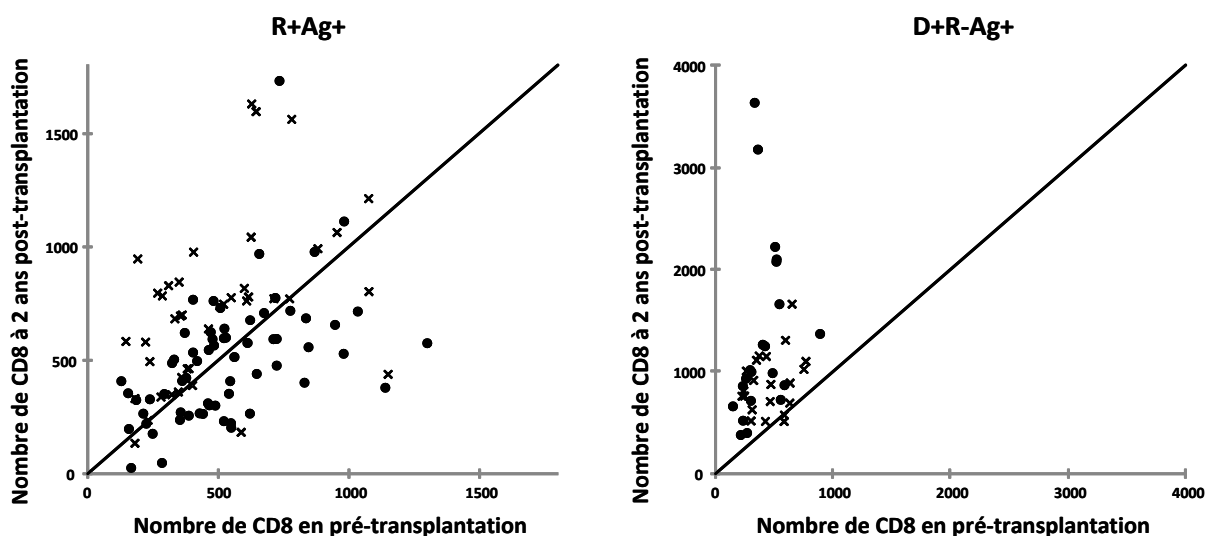
**Figure XIII : A 2 ans, la numération cellulaire CD8 est beaucoup plus faible chez les patients D+R+ que chez les D+R-.** Chaque graphique représente le nombre de cellules CD8+/mm<sup>3</sup> à 2 ans post-transplantation en fonction de la sérologie CMV des donneurs (D+/D-) et receveurs (R+/R-). Dans le panneau supérieur, les patients sont présentés par groupe de sérologie CMV. Dans le panneau inférieur, les patients sont présentés selon l'antigénémie CMV survenue au cours de la première année. La moyenne est représentée par une barre noire, avec les premier et troisième quartiles. Les moustaches supérieures et inférieures représentent l'écart type. NS: non significatif, \*p <0,0001; test de Fisher

## Evolution temporelle après la greffe du compartiment de cellules CD8+ circulantes

Nous avons ensuite étudié les variations individuelles du nombre de cellules CD8+ entre J0 et 2 ans post-transplantation. Nous avons 414 patients pour qui les sous-populations de lymphocytes T ont été enregistrées à la fois à J0 et à 2 ans. Comme la taille du « compartiment » des cellules CD8+ est similaire chez les D+R+ et les D- R+, nous les avons



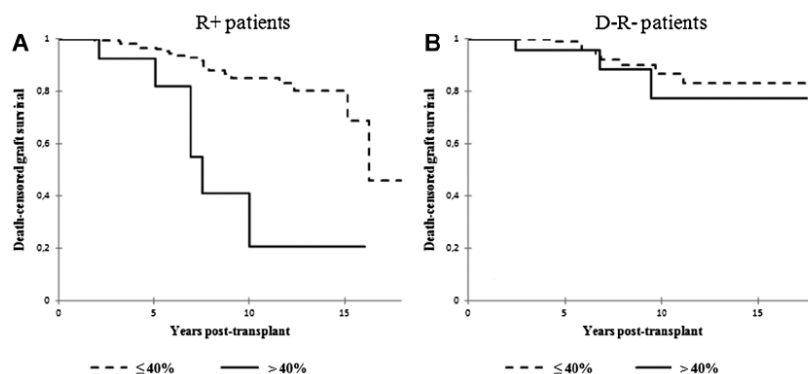
regroupés pour l'analyse de l'évolution individuelle de la sous-population de cellules CD8+. Nous nous sommes concentrés sur les patients qui ont sans ambiguïté réactivés le CMV (c'est-à-dire 106 R+Ag+ et 43 D+R-Ag+). Des tests de corrélation de Spearman (figure XIV) montre que le nombre de cellules CD8+ en pré-transplantation est faiblement corrélée avec le nombre à 2 ans chez les patients R+Ag+ ( $R=0.465$ ) et D+R-Ag+ ( $R=0.367$ ). Comme le montre la figure XIV, la réactivation du CMV est associée à une augmentation individuelle du nombre de cellules CD8+ chez pratiquement tous les D+R-Ag+ (95%). En revanche, 36% des patients R+Ag+ ont montré une réduction de la numération CD8+ après réactivation du CMV. De plus, la valeur moyenne de la variation individuelle de la numération CD8+ est plus élevée chez les D+R-Ag+ par rapport aux R+Ag+ ( $197\pm 190$  vs  $29\pm 79\%$ ,  $p<0.0001$ ). Ensemble, ces données indiquent que chez les receveurs R+ la réponse CD8+ préalablement déclenchée par une antigénémie à CMV est fortement hétérogène par rapport aux D+R-Ag+.



**Figure XIV : Une virémie précoce du CMV entraîne une importante et durable augmentation des cellules CD8+ chez les patients R-, à l'opposé des patients R+ chez qui la variation des CD8+ est très hétérogène.** Répartition des patients par numération cellulaire de CD8+ au jour 0 (D0; abscisse) et à l'année 2 (axe des y) pour les patients qui ont eu un épisode de virémie à CMV durant la première année post-transplantation (Ag+). Les patients R+ (n = 106) et D+R- (n = 43) sont représentés sur le panneau de gauche et de droite respectivement. Les points noirs représentent les patients qui ont reçu des globulines anti-lymphocytaires, et la croix ceux qui n'ont jamais reçu de traitement. La ligne noire est la bissectrice indiquant l'absence de variation des CD8+.

## La contraction du compartiment des cellules CD8+ en post-transplantation augmente le risque de perte du greffon chez les patients exposés au CMV

Dans un premier temps nous avons évalué l'évolution individuelle de la numération CD8+ ( $[(2\text{ans}-J0)/J0]-100$ ) chez les patients exposés au CMV. Puis nous avons comparé la survie des greffons chez les patients présentant une réduction sévère de la numération cellulaire CD8+ ( $\leq 10\%$  percentile ou réduction  $\geq 40\%$ ) par rapport aux autres. Les patients R+ avec une telle réduction montrent une diminution significative de la survie du greffon (figure XV graphe de gauche,  $p=0.003$ ); sachant que les deux groupes présentent la même moyenne d'âge ( $48.1\pm 13.2$  vs  $49.7\pm 13.1$  ans respectivement,  $p=0.58$ ). Fait intéressant, la forte diminution du nombre de cellules CD8+ reste associée à un risque accru de perte du greffon chez les 113 patients R+ qui ont reçu des globulines anti-lymphocytaires ( $p=0.014$ ). Au contraire, une diminution du nombre de cellules CD8+ de plus de 40% n'a aucune incidence sur la survie du greffon chez les patients D-R- ( $p=0,991$ ), ce qui indique que la réduction dans le compartiment n'est pas par elle-même associée à une mauvaise survie du greffon. Par conséquent, l'évolution du nombre de cellules CD8+ chez les patients transplantés rénaux pourrait être un marqueur de la réponse immunitaire anti-CMV et sa diminution prédire des effets néfastes sur la survie du greffon.



**Figure XV : La réduction sévère du nombre de cellules CD8+ en post-transplantation augmente le risque de perte du greffon chez les receveurs R+.** Les graphiques la survie du greffon (mort-censurée) par réduction CD8+ nombre de cellules à 2 ans chez les patients R+ (graphique de gauche,  $n=204$ ) ou chez les patients D-R- (graphique de droite,  $n=121$ ). Les lignes noires continues indiquent les receveurs ayant plus de 40% de réduction de leur numération CD8+ (R+,  $n=26$ ; D-R-,  $n=36$ ); et les lignes discontinues, les receveurs sans réduction  $>40\%$  (R+,  $n=178$ ; D-R-,  $n=85$ ). La diminution du nombre de CD8+ a été associée à la perte du greffon chez les patients R+ ( $p=0.003$ ) mais pas chez les D-R- ( $p=0,991$ ).

En résumé, ces résultats, issus d'une cohorte de 1279 patients transplanté rénaux décrivent que la latence du CMV chez le donneur est un facteur de risque indépendant de la perte du greffon. De plus, l'incapacité des receveurs à augmenter leur « compartiment » de cellules TCD8+ et le complet mésappariement HLA entre donneurs et receveurs sont des facteurs de risques importants de développer une dysfonction chronique associée au CMV de l'allogreffe rénale.

Ce premier travail clinique nous a donc permis :

- 1- de montrer que recevoir un rein d'un donneur infecté par le CMV était un facteur de risque indépendant de perte de greffon
- 2- d'apporter des arguments suggérant fortement que la réponse immunitaire de l'hôte modulait cet effet négatif.

Nous allons maintenant présenter les résultats de notre recherche de facteurs de risque génétique lié à la réponse immune qui pourrait influencer ce sur-risque de perte de greffon D+. Nous nous sommes intéressés à un gène impliqué dans l'épuisement de la réponse immunitaire anti virale : programmed cell death-1.

# **Etude de l'association entre polymorphisme du gène de programmed cell death-1 (PD1) et survie des greffons: impact de l'infection CMV du donneur**

Les patients transplantés sont immunodéprimés ce qui facilite la réactivation des virus herpes comme le CMV. Certains patients ont été infectés antérieurement à la greffe et hébergent un virus le plus souvent en latence au sein de leurs cellules avant la greffe. D'autres patients, n'ayant jamais vu le CMV avant la transplantation peuvent être infectés par un greffon provenant d'un donneur séropositif pour le CMV et donc qui peut contenir des cellules où le CMV est en latence voire plus probablement en réplication au moment de la greffe. Comme nous l'avons décrit précédemment, l'inflammation permet au CMV de se réactiver et la mort cérébral et la transplantation d'un organe crée localement une forte inflammation favorable à la réactivation. L'interaction PDL-PD-1 est une voie de co-inhibition de la réponse immunitaire qui est utilisée par de nombreux virus dont le CMV murin pour inhiber les cellules immunitaires, à la fois via une régulation positive de PDL1 sur les APC induite par le virus (Benedict *et al.*, 2008) mais aussi via son rôle clé dans l'épuisement clonal des effecteurs CD8 notamment (Wherry, 2011) ce qui pourrait favoriser la réplication viral du CMV et augmenter son pouvoir pathogène. Un polymorphisme du gène *PDCD1* est connu pour diminuer la fonctionnalité de la protéine (Bertsias *et al.*, 2009) ce qui pourrait modifier la réponse immune anti-CMV et donc le contrôle de la réplication virale locale du CMV. Nous avons étudié si ce SNP était associé au sur-risque de perte de greffon D+ chez 1120 patients greffés rénaux et sur 193 greffés pulmonaires.

## **Fréquence de l'allèle PD1.3 dans la population des greffés rénaux**

La fréquence de l'allèle A au sein de notre cohorte est de 13% et l'équilibre d'Hardy-Weinberg est respecté ( $p=0,92$ ). Afin de vérifier l'homogénéité de notre population, nous avons repris les caractéristiques cliniques des patients en fonction de leur polymorphisme

(Table VII). Pour cela deux sous-groupes sont constitués, les patients homozygotes sauvages GG et les patients présentant au moins un allèle variant A (GA et AA).

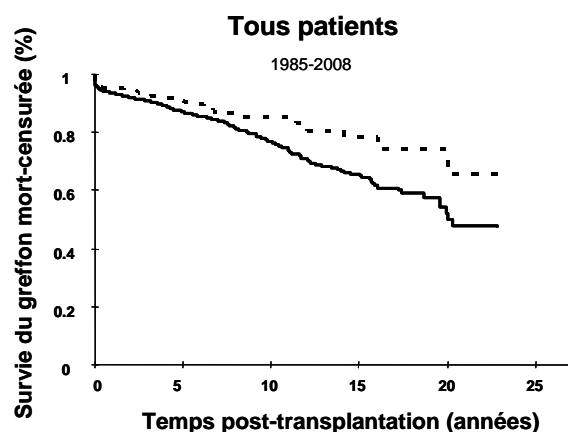
Données cliniques <sup>a</sup>	Tous patients		p <sup>b</sup>
	G/G N=847	G/A & A/A N=273	
Age moyen donneur ± ET (années)	44±17	42±17	0.17
Donneur vivant (%)	13(1.5)	4(1.4)	0.84
Age moyen receveurs ± ET (années)	46±15	46±15	0.97
Sexe receveur (% homme)	527(62)	166(60)	0.68
<b>Maladie rénale initiale</b>			
Diabètes (%)	47(5)	11(4)	0.40
Glomérulonéphrites (%)	91(11)	24(9)	0.42
Polykystose rénale (%)	135(16)	62(23)	0.01
Néphropathie IgA (%)	83(10)	32(12)	0.44
Autres (%)	491 (58)	144(52)	0.15
<b>Sérologie CMV avant greffe <sup>c</sup></b>			
D-/R- (%)	233(27)	72(26.3)	0.79
D-/R+ (%)	243(29)	85(31.3)	0.46
D+/R- (%)	176(21)	57(21)	0.98
D+/R+ (%)	195(23)	58(21)	0.61
Sérologie à CMV inconnue (%)	-	1 (0.4)	0.55
Prophylaxie à CMV (%)	194(23)	58(21)	0.60
Prophylaxie inconnue (%)	19 (2.2)	9 (3)	0.45
<b>Caractéristiques du greffon</b>			
Rang de greffe >1 (%)	114(13)	34(12)	0.74
Temps d'IF moyen ± ET (heures)	20±8	21±8	0.34
Moyenne de MM HLA AB ± ET	2.7±1	2.8±0.9	0.26
Moyenne de MM HLA DR ± ET	1.2±0.7	1.2±0.6	0.61
Immunisation anti-HLA (%)	171(22)	51(20)	0.66
Retard de fonction du greffon (%)	176(21)	64(23)	0.39
Rejet aigu (%)	283(33)	88(32)	0.77
<b>Traitements durant les 3 premiers mois</b>			
Immunoglobulines anti-lymphocytaires (%)	547(65)	183(67)	0.42
Anticorps anti-récepteur à l'IL-2 (%)	253(30)	70(26)	0.21
Ciclosporine (%)	559(66)	190(70)	0.28
Tacrolimus (%)	203(24)	64(23)	0.91
Mycophenolate mofetil (%)	553(65)	176(64)	0.84
Azathioprine (%)	268(32)	93(34)	0.50

**Tableau VII : Caractéristiques des patients transplantés rénaux de Tours entre 1985 et 2008 en fonction du polymorphisme PD-1.3.** <sup>a</sup> Les données sont représentées en pourcentage ou moyenne ± l'écart type. <sup>b</sup> Le test du Khi<sup>2</sup> est utilisé pour les données quantitatives et le test statistique de Mann-Whitney pour les données numériques. <sup>c</sup> D et R représente respectivement les donneurs et les receveurs et les signes +/- les statuts sérologiques séro-positif/négatif au CMV.

De part les tests statistiques réalisées sur les différents items cliniques nous pouvons observer qu'en ce qui concerne l'âge des patients, des donneurs, les traitements immunosuppresseurs, notre population est parfaitement homogène. La seule différence présente indique que la polykystose rénale (maladie initiale conduisant à la greffe) est plus importante chez les patients possédant l'allèle mutant A que chez les patients homozygotes sauvages GG.

## Survie des greffons rénaux en fonction du polymorphisme pour le gène *PDCD1*

Suite à cela, nous avons évalué la survie des greffons rénaux (mort-censurée) en fonction du polymorphisme des patients pour le gène *PDCD1* (Figure XVI). Le test statistique de Kaplan-Meier indique que les patients porteurs de l'allèle mutants (GA/AA, ligne pointillée) ont une meilleure survie de leur greffon que les patients homozygotes sauvage (GG, ligne pleine) avec  $p=0,005$ .



**Figure XVI : Les patients porteurs de l'allèle A du SNP PD1.3 ont une meilleure survie des greffons.** Analyse Kaplan-Meier de la survie mort-censurée des greffons rénaux chez les patients transplantés rénaux à Tours entre 1985 et 2008 inclus ( $n=1120$ ) en fonction du génotype PD1.3 (ligne pointillée = porteurs de l'allèle A, GA/AA ; trait plein = homozygote GG,  $p=0,005$ ).

Comme nous avons rapporté dans la première partie de nos résultats, que l'infection par le Cytomégalo virus chez le donneur (D+) était un facteur de risque de perte du greffon et que la réponse immune pouvait moduler cet effet, nous avons évalué l'impact du SNP de PD1 sur le risque de perte de greffon chez les patients D+. La table VIII présente les données

cliniques de base des patients D+ et D- en fonction du polymorphisme PD1.3. Au sein de la population D+ il n'est observé aucune différence entre les GG (n=371) et GA/AA (n=115) pour tous les items cliniques rapportés. Cependant, au sein de la population D- nous pouvons noter deux différences, la maladie de polykystose rénale est survenue de façon plus importante chez les patients possédant l'allèle muté (GA/AA) que chez les patients homozygotes sauvages GG, p=0,009. De la même façon, les patients D- possédant un allèle variant (GA/AA) ont reçu plus de SAL en traitement immunosuppresseurs que les patients GG, p=0,018.

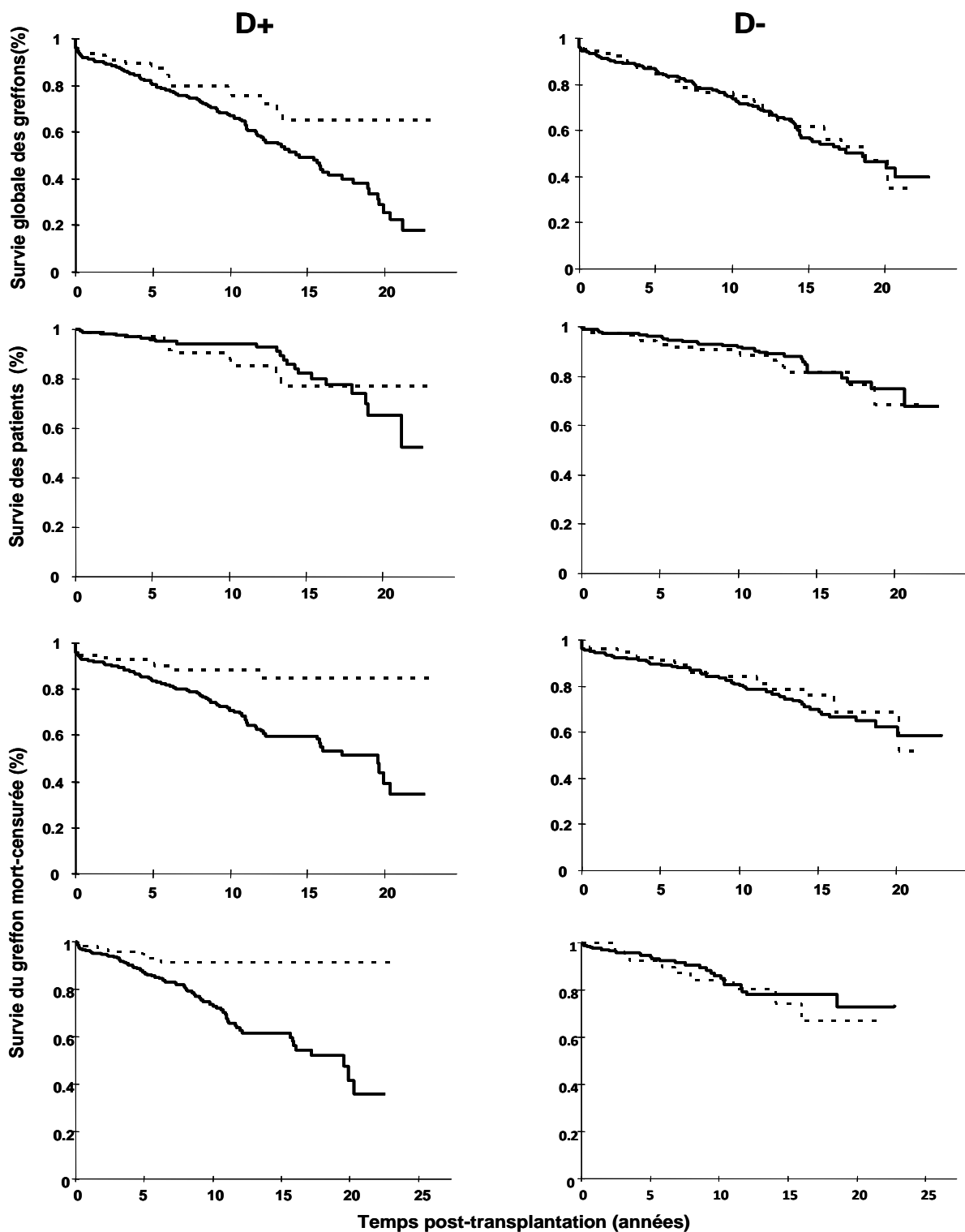
Clinical data <sup>a</sup>	D+ patients			D- patients		
	G/G N= 371	G/A & A/A N= 115	p <sup>b</sup>	G/G N= 476	G/A & A/A N= 157	p <sup>b</sup>
Mean Donor age ± SD (years)	46 ± 17	43 ± 18	0.16	42 ± 16	41 ± 16	0.67
Living donor (%)	5 (1)	1 (1)	0.87	8 (1)	3 (2)	0.87
Mean Recipient age ± SD (years)	47 ± 15	46 ± 15	0.42	45 ± 15	46 ± 15	0.41
Recipient male(%)	225 (60)	65 (57)	0.49	302 (63)	100 (64)	0.95
<b>Cause of renal disease</b>						
Diabetes (%)	22 (6)	6 (5)	0.95	25 (5)	5 (3)	0.40
Glomerulonephritis (%)	57 (15)	16 (14)	0.82	53 (11)	12 (8)	0.27
Polycystis kidney (%)	68 (18)	25 (22)	0.50	67 (14)	37 (23)	0.008
IgA nephropathy (%)	29 (8)	12 (10)	0.49	54 (12)	20 (13)	0.74
Other (%)	195 (53)	56 (49)	0.54	277 (58)	83 (53)	0.35
<b>Pre-transplantation CMV-serology of the recipient</b>						
R- (%)	176 (47)	57 (50)	0.77	233 (49)	72 (46)	0.56
R+ (%)	195 (53)	58 (50)	0.77	243 (51)	85 (54)	0.56
CMV prophylaxis (%)	175 (48)	52 (47)	0.80	19 (4)	6 (4)	0.87
Unknown prophylaxis (%)	10 (3)	4 (3)	0.90	9 (2)	4 (2)	0.85
<b>Graft characteristics</b>						
Graft rank >1 (%)	56 (15)	12 (10)	0.27	58 (12)	22 (14)	0.64
Mean cold Ischemia time ± SD (hours)	21 ± 9	21 ± 8	0.99	20 ± 7.5	21 ± 8	0.25
Mean HLA mismatch AB ± SD	2.7 ± 1	2.7 ± 1	0.58	2.7 ± 1	2.8 ± 1	0.29
Mean HLA mismatch DR ± SD	1.3 ± 0.7	1.3 ± 0.6	0.93	1.2 ± 0.7	1.2 ± 0.6	0.51
Anti-HLA immunization (%)	80 (24)	19 (18)	0.25	91 (21)	31 (22)	0.85
Delayed graft function (%)	78 (21)	26 (23)	0.82	101 (21)	37 (23)	0.61
Acute rejection (%)	122 (33)	34 (29)	0.21	161 (34)	54 (34)	0.97
<b>Treatments in the first 3 months</b>						
Anti-lymphocyte globulins (%)	247 (67)	67 (59)	0.19	300 (63)	116 (74)	0.018
Anti-IL2R (%)	110 (30)	35 (31)	0.92	143 (30)	35 (22)	0.07
Ciclosporine (%)	251 (68)	78 (68)	0.99	348 (73)	112 (71)	0.74
Tacrolimus (%)	94 (25)	29 (25)	0.92	109 (23)	35 (22)	0.95
Mycophenolate mofetil (%)	251 (68)	77 (67)	0.94	302 (63)	99 (63)	0.98
Azathioprine (%)	108 (29)	35 (30)	0.88	160 (34)	57 (36)	0.60

**Tableau VIII : Caractéristiques des patients transplantés avec un rein provenant d'un donneur séropositif (D+, colonne de gauche) ou séronégatif (D-colonne de droite) au CMV, entre 1985 et 2008, en fonction du polymorphisme PD-1.3.** <sup>a</sup> Les données sont représentées en pourcentage ou moyenne ± l'écart type. <sup>b</sup> Le test du Khi<sup>2</sup> et le test de Mann-Whitney ont été utilisés. R représente respectivement les receveurs et les signes +/- les statuts sérologiques séro-positif/négatif au CMV.

La survie des greffons en fonction du polymorphisme PD-1.3 ont ensuite été analysées par la méthode de Kaplan-Meier au sein des populations D+ et D-. Comme le montre la figure XVII, la présence de l'allèle A est associée à une meilleure survie des greffons que ce soit mort non censurée ( $p=0,006$  ; graphe supérieur) ou après censure des décès ( $p=0,001$ , troisième ligne) uniquement au sein de la population D+. En revanche, le SNP PD-1.3 n'est pas associé à une meilleure survie des patients, ( $p=0,748$  deuxième ligne). Nous avons aussi fait une analyse en excluant les patients mineurs au moment de la greffe. Pour plusieurs raisons : il est établi que le très jeune âge des receveurs augmente les risques de complications chirurgicales (thrombose par ex). De plus, le jeune âge peut influencer sur la compliance aux traitements. De manière intéressante, lorsque nous réalisons la survie des greffons en mort censurée chez des patients ayant plus de 18 ans à la greffe et une survie de greffon de plus de 10 jours, nous pouvons observer une forte association entre les porteurs de l'allèle variant A et la survie des greffons sur la population D+ ( $p=0,0002$ ), sur la population D+.

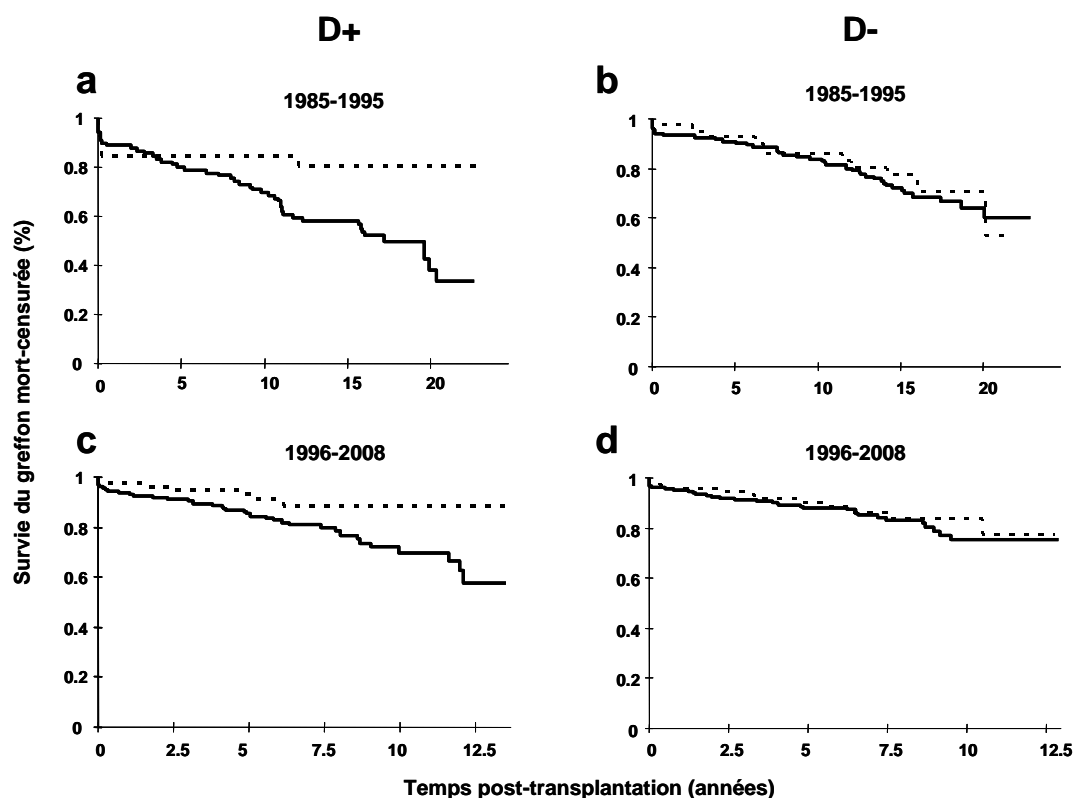
Après ajustement sur l'âge du donneur, du receveur, sur le rejet aigu et l'incompatibilité HLA, l'analyse multivariée réalisée a révélé que l'allèle A du SNP est un facteur de protection fort et indépendant de l'échec de la greffe pour les patients D+ (HR: 0,381 ; IC à 95% 0,209 au 0,696;  $p=0,0017$ ).





**Figure XVII : L'allèle variant A du SNP PD-1.3 est fortement associée à la survie des greffons chez les patients qui reçoivent le rein d'un donneur séropositif au CMV (D+).** Analyses Kaplan-Meier de 486 D+ (colonne de gauche) et de 633 D- (colonne de droite), survie des greffons en mort non-censurée (première ligne,  $p=0,006$  et  $p=0,885$  respectivement), survie des patients (deuxième ligne,  $p=0,748$  et  $p=0,471$  respectivement), survie des greffons mort-censurée (troisième ligne,  $p=0,001$  et  $p=0,486$  respectivement), survie des greffons mort-censurée après exclusion des patients mineurs au moment de la greffe (quatrième ligne  $p=0,0002$  et  $p=0,9$ ). Les lignes continues représentent les patients homozygotes sauvages GG et les lignes pointillées les patients possédant au moins un allèle variant (GA/AA).

Les traitements immunosuppresseurs et anti infectieux ainsi que la prise en charge globale des patients a beaucoup évolué entre 1985 et 2008. La période 1995-1996 apparaît à bien des égards comme une charnière importante : introduction du Mycophenolate mofetil à la place de l'Azathioprine, début de l'utilisation du prograf et du Gancyclovir et du monitoring par l'antigenémie CMV. Afin de renforcer la robustesse de ces résultats nous avons analysé séparément les patients greffés avant et après cette période charnière. Nous avons divisé notre cohorte en 2 groupes, les patients transplantés entre 1985 et 1995 inclus (n=293) et les patients greffés entre 1996 et 2008 inclus (n=827). La table VIII présente l'homogénéité de chaque groupe pour les divers items cliniques en fonction du SNP PD-1. Nous avons analysé la survie des greffons chez les patients D+ et D- dans chaque période : 1985-1995 et 1996-2008 en fonction du polymorphisme de PD-1.3. Les survies en mort-censurée sont regroupées au sein de la figure XVIII, qui nous montre que l'allèle variant A est associée à une meilleure survie des greffons rénaux chez les patients D+ pour les deux périodes de transplantation (panels a et c : p=0,014 et p= 0,022, respectivement). En revanche, nous n'observons aucune association au sein de la population D- dans chacune des périodes (panels b et d : p=0,69 et p=0,54, respectivement).

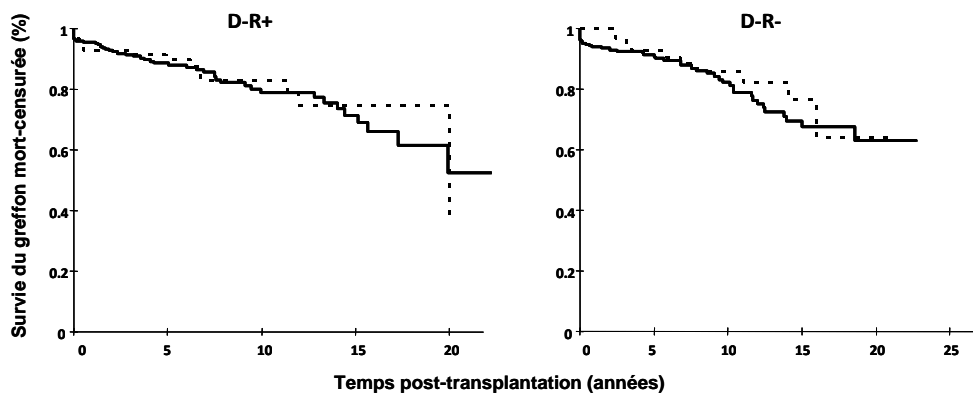


**Figure XVIII : L'allèle variant A du SNP PD-1.3 est associée à la survie des greffons rénaux au sein de la population D+ quelque soit la période de transplantation.** Analyses Kaplan-Meier de la survie des greffons, mort-censurée. Les graphes supérieurs représentent la survie des greffons entre 1985 et 1995 inclus (panel a, n=116 p=0,014 et panel b, n=177 p=0,69) et les graphes inférieurs entre

1996 et 2008 inclus (panel c, n=370 p=0,022 et panel d, n=457 p=0,54). Les lignes continues représentent les patients homozygotes sauvages GG et les lignes pointillées les patients possédant au moins un allèle variant (GA/AA).

Nous avons réalisé une analyse multivariée qui montre que le SNP PD-1.3 est un facteur de risque indépendant pour les deux périodes étudiées (HR: 0,336 ; IC à 95% de 0,132 à 0,851 ; p=0,021 et HR: 0,421 ; IC à 95% 0,190 à 0,934 ; p=0,033 pour 1985 à 1995 et 1996-2008 périodes, respectivement). Ainsi, l'association observée est forte et robuste chez les patients transplantés rénaux recevant un organe CMV-positif quelle que soit la période de transplantation.

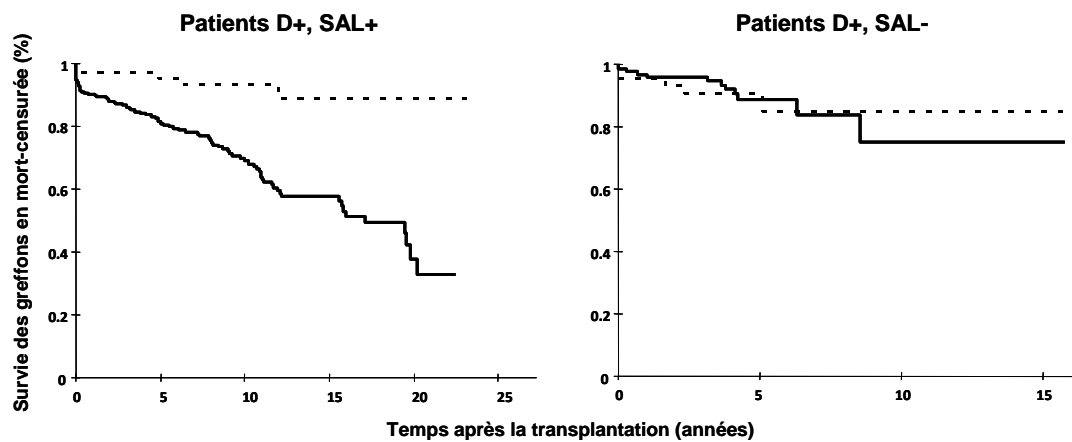
Afin d'affiner ces résultats concernant les D-, nous avons analysé séparément les patients D-R+ et D-R-. A partir de la figure XIX, les graphes D-R+ (à gauche, n=328, p=0,723) et D-R- (à droite, n=305, p=0,522) nous pouvons observer que les courbes de survie des greffons sont quasiment superposables quelque soit le génotype pour le SNP PD-1.3, avec un début de séparation très tardif chez les patients D-R+. Le CMV du receveur semble donc avoir peu d'impact dans l'association précédemment observée par rapport au CMV du donneur.



**Figure XIX : L'allèle variant A du SNP PD-1.3 n'est pas associée à la survie des greffons chez les patients D-R+ ou D-R-. Analyses Kaplan-Meier de 328 D-R+ (graphe de gauche, p=0,723) et de 305 D-R- (colonnes de droite, p=522). La survie des greffons en mort non-censurée est présentée. Les lignes continues représentent les patients homozygotes sauvages GG et les lignes pointillées les patients possédant au moins un allèle variant (GA/AA).**

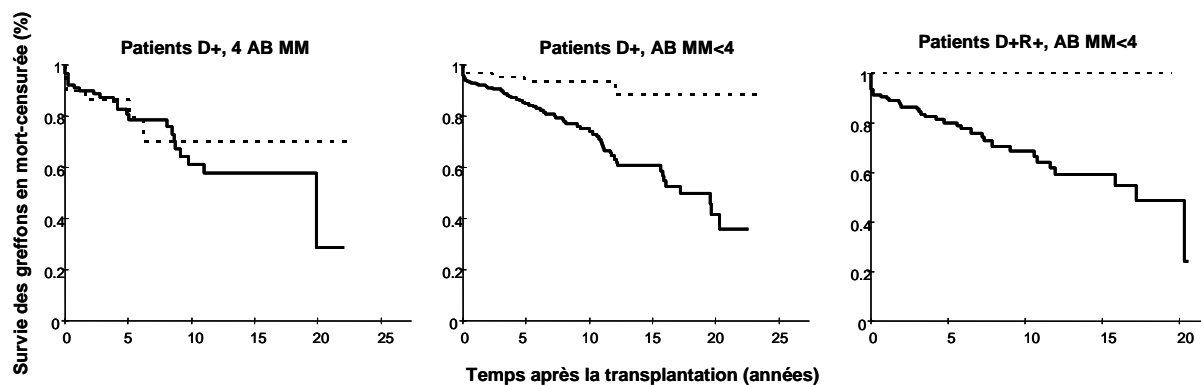
Avant 1995-1996, les globulines anti-lymphocytaires (GAL) étaient communément administrées à tous les patients. Les GAL contiennent des anticorps dirigés contre différentes populations de cellules immunitaires dont principalement les lymphocytes T. Ce traitement a pour objectif de lutter contre le rejet de greffe en entraînant une destruction massive des lymphocytes circulants, elles sont données le plus souvent comme un traitement d'induction

sur quelques jours après la greffe rénale. Ce type de traitement pourrait ainsi modifier profondément et durablement la réponse immune anti CMV. Pour cette raison nous avons analysé la survie des greffons rénaux D+ en fonction du polymorphisme PD-1.3, séparément chez les patients ayant reçu des GAL (n=314 D+, figure XX graphe de gauche) ou n'en n'ayant pas reçues (n=170, figure XX graphe de droite). Les porteurs de l'allèle A ont une meilleure survie de leur greffon que les patients homozygotes GG ( $p < 0,0001$ ) pour les patients ayant reçu des GAL alors que pour les patients n'en n'ayant pas reçues, la survie est la même quelque soit le génotype ( $p = 0,96$ ).



**Figure XX: Association très significative ( $p < 0,0001$ ) entre la survie des greffons D+ et le SNP PD1.3 uniquement chez les patients qui ont reçu des GAL.** Analyses Kaplan-Meier présentant les courbes de survie des greffons D+ transplantés entre 1985 et 2008 et ayant reçu (n=312, graphe de gauche) ou non (n=172, graphe de droite) des GAL en fonction du SNP PD-1.3. Les lignes continues représentent les patients homozygotes sauvage (GG) pour le SNP PD-1.3 et les lignes pointillées les porteurs de l'allèle variant A (GA/AA).

Précédemment, lors de l'étude clinique, nous avons mis en évidence que les patients D+ présentaient une meilleure survie du greffon lorsque le mésappariement entre HLA du donneur et du receveur n'était pas totale. Nous avons analysé l'influence du SNP de PD-1.3 sur ces résultats (Figure XXI). De la même façon, les patients D+ possédant l'allèle A présentent une meilleure survie que les patients homozygotes sauvages GG lorsque le mésappariement HLA AB entre donneur et receveur n'est pas total ( $p = 0,0003$ ). Et cette observation reste fortement significative pour les patients D+R+ ( $p = 0,0003$ ).



**Figure XXI: Le mésappariement total des antigènes HLA de classe I entre le donneur et le receveur protège contre les effets délétères d'une greffe de rein d'un donneur D+.** Analyses Kaplan-Meier de la survie des greffons (mort-censurée) chez les patients D+ possédant un mésappariement total (=4) des antigènes HLA de classe I (**graphe de gauche, n=120 et p=0,625**) ou un mésappariement partiel (HLA<4) pour les patients D+ (**graphe central, n=366 et p=0,0003**) et D+R+ (**graphe de droite, n=183 et p=0,0003**). Les lignes continues représentent les patients homozygotes sauvage (GG) pour le SNP PD-1.3 et les lignes pointillées les porteurs de l'allèle variant A (GA/AA).

Ce second travail nous a permis:

1. D'observer une meilleure survie des greffons pour les patients porteurs de l'allèle variant A.
2. De remarquer que cette association se retrouve plus précisément chez les patients D+.
3. D'observer la présence de cette association quelque soit la période de transplantation.
4. D'établir la présence de deux facteurs de risques associé au polymorphisme du SNP PD-1.3 :
  - Les patients D+ porteurs de l'allèle A ont une meilleure survie de leur greffon que les patients homozygotes GG pour les patients ayant reçu des GAL
  - Les patients D+ porteurs de l'allèle A présentent une meilleure survie de leur greffon que les patients homozygotes sauvages GG lorsque le mésappariement HLA AB entre donneur et receveur n'est pas total.

## **Impact du SNP PD1.3 chez les patients transplantés pulmonaires**

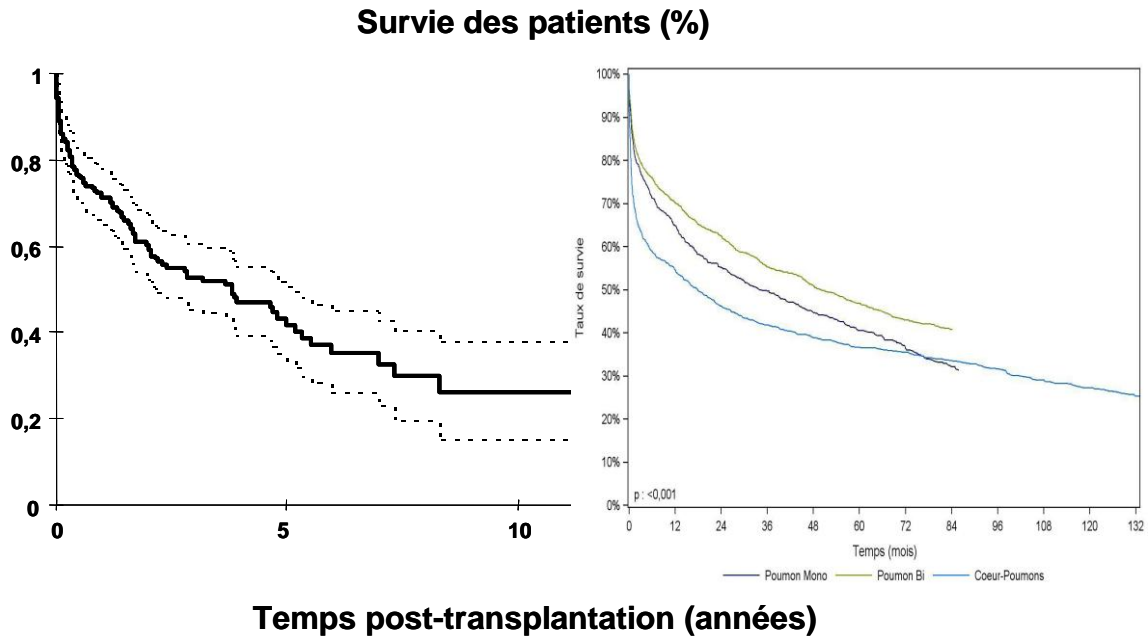
Le CMV est l'agent pathogène principal responsable d'infection fréquente chez les patients transplantés pulmonaires chez lesquels le poumon constitue un réservoir important de virus latent ((Thomas *et al.*, 2009). De ce fait, afin de confirmer l'association observée chez les patients transplantés rénaux, nous avons choisi de constituer une cohorte de validation à partir de patients transplantés pulmonaires. En tenant compte des « hazard ratios » observés en greffe rénale nous avons estimé que nous allions atteindre une puissance suffisante à l'analyse avec 200 malades dont environ 90 patients transplantés pulmonaires ayant reçu un greffon provenant d'un donneur D+ c'est-à-dire infecté par le CMV (risque  $\beta=0,2$  et risque  $\alpha=0,05$ ).

Nous avons décidé de faire une étude multicentrique. Pour ce faire, nous avons établi des collaborations avec plusieurs centres hospitaliers. Les centres sollicités ont été l'hôpital FOCH de Suresnes, l'hôpital européen Georges Pompidou de Paris et le CHRU de Nantes à travers l'institut du thorax de l'hôpital nord Laënnec.

Le Laboratoire HLA de Saint Louis à Paris était en possession d'ADN pour 185 patients sur la période 1992 et 2009. Par ailleurs nous avons pu obtenir de l'ADN pour 13 patients greffés à Nantes. Nous avons génotypés l'ensemble de ces patients pour le SNP PD-1.3. Il s'est avéré que pour 5 d'entre eux, l'ADN était trop dégradé ou alors en quantité non suffisante pour pouvoir établir notre polymorphisme. Ainsi au final, nous disposions d'une cohorte de 193 patients transplantés pulmonaires entre.

### **Caractéristiques des patients transplantés pulmonaires**

Nous avons d'abord analysé si cette cohorte présentait une survie à long terme similaire à celle des patients transplantés pulmonaires au niveau national, grâce au rapport annuel 2011 de l'agence de la biomédecine (figure XXII). A 60 mois post-transplantation, nous observons une survie à long terme entre 40 et 50% au sein de notre cohorte qui est quasiment similaire au niveau national (entre 30 et 50%, graphe de droite). Notre cohorte ne semble donc pas présenter de biais majeur par rapport à la cohorte nationale.



**Figure XXII : Survie à long terme similaire des patients transplantés pulmonaires de notre cohorte et issue du rapport annuel 2011 de l'agence de biomédecine.** Analyse Kaplan-Meier, courbe de survie (en continue) de notre cohorte (n=193) en fonction des années à gauche, les courbes pointillées représentent les écart-types aux différents points et la courbe noire la moyenne. Courbe de survie établie par l'agence de la biomédecine en fonction du type de transplantation pulmonaire réalisée (à droite).

Nous avons ensuite analysé le polymorphisme pour le SNP PD-1.3 en divisant la population de patients en deux sous-groupe : les porteurs de l'allèle variant A (GA/AA) et les homozygotes sauvages GG. La fréquence de l'allèle A est de 13.7% au sein du groupe de patients transplantés pulmonaire. Ce pourcentage est proche de celui que nous avons pour les patients transplantés rénaux (13%). L'équilibre d'Hardy-Weinberg est respecté ( $p=0,23$ ). A nouveau nous avons établi une table regroupant des items cliniques spécifiques de la transplantation pulmonaire afin d'évaluer l'homogénéité de notre population selon leur génotype (table IX). Aucune différence n'apparaît entre les deux sous-groupes A (GA/AA) et GG que ce soit pour la moyenne d'âge des donneurs, le rang de greffe, la maladie initiale pulmonaire ayant conduit à la transplantation, la proportion des statuts sérologique anti-CMV des donneurs et receveurs ou encore le type de transplantation réalisé (poumon simple, poumons doubles, bloc cœur-poumons).

Données cliniques <sup>a</sup>	Tous patients		p <sup>b</sup>
	G/G N= 148	G/A & A/A N= 45	
Age donneur moyen ± ET (années) <sup>c</sup>	40 ± 14	44 ± 16	0.51
Age receveur moyen ± ET (années)	36 ± 14	36 ± 14	0.93
Sexe receveur (% homme)	84 (57)	26 (58)	0.96
Rang de greffe >1 (%)	7 (5)	3 (7)	0.95
<b>Maladie pulmonaire initiale</b>			
Mucoviscidose (%)	80 (54)	23 (51)	0.86
Emphysème (%)	26 (18)	11 (24)	0.42
Fibrose pulmonaire (%)	14 (9)	4 (9)	0.86
Autres (%)	28 (19)	7 (16)	0.77
<b>Sérologie CMV avant greffe <sup>d</sup></b>			
D-/R- (%)	44 (30)	15 (33.5)	0.78
D-/R+ (%)	28 (19)	6 (13.5)	0.52
D+/R+ (%)	30 (20)	12 (27)	0.48
D+/R- (%)	32 (22)	10 (22)	0.90
Sérologie CMV inconnue (%)	14 (9)	2 (4)	0.44
Prophylaxie à CMV (%)	37 (25)	13 (29)	0.74
Prophylaxie à CMV inconnue (%)	111 (75)	32 (71)	0.74
<b>Type de transplantation</b>			
Mono-pulmonaire (%)	28 (19)	9 (20)	0.95
Bi-pulmonaire (%)	96 (65)	30 (67)	0.96
Cœur et poumon (%)	6 (4)	2 (4)	0.75
Autres (%)	18 (12)	4 (9)	0.73

**Tableau IX : Caractéristiques des patients transplantés pulmonaires entre 1992 et 2009 en fonction du polymorphisme PD-1.3.** <sup>a</sup> Les données sont représentées en pourcentage ou moyenne ± l'écart type. <sup>b</sup> Le test du Khi<sup>2</sup> est utilisé pour les données quantitatives et le test statistique de Mann-Whitney pour les données numériques. <sup>c</sup> Les données concernant l'âge du donneur n'étaient disponibles que pour 125 patients. <sup>d</sup> D et R représente respectivement les donneurs et les receveurs et les signes +/- les statuts sérologiques séro-positif/négatif au CMV.

En ce qui concerne les traitements immunosuppresseurs, nous avons relevés la donnée des traitements administrés au début de la transplantation (c'est-à-dire dans les 3 mois). N'étant pas en possession de ces données pour tous les patients, nous les avons reportés dans la table X pour l'ensemble des patients, les patients D+ ainsi que les patients D-. Aucune différence importante n'est observée entre les patients GG et ceux porteurs de l'allèle variant A.



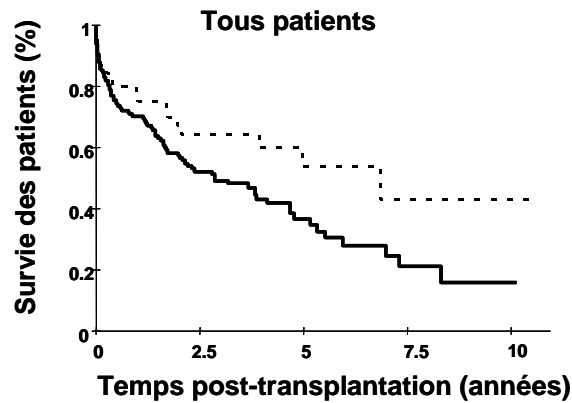
Caractéristiques des traitements immunosuppresseurs <sup>a</sup>		Tous patients			Patients D+			Patients D-		
		GG n=148	GA/AA n=45	p <sup>b</sup>	GG n=64	GA/AA n=22	p <sup>b</sup>	GG n=75	GA/AA n=21	p <sup>b</sup>
Immunoglobulines anti-lymphocytaires (%)	(+)	55 (37)	15 (33)	0.77	23 (36)	6 (27)	0.63	31 (41)	8 (38)	0.98
	(-)	24 (16)	9 (20)	0.72	12 (19)	4 (18)	0.79	11 (15)	5 (24)	0.51
	(?)	69 (47)	21 (47)	0.87	29 (45)	12 (55)	0.62	33 (44)	8 (38)	0.81
Ciclosporine (%)	(+)	110 (74)	36 (80)	0.56	50 (78)	17 (77)	0.83	58 (77)	18 (86)	0.59
	(-)	12 (8)	2 (4)	0.61	5 (8)	2 (9)	0.79	6 (8)	0 (0)	0.41
	(?)	26 (18)	7 (16)	0.93	9 (14)	3 (14)	0.76	11 (15)	3 (14)	0.76
Tacrolimus (%)	(+)	6 (4)	3 (6)	0.75	4 (6)	3 (14)	0.52	1 (1)	0 (0)	0.49
	(-)	55 (37)	12 (27)	0.26	29 (45)	3 (14)	0.017	25 (33)	8 (38)	0.88
	(?)	87 (59)	30 (67)	0.44	31 (49)	16 (72)	0.08	49 (66)	13 (62)	0.97
Mycophenolate mofetil (%)	(+)	47 (32)	14 (31)	0.92	23 (36)	5 (23)	0.38	23 (31)	8 (38)	0.70
	(-)	25 (17)	5 (11)	0.48	12 (19)	2 (9)	0.47	12 (16)	3 (14)	0.88
	(?)	76 (51)	26 (58)	0.56	29 (45)	15 (68)	0.10	40 (53)	10 (48)	0.83
Azathioprine (%)	(+)	72 (48)	24 (53)	0.70	33 (52)	14 (64)	0.46	38 (51)	10 (48)	1.00
	(-)	38 (26)	9 (20)	0.56	20 (31)	3 (14)	0.18	16 (21)	5 (24)	0.95
	(?)	38 (26)	12 (27)	0.95	11 (17)	5 (22)	0.79	21 (28)	6 (28)	0.82
Stéroïdes (%)	(+)	91 (61)	29 (64.5)	0.85	49 (77)	13 (59)	0.19	40 (53)	15 (71.5)	0.22
	(-)	10 (7)	2 (4.5)	0.83	2 (3)	0 (0)	0.98	8 (11)	2 (9.5)	0.80
	(?)	47 (32)	14 (31)	0.92	13 (20)	9 (41)	0.10	27 (36)	4 (19)	0.23

**Tableau X: Traitements immunosuppresseurs durant les 3 premiers mois suivant la greffe chez des patients transplantés pulmonaires entre 1992 et 2009 en fonction du polymorphisme PD-1.3.**

<sup>a</sup> Les données sont représentées en pourcentage ou moyenne  $\pm$  l'écart type. <sup>b</sup> Les test du  $\chi^2$  et le test statistique de Mann-Whitney sont utilisés.

## Survie des greffons pulmonaires en fonction du polymorphisme pour le gène *PDCDI*

En transplantation pulmonaire et contrairement à la transplantation rénale, il est particulièrement difficile de différencier avec certitude la mort causée par une dysfonction du greffon des décès d'autres causes. Nous avons donc décidé de n'évaluer que la survie des patients transplantés pulmonaires en fonction du polymorphisme du génotype du SNP PD-1.3 par la méthode de Kaplan-Meier. La figure XXIII montre que les patients porteurs de l'allèle variant A (GA/AA) ont une meilleure survie à long terme que les patients homozygotes GG ( $p=0,04$ ). En effet, à 10 ans post-transplantation plus de 40% des patients GA/AA survivent par rapport à seulement moins de 20% des patients homozygote sauvage (GG) pour ce polymorphisme.



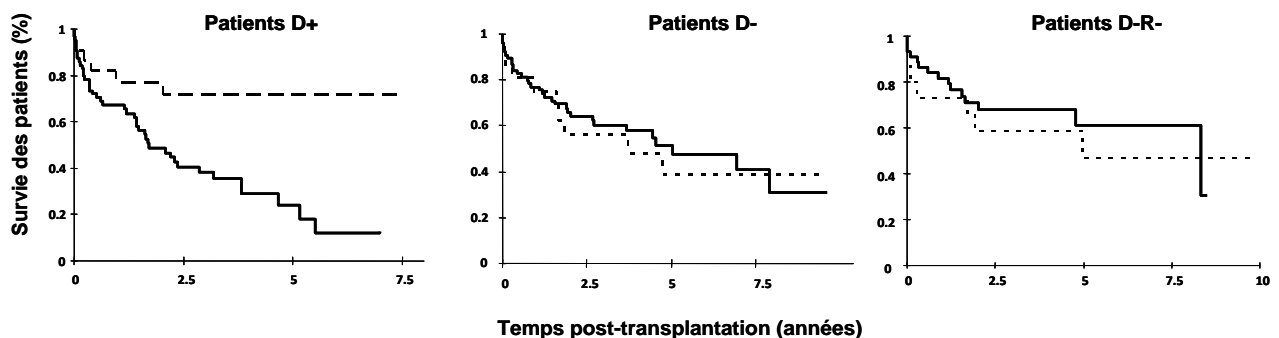
**Figure XXIII: L'allèle A de PD1.3 est associé une meilleure survie des patients transplantés pulmonaires (n=193).** Survie des patients transplantés pulmonaires par la méthode Kaplan-Meier (GA/AA= ligne pointillée ; les patients homozygotes GG=trait plein, p=0,04.

De la même façon que précédemment pour les patients transplantés rénaux, nous nous sommes focalisés sur les patients recevant un greffon provenant d'un donneur séropositif au CMV (population dite D+) par rapport aux patients D-. L'homogénéité des caractéristiques basales de chaque population en fonction du génotype a été vérifiée afin de s'assurer de l'absence de biais (table XI). Aucune différence n'est statistiquement mise en évidence entre les deux groupes de génotype ni chez les D+ ni chez les D-. La population des patients transplantés pulmonaires porteurs de l'allèle variant A est donc comparable à celle des patients homozygotes sauvages GG que ce soit chez les D+ ou chez les D-.

Nous pouvons observer sur la figure XXIV que l'allèle variant A est significativement associée à une meilleure survie des patients lorsque ceux-ci recevaient un greffon provenant d'un donneur séropositif au CMV (graphe de gauche, p=0,003). En effet, la survie des patients à 5 ans post-transplantation après avoir reçu un greffon D+ est d'environ 70% pour les porteurs de l'allèle variant A (GA/AA) alors qu'elle est seulement d'environ 20% pour les porteurs homozygotes GG. A l'opposé, lorsque les patients reçoivent un greffon provenant d'un donneur séronégatif au CMV (D-), aucune différence n'existe concernant la survie entre les patients porteurs de l'allèle variant A et les patients homozygotes GG. De plus la survie dans le groupe de patients D-R- n'est pas différente entre les patients porteurs de l'allèle variant A et ceux porteurs homozygotes de l'allèle sauvage GG (p=0,606) ce qui tend à supposer que le CMV joue un rôle important dans l'association présente entre l'allèle variant A et la meilleure survie des patients.

Données cliniques <sup>a</sup>	Patients D+			Patients D-		
	G/G N= 64	G/A & A/A N= 22	p <sup>b</sup>	G/G N= 75	G/A & A/A N= 21	p <sup>b</sup>
Age moyen donneur ± ET (années) <sup>c</sup>	45 ± 14	44 ± 16	0.95	37 ± 13	44 ± 15	0.09
Age moyen receveur ±ET (années)	36 ± 14	35 ± 13	0.75	36 ± 14	39 ± 15	0.75
Sexe receveur (% homme)	35 (54)	13 (59)	0.91	44 (58)	11 (52)	0.79
Rang de greffe >1 (%)	3 (5)	2 (10)	0.80	4 (6)	1 (5)	0.69
<b>Maladie pulmonaire initiale</b>						
Mucoviscidose (%)	33 (52)	10 (45.5)	0.95	44 (58)	10 (48)	0.51
Emphysème (%)	9 (14)	4 (18)	0.84	15 (20)	6 (29)	0.58
Fibrose pulmonaire (%)	6 (9)	1 (4.5)	0.83	5 (7)	3 (14)	0.50
Autres (%)	16(25)	7 (32)	0.73	11 (15)	2 (9)	0.77
<b>Sérologie CMV pré-greffe du receveur</b>						
R- (%)	32 (50)	10 (45)	0.90	44 (59)	15 (71)	0.42
R+ (%)	30 (47)	12 (55)	0.71	28 (37)	6 (29)	0.63
Inconnue (%)	2 (3)	-	0.98	3 (4)	-	0.82
<b>Type d'organe transplanté</b>						
Mono-pulmonaire (%)	14 (22)	4 (18)	0.76	12 (16)	7 (33)	0.14
Bi-pulmonaire (%)	40 (62)	15 (68)	0.19	52 (69)	12 (57)	0.43
Cœur et poumon (%)	1 (2)	1 (5)	0.98	4 (5.5)	1 (5)	0.65
Autres (%)	9 (14)	2 (9)	0.82	7 (9.5)	1 (5)	0.82

**Tableau XI : Caractéristiques des patients transplantés pulmonaires entre 1992 et 2009 en fonction du polymorphisme PD-1.3.** La colonne de gauche représente les patients ayant reçu un greffon provenant d'un donneur séropositif au CMV (dite D+) et la colonne de droite ceux qui ont reçu leur greffon d'un donneur séronégatif au CMV (dit D-). <sup>a</sup> Les données sont représentées en pourcentage ou moyenne ± l'écart type. <sup>b</sup> Le test du  $\chi^2$  est utilisé pour les données quantitatives et le test statistique de Mann-Whitney pour les données numériques. <sup>c</sup> Les données concernant l'âge du donneur n'étaient disponibles que pour 120 patients. <sup>d</sup> D et R représente respectivement les donneurs et les receveurs et les signes +/- les statuts sérologiques séro-positif/négatif au CMV. <sup>e</sup> Les données concernant les traitements immunosuppresseurs ont été disponibles pour 154 patients (soit pour 79%).

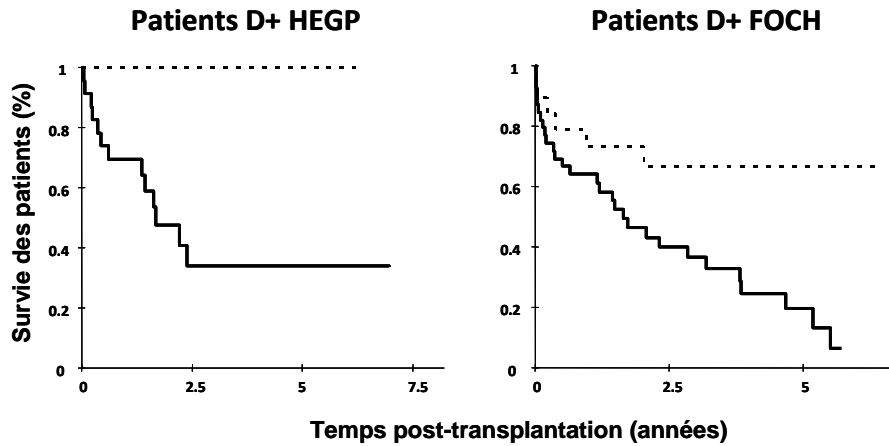


**Figure XXIV : L'allèle variant A du polymorphisme du gène PDCD1 est très fortement associée à une meilleure survie des patients transplantés pulmonaires lorsqu'ils reçoivent un greffon D+.** Analyses Kaplan-Meier de la survie des patients transplantés pulmonaires recevant un greffon provenant d'un donneur séropositif (graphe de gauche, n=86) ou d'un donneur séronégatif au CMV

(graphe du milieu, n=96) ou lorsque donneur et receveurs sont séronégatifs (D-R- ; graphe de droite). Les lignes continues représentent les patients homozygotes sauvage (GG) pour le SNP PD-1.3 et les lignes pointillées les porteurs de l'allèle variant A (GA/AA).

En raison de manque de données cliniques, l'analyse multivariée a été réalisée après ajustement sur l'âge du receveur et a révélé que l'allèle A est fortement protecteur du décès des patients D+ (HR: 0,302, IC à 95% de 0,128 à 0,716, p=0,006, A vs GG). Il est intéressant de noter que les HR sont similaires pour les deux types de transplantation et lorsque l'on combine les données rénales et pulmonaires, l'association est hautement significative (HR: 0,384, IC à 95% 0,235 au 0,628, p=0,0001).

Notre cohorte étant multicentrique, nous avons souhaité savoir si des tendances allant dans le même sens que l'association observée apparaissaient pour chaque centre (le nombre de patients pour chaque étant trop faible pour mettre en évidence une réelle association). Nous disposons du polymorphisme de 193 patients : 124 provenant du centre hospitalier FOCH de Suresnes, 56 provenant du centre hospitalier européen Georges Pompidou de Paris et 13 provenant du centre de Nantes (pour lequel nous n'avons pas pu réaliser les analyses, le nombre de patients étant trop faible). La survie à 5 ans était similaire dans les 2 centres (38 % pour l'HEGP et 40% pour FOCH) proche de celle de l'ABM au niveau national qui indiquait un taux de survie allant de 30 à 50%. Le nombre de patients provenant de l'HEGP étant assez faible (n=56), la survie à long terme peut ne pas être le reflet exact de la survie globale de ce centre. Nous avons ensuite réalisé les études de survie de patients via l'analyse Kaplan-Meier pour chaque centre chez les receveurs D+. La figure XXV présente les courbes de survies des patients transplantés pulmonaires ayant reçu une greffe pulmonaire D+ de l'HEGP et pour Foch. Comme on peut le voir, la tendance est la même dans les 2 centres, les patients porteurs de l'allèle variant A ont une meilleure survie que les GG (graphe gauche, HEGP n=23, p=0,08 ; droite Foch n=58 ; p=0,011). Cependant notons que dans le sous-groupe D+ de l'HEGP, seulement 3 patients sont porteurs de l'allèle A ce qui est trop peu pour permettre une vraie analyse statistique.



**Figure XXV : Analyses Kaplan-Meier des patients transplantés pulmonaires recevant un greffon D+ du centre HEGP (gauche, n=23 ; p=0,08) et Foch (droite, n=58, p=0,011).** Les lignes continues représentent les patients homozygotes sauvage (GG) pour le SNP PD-1.3 et les lignes pointillées les porteurs de l'allèle variant A (GA/AA).

Ce troisième travail nous a permis :

1. De confirmer l'association observée au sein de la cohorte de patients transplantés rénaux, la présence de l'allèle variant A du SNP PD-1.3 est associée à une meilleure survie des patients transplantés pulmonaires.
2. D'observer que cette association est à nouveau particulièrement importante chez les patients D+.
3. De retrouver cette association au sein des deux centres majoritaires composant le groupe de patients transplantés pulmonaires et donc d'affirmer l'absence d'un biais lié à l'étude multicentrique.

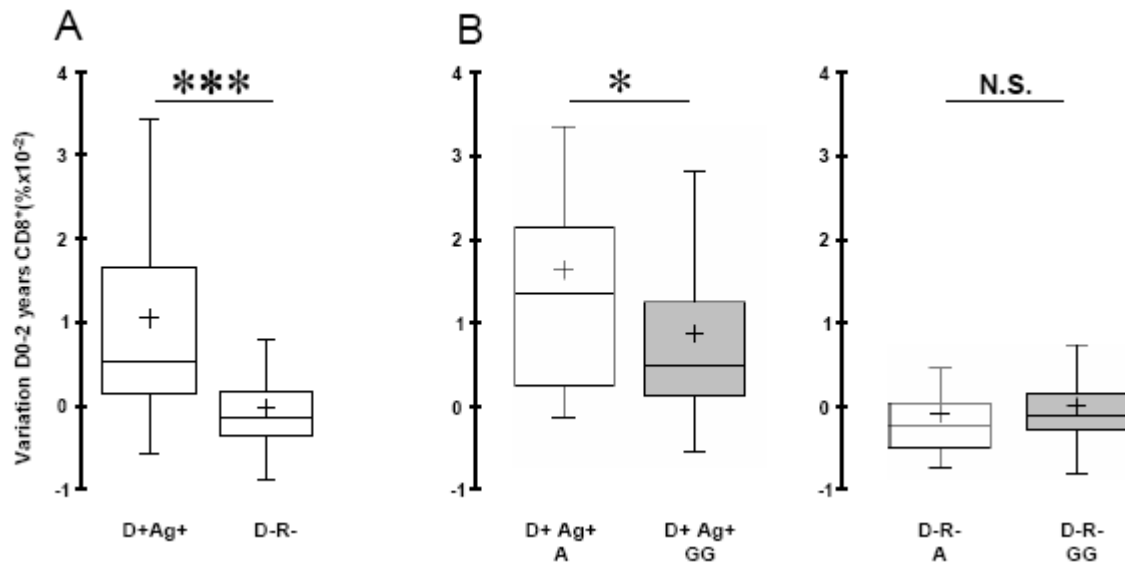
## **Mieux comprendre le lien entre le polymorphisme du gène *PDCD1*, le CMV et la survie des greffons : étude d'association entre polymorphisme *PDCD1* et la réponse anti-CMV**

Les résultats précédents ont montré que recevoir des reins de donneurs infectés par le CMV avait un impact délétère à long terme sur la fonction rénale. De plus, la présence de l'allèle A du SNP PD1 protège électivement les receveurs de reins D+ contre cet effet délétère. Ces résultats suggèrent donc d'une part que le virus intra-greffon accélère la dysfonction chronique du greffon et d'autre part que la molécule PD1 joue un rôle dans le contrôle de la réplication du CMV dans les greffons.

Par ailleurs notre étude a montré que les effets liés au CMV du donneur et la protection contre cet effet conférée par le variant du SNP de PD1 étaient beaucoup plus importants lorsque le receveur était lui-même infecté avant la greffe (R+) comparé aux receveurs naïfs (R-). Ces résultats suggèrent que les patients anciennement infectés par le CMV (R+) ont plus de difficulté que les patients naïfs (R-) à contrôler les conséquences du CMV dans le greffon à long terme, suggérant un certain épuisement de la réponse anti CMV chez les patients anciennement infectés par le CMV non porteurs de l'allèle protecteur. Ceci nous amène à tester l'hypothèse que le polymorphisme PD1.3 à l'état homozygote GG pourrait être associé à une moindre fonctionnalité des LT anti CMV chez les patients les plus anciennement infectés (R+). Nous avons pour cela d'abord analysé les numérations des cellules CD8+ des patients transplantés rénaux en fonction du polymorphisme PD-1.3. Puis dans un deuxième temps nous avons réalisé une étude cas-témoin de la réponse anti CMV *in vitro* chez des patients greffés rénaux R+ homozygotes AA appariés à des patients GG.

## Analyse de la numération des cellules CD8+ des patients transplantés rénaux en fonction du polymorphisme PD-1.3

Nos travaux ayant montré le lien entre la taille du « compartiment » des cellules CD8+ circulantes et l'exposition au CMV des patients. Nous avons donc dans un premier temps analysé les « compartiments » des cellules TCD8+ des patients transplantés rénaux en fonction du polymorphisme PD-1.3. Nous avons analysé rétrospectivement l'évolution individuelle du nombre de cellules CD8+ entre le jour de la greffe et 2 ans après la transplantation chez les patients D-R- et les patients D+ qui ont répliqué le CMV durant la première année suivant la transplantation (évaluée par l'antigénémie pp65 dite D+Ag+pp65) en fonction du génotype PD1.3. Le nombre de cellules CD8+ à ces deux temps précis (J0 et 2ans) étaient disponibles pour 211 patients (90 D+Ag+pp65 et 121 D-R-). Nous pouvons constater que la variation moyenne du nombre de cellules CD8+ est beaucoup plus importante pour les patients D+Ag+pp65 que pour les patients D-R- ( $+110 \pm 159\%$  contre  $-6 \pm 55\%$ ,  $p < 0,0001$ ; figure XXV panel A) confirmant le lien prolongé entre le nombre de cellules CD8 et la réplication du CMV durant la première année. Nous avons ensuite analysé ce paramètre en fonction du polymorphisme pour le SNP PD-1.3. Pour les patients D+AG+pp65, l'augmentation du nombre de cellules CD8+ est significativement plus forte pour les patients porteurs de l'allèle variant A que pour les patients homozygotes GG ( $164 \pm 215\%$  vs  $85 \pm 131\%$ ,  $p = 0,034$ , figure XXV panel B). Alors que pour les patients D-R-, aucune différence dans la taille du « compartiment » de cellule CD8+ n'est significative entre les génotypes ( $-0,8 \pm 55\%$  vs  $12 \pm 80\%$ ,  $p = \text{ns}$ , figure XXV panel B). Ce qui suggère que l'accroissement plus important du nombre de cellules CD8+ chez les porteurs de l'allèle A est bien lié au CMV. Notons par ailleurs que les patients D+AG+pp65 porteurs de l'allèle A et du génotype GG étaient du même âge (48 contre 50 ans,  $p = 0,65$ ) et qu'ils ont reçu les traitements anti- lymphocytaires de façon similaire (52% vs 54%,  $p = 0,85$ ).



**Figure XXVI : L'accroissement du nombre de cellules CD8+ chez les patients porteurs de l'allèle A est plus grand que celui des patients homozygotes GG chez les receveurs D+ qui ont présenté une virémie CMV durant la première année de greffe.**

Les panels A et B montrent l'évolution du « compartiment » des cellules CD8+ entre le jour de la transplantation dit J0 et 2 ans post-transplantation (calculé comme  $100 \times \frac{[2\text{ans}CD8+/\text{mm}^3] - [J0CD8+/\text{mm}^3]}{[J0CD8+/\text{mm}^3]}$ ). Panel A: Les patients D+ présentant une antigénémie suite à la transplantation (D+Ag+pp65, n=90) comparé aux patients n'ayant jamais rencontré le CMV dit D-R- (n=121) \*\*\* p<0,0001. Panel B: La présence (histogramme vide) ou l'absence (histogramme remplie) de l'allèle variant A du SNP PD-1.3 chez les patients D+Ag+pp65 (n=86), \*\* p=0,034, et chez les patients D-R- (n=103), p=0,925.

## Etude clinique cas-témoin de la réponse anti-CMV in vitro chez des patients greffés rénaux R+ homozygotes AA appariés à des patients GG

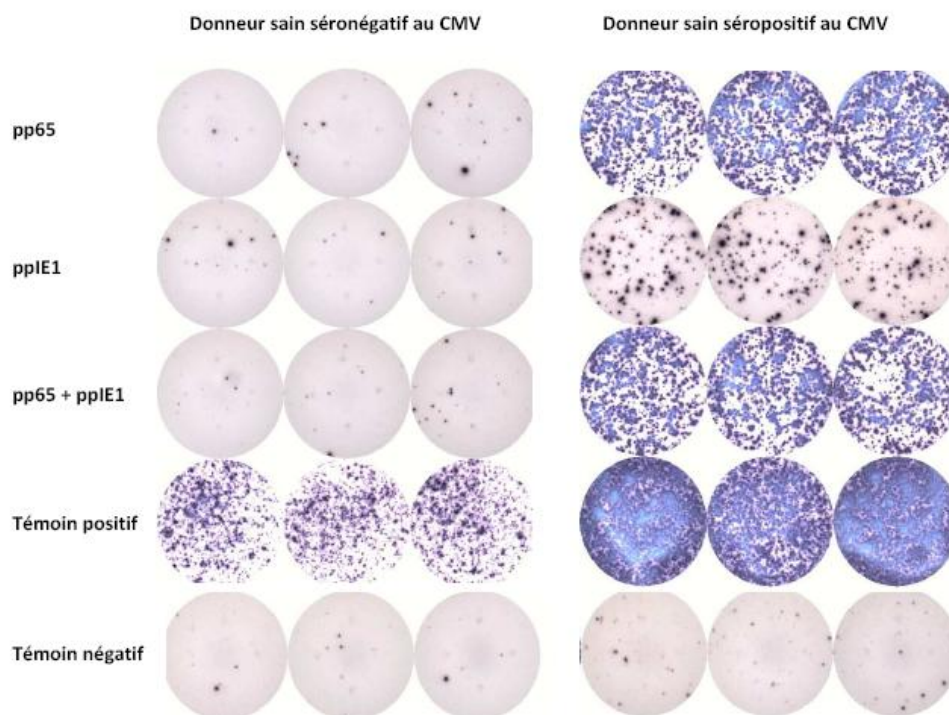
La réponse immunitaire anti-CMV passe notamment par l'activation des lymphocytes T CD8+ et la production d'IFN $\gamma$ . Durant nombre d'infections virales chroniques, la stimulation répétée entre des cellules T spécifiques et les antigènes viraux conduit au phénomène d'épuisement clonal. Plus le stade de l'épuisement clonal est avancé, moins les cellules T sont capables de produire de l'IFN $\gamma$  (Wherry et.al, 2011). Nous avons donc décidé d'étudier cette synthèse en réponse aux peptides du CMV en fonction de l'allèle de PD1.3 chez des patients transplantés rénaux. Dans ce dessein, nous avons dans un premier temps mis en place au laboratoire la technique ELIspot. Ce type de stimulation permet d'évaluer essentiellement la production d'IFN $\gamma$  des cellules mémoires spécifiques pour des peptides dominants du CMV chez des individus ayant déjà été infectés par le CMV. Dans un



deuxième temps, grâce à une étude cas-témoin, nous avons étudié la réponse des PBMC provenant de patients transplantés rénaux et suivis au sein du service de néphrologie à Tours.

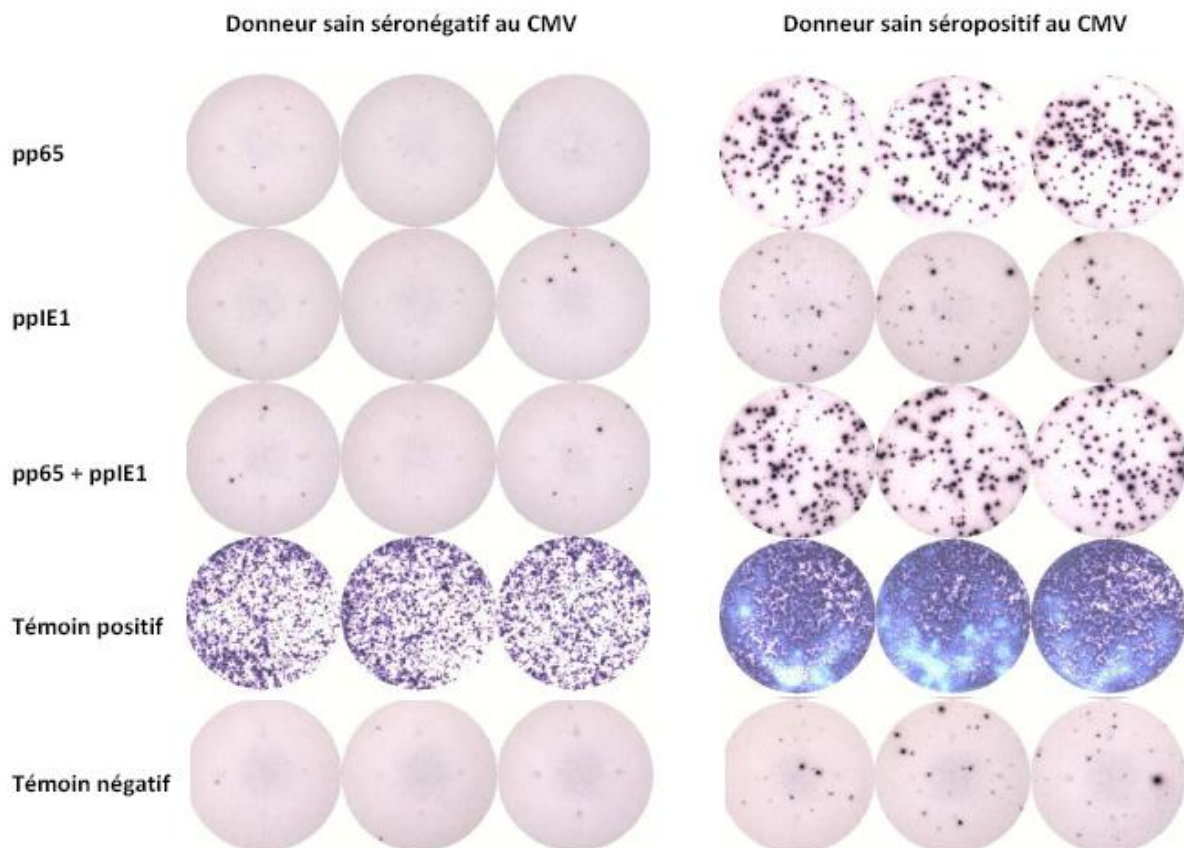
## Etude de la réponse anti CMV *in vitro* par ELISpot et validation de la technique

Dans un premier temps nous avons validé la technique ELISpot sur des donneurs « sains ». Pour cela nous avons séparé des cellules mononuclées du sang périphérique par un buffy coat et par densité sur Ficoll puis congélation. Nous avons testé six donneurs sains trois d'entre eux étant séronégatifs au CMV et les trois autres séropositifs. Nous avons d'abord évalué la réponse avec 250.000 cellules par puits et de tester cinq conditions : PBMC+pp65, PBMC+ppIE1, PBMC+pp65+ppIE1, PBMC+ anticorps anti-CD3 (constituant le témoin positif) et les PBMC non stimulés comme témoin négatif. La figure XXVIII présente l'ELISpot des PBMC provenant de deux donneurs sains, l'un séronégatif et l'autre séropositif au CMV, dans ces cinq conditions.



**Figure XXVII : Production d'IFN $\gamma$  par des PBMC provenant de deux donneurs sains GG, l'un séronégatif (à gauche) et l'autre séropositif au CMV (à droite) stimulés ou non par des peptides du CMV.** Dans chaque puits a été déposé 250.000 PBMC et elles ont été traitées selon cinq conditions : avec le polypeptide CMV pp65, le polypeptide ppIE1, les deux polypeptides, l'anticorps anti-CD3 (témoin positif) et laissées seules (témoin négatif). Chaque condition est réalisée en triplicata.

La figure nous XXVII montre que témoins positif et négatif sont corrects. De plus, comme on peut le voir que parmi les cellules provenant du donneur séropositif pour le CMV, seules celles mises en contact avec les peptides de ce virus ont secrétés de l'IFN $\gamma$  en quantité significative. Cela nous permet de vérifier la spécificité de la stimulation et le faible bruit de fond de la technique. Par ailleurs nous observons que le patient séronégatif pour le CMV n'a que très peu de spots détectable, confirmant que cette technique permet surtout de d'évaluer la réponse chez des patients qui ont été exposés au CMV antérieurement donc essentiellement la réponse des cellules mémoires. En revanche, le nombre de cellules par puits chez le patient séropositif est beaucoup trop important et ne permet pas de dénombrer de façon fiable le nombre de spots. Il s'est avéré que 150.000 cellules par puits permettaient un dénombrement fiable des spots avec les différents peptides du CMV (figure XXVIII).



**Figure XXVIII : Production d'IFN $\gamma$  par des PBMC provenant de deux donneurs sains, l'un séronégatif (à gauche) et l'autre séropositif au CMV (à droite) stimulés ou non par des peptides du CMV.** Dans chaque puits a été déposé 150.000 PBMC et elles ont été traitées selon cinq conditions : avec le polypeptide CMV pp65, le polypeptide ppIE1, les deux polypeptides, l'anticorps anti-CD3 (témoin positif) et laissées seules (témoin négatif). Chaque condition est réalisée en triplicata.

## **Etude clinique cas-témoin de la réponse anti CMV *in vitro* chez des patients greffés rénaux R+ homozygotes AA appariés à des patients GG**

Pour cette étude cas témoin, nous avons inclus uniquement des porteurs des allèles à l'état homozygotes pour maximiser la probabilité de révéler une différence sur un petit nombre de patients. Comme il a été montré par d'autres auteurs que la persistance à long terme de l'infection à CMV provoquait l'accumulation LT CD8 anti CMV présentant des altérations fonctionnelles (Fletcher 2005, Li 2007, Streblow 2007), nous avons concentré notre analyse sur les patients infectés avant greffe (R+) soit longtemps avant notre analyse pour permettre une accumulation importante de clones anti CMV dysfonctionnels. Enfin, pour accroître l'efficacité de l'étude, nous avons effectué un appariement individuel sur les variables cliniques susceptibles d'influencer la réponse immunitaire anti-CMV, comme décrit dans la section des méthodes. Ainsi, nous avons inclus tous les patients R+ encore suivis dans notre unité de transplantation et qui étaient homozygotes AA (n=7), puis chaque patient AA a été apparié à deux patients de génotype GG et nous avons mesuré le niveau de la réponse anti CMV *in vitro* par ELISpot dans une étude cas-contrôle. En raison de leur grand nombre, tous les critères d'appariement n'ont pas été totalement respectés. Ainsi, 4 patients présentent un critère de correspondance qui n'a pas été atteint : l'âge au moment de la greffe pour un patient, la prise d'inhibiteur de la calcineurine au moment de la transplantation pour 2 patients et l'année de transplantation pour 1 patient.

### **Caractéristiques démographiques de la population étudiée**

Les principales caractéristiques de la population étudiée sont présentées dans le tableau XII. Il s'agit d'une population de patients transplantés rénaux divisée en deux groupes égaux selon le génotype du gène *PDCD-1*. Sept patients homozygotes pour la forme sauvage AA ont formé le premier groupe, tandis que le deuxième groupe était constitué des 14 patients homozygotes GG. L'âge moyen à la greffe était de 54 +/-14 ans dans le groupe homozygote GG et 52 +/-11 ans dans le groupe homozygote AA (p=0,97). La durée de suivi au moment du prélèvement diffère légèrement entre les deux groupes (6,5 vs 8,6 ans ; p=0,43), la même proportion de patients dans chaque groupe avaient reçu des GAL (57 %). Le groupe étudié est composé d'un trio de patients présentant la sérologie CMV D+R+ et 6 trios D-R+. Malgré les

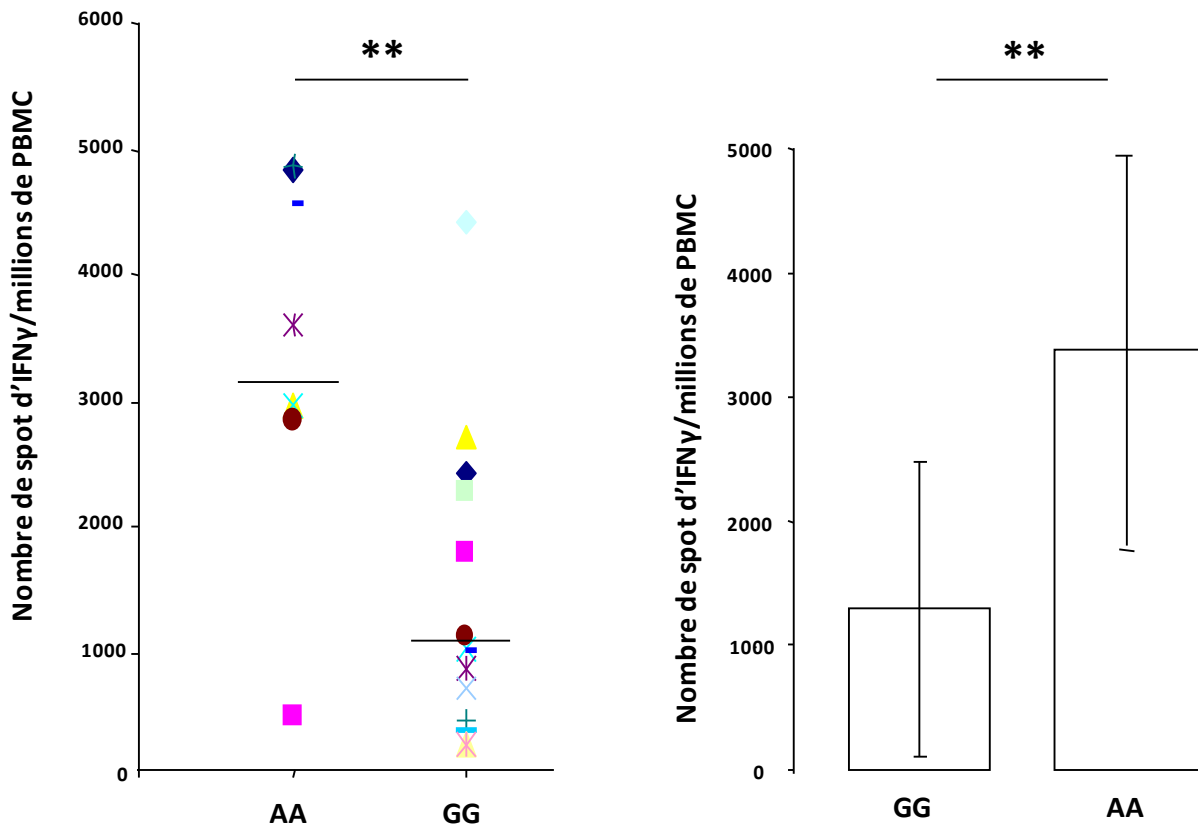
variations observées, aucune différence n'est statistiquement vérifiée pour les traitements immunosuppresseur d'entretien pris par les patients AA et GG au moment du prélèvement. De la même façon, le nombre de cellules CD4+ et CD8+ n'est pas statistiquement différent entre les deux groupes de patients (p=0,41 et p=0,57 respectivement).

<b>Données cliniques <sup>a</sup></b>	<b>GG n=14</b>	<b>AA n=7</b>	<b>p<sup>b</sup></b>
<b>Caractéristiques du receveur</b>			
Age moyen ± ET (années)	54 ± 14	52 ± 11	0.97
Maladie rénale initiale			
Diabète (%)	-	1 (14)	0.71
Glomérulonéphrite (%)	1 (7)	1 (14)	0.79
Polykystose rénale (%)	5 (36)	2 (28)	0.87
Autres (%)	8 (57)	3 (43)	0.88
<b>Caractéristiques de la greffe</b>			
Traitement immunosuppresseur durant les 3 mois			
Globulines anti-lymphocytaire en induction (%)	8 (57)	4 (57)	0.64
Inhibiteurs de la calcineurine (%)	14 (100)	5 (72)	0.19
Azathioprine (%)	1 (7)	2 (29)	0.51
Rapamycine (%)	-	1 (14)	0.72
Mycophénolate mofétil (%)	13 (93)	5 (72)	0.51
Globulines anti-récepteur à l'II-2 (%)	6 (43)	3 (43)	0.64
Statut CMV des donneurs et receveurs (%)			
D+R+	2 (14)	1 (14)	0.51
D-R+	12 (86)	6 (86)	0.51
Rang de greffe >1 (%)	3 (21)	-	0.51
Moyenne de MM HLA AB ± ET	3 ± 0.96	3.2 ± 0.75	0.57
Moyenne de MM HLA DR ± ET	1.5 ± 0.65	1.1 ± 0.9	0.38
<b>Caractéristiques lors du prélèvement sanguin</b>			
Moyenne de suivie au prélèvement ± ET (années)	6.5 ± 4	8.6 ± 7	0.43
Traitement immunosuppresseur d'entretien			
Inhibiteurs de la calcineurine (%)	12 (85)	5 (72)	0.84
Azathioprine (%)	1 (7)	-	0.72
Rapamycine (%)	1 (7)	1 (14)	0.79
Corticoïdes (%)	10 (70)	4 (57)	0.87
Mycophénolate mofétil (%)	12 (86)	6 (86)	0.51
Numération Formule Sanguine			
Lymphocytes totaux moyen ± ET (/mm3)	1262 ± 443	1481 ± 766	0.47
Sous population CD8+ moyenne ± ET (/mm3)	429 ± 136	510 ± 289	0.57
Sous population CD4+ moyenne ± ET (/mm3)	541 ± 287	707 ± 451	0.41
<b>Evènements cliniques durant la période de suivi</b>			
Antigénémie CMV-positif durant la 1ère année (%)	6 (43)	1 (14)	0.41
Maladie à CMV (%)	-	-	-
Rejet aigüe (%)	4 (28)	1 (14)	0.86

**Tableau XII : Principales caractéristiques de la population de l'étude cas-contrôle.** La colonne de gauche représente les patients homozygotes sauvages GG et la colonne de droite les patients homozygotes variant AA. <sup>a</sup> Les données sont représentées en pourcentage ou moyenne ± l'écart type (ET). <sup>b</sup> Le test du Khi<sup>2</sup> est utilisé pour les données quantitatives et le test statistique de Mann-Whitney pour les données numériques.

Au sein de la population homozygote AA, le nombre moyen de spots après stimulation antigénique était de 3344±1556/millions de PBMC alors que le nombre de spot dans le groupe homozygote GG était 2,6 fois plus faible, 1295±1192 spots/millions de PBMC. Le nombre de

lymphocytes T réactifs à la stimulation antigénique était donc significativement plus élevé dans le groupe AA que dans le groupe GG (figure XXVIII,  $p=0,004$ ).



**Figure XXIX: Les patients homozygotes AA ont un nombre de cellules T produisant de l'IFN $\gamma$  en réponse à CMV-pp65 supérieur à celui des patients GG ( $p=0,004$ ).** Le graphe de gauche représente les résultats pour tous les couples de patients exprimés en nombre de spot par million de PBMC en réponse à une stimulation antigénique pp65 de 24h chez deux groupes de patients transplantés rénaux appariés l'un homozygote GG l'autre homozygote AA pour le SNP du gène *PDCDI*. Chaque barre représente les résultats pour un couple de patients appariés selon les critères définis précédemment. L'histogramme de droite représente les valeurs moyennes avec les écarts type pour chaque groupe de patients en fonction du génotype. Test statistique de Mann and Withney. \* $p=0,004$ .

## **DISCUSSION / CONCLUSION**

## DISCUSSION / CONCLUSION

Actuellement, l'impact du CMV sur la fonction rénale à long terme n'est pas clairement défini et reste très controversé. En effet, de nombreux facteurs influent sur la survie du greffon rendant difficile l'imputabilité des événements liés au CMV, comme par exemple l'augmentation de l'incidence de l'infection latente à CMV avec l'âge. De même, des études antérieures réalisées chez des patients transplantés préconisaient une surveillance sanguine pour détecter la réactivation du CMV alors qu'il est maintenant reconnu que les interactions entre les tissus de l'hôte et les virus chroniques sont organes spécifiques. Ce phénomène est bien illustré au cours de l'infection par l'herpès virus murin G-68. Le système immunitaire de l'hôte détruit les virions présents au niveau sanguin tandis qu'au sein des autres tissus il n'arrive pas à les éliminer efficacement (Dal Canto, 2001). Enfin, la réactivation de l'infection à CMV est connue pour être transitoire et non homogène au sein de l'organe. Or, il n'est pas possible de réaliser des biopsies répétées, séquentielles et de grandes tailles des organes chez les patients.

C'est en transplantation rénale que la controverse est la plus importante. Une étude épidémiologique par Schnitzler et al. a indiqué que l'infection latente à CMV chez le donneur est un facteur de risque de perte du greffon à 2 ans post-greffe chez les R- uniquement (Schnitzler *et al.*, 2003). De même, une autre étude a révélé que les patients D+R+ présentaient une plus faible survie de l'allogreffe rénale à 3 ans que les patients D+R-. Cependant, cet effet observé en analyse univariée et il disparaît après ajustement sur l'âge du donneur (Johnson *et al.*, 2009).

Au début de notre travail, nous avons posé l'hypothèse que des facteurs propres de l'hôte pouvaient moduler les effets à long terme de l'infection à CMV chez les patients transplantés, et nous avons ainsi choisi de déterminer l'impact de l'infection à CMV du donneur sur la survie du greffon rénal et d'identifier les facteurs de l'hôte qui pourraient moduler ce risque infectieux. Grâce à la cohorte de patients transplantés rénaux de 1985 à 2008 à Tours (n=1279), nous avons pu rapporter que l'infection à CMV latente chez le donneur est un facteur de risque indépendant de la perte de greffe rénale, en particulier chez les patients R+.

Nous pouvons déjà remarquer que nos résultats sont en concordance avec d'autres études épidémiologiques récentes. En effet, ces travaux décrivent le CMV latent, en

particulier celui du donneur, comme un facteur de risque indépendant de l'échec de greffe à long terme (van Ree *et al.*, 2011), (Killonen, 2005), allant même à révéler une infection à CMV associée à l'allogreffe chronique néphropathie (Liapis *et al.*, 2003).

Il est intéressant de noter que les effets indirects du CMV sont plus graves et fréquents chez les patients D+R+ que chez les patients D+R- qui sont moins exposés au CMV. En effet, une étude récente basée sur une cohorte de 125 patients transplantés rénaux décrit que l'infection à CMV du receveur n'est pas systématique lorsque des greffons séropositifs au CMV sont reçus par des patients séronégatifs à ce virus (Christmas, 2009). De la même façon, nos résultats suggèrent que les patients R+ sont plus sensibles aux conséquences néfastes de la transplantation de reins infectés par le CMV latent que les patients R-. Par conséquent, nous nous sommes concentrés sur le groupe de receveurs séropositifs au CMV.

Les greffons provenant de donneurs séropositifs au CMV sont associés à un risque élevé de survenue d'antigénémie à CMV chez les receveurs R+, cependant, le risque accru de perte du greffon est indépendant de la virémie à CMV. Récemment, deux équipes ont démontré que les reins provenant de donneurs séropositif au CMV augmentent le risque de virémie chez les receveurs quelque soit leur sérotype (R-/R+) (Erdbruegger *et al.*, 2011) (Hughes *et al.*, 2008). Néanmoins nous avons décrit qu'un épisode d'antigénémie positive à CMV n'est pas prédictif de la perte du greffon ce qui est en accord avec les travaux de Sagedal. En effet il a été décrit que l'infection et/ou la maladie à CMV, survenue durant les 100 jours post-transplantation, ne sont pas des facteurs de risques indépendants de la perte du greffon rénal en mort-censurée, cependant, ils réduisent de manière significative la perte du greffon, mort non-censurée (Sagedal *et al.*, 2004). Enfin, comme nous avons pu le relater dans nos résultats, les patients D+R+Ag- présente un risque relatif de perte du greffon plus important, de ce fait, l'antigénémie à CMV ne paraît pas être un bon marqueur de la réplication virale intra-greffon sur le long terme.

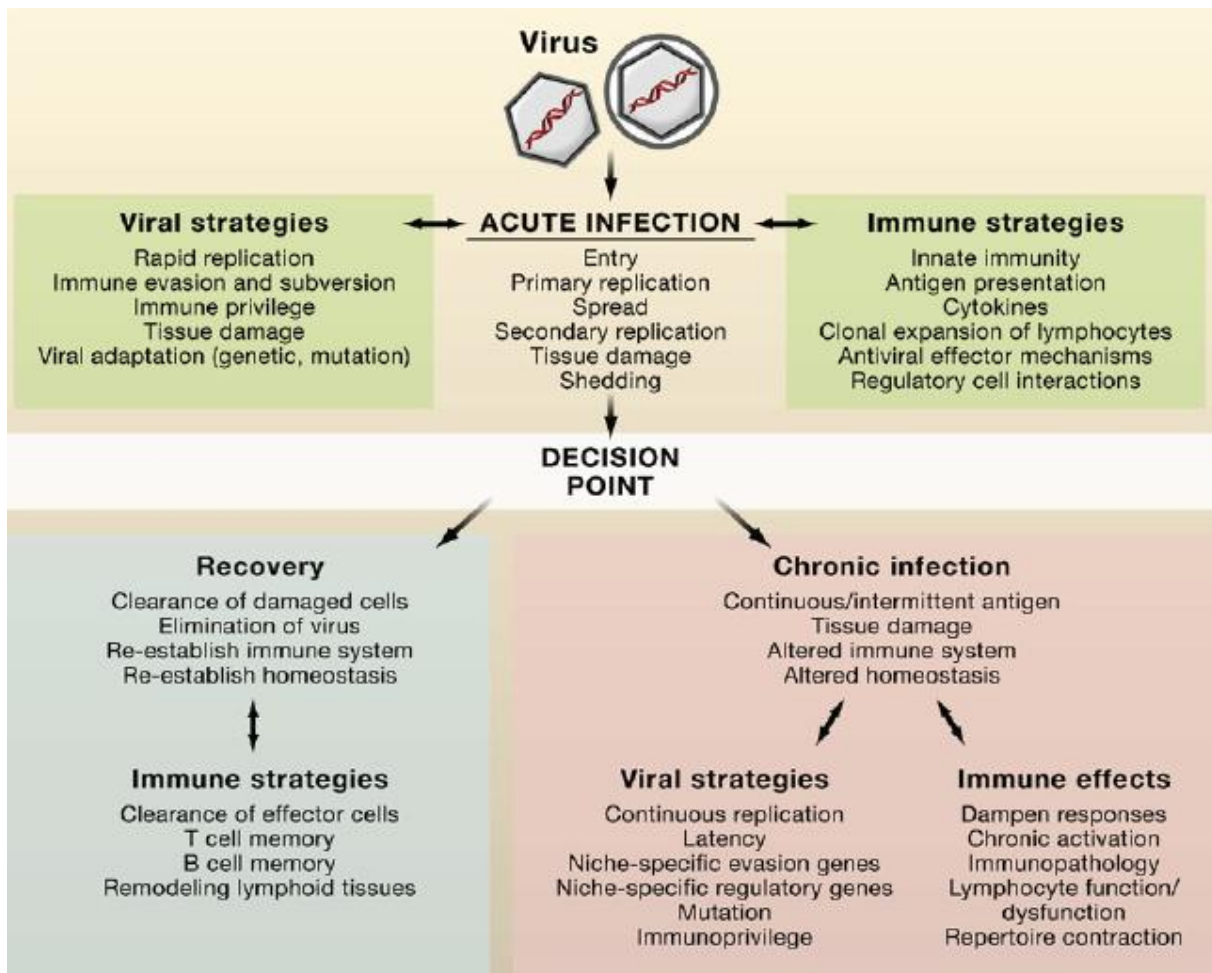
L'ensemble de ces données suggèrent que la transplantation d'un organe D+ apporte une charge virale supplémentaire difficilement prise en charge par le receveur R+. Nous savons que l'antigénémie n'est pas corrélée avec la réplication in situ du CMV. De plus nous avons démontré que le risque de perte de greffon des reins D+ est plus important chez les patients qui ne font pas d'antigénémie (Ag-) versus ceux qui en font (Ag+).

Ces observations nous permettent de poser plusieurs hypothèses : les patients qui ne développent pas d'antigénémie ne stimulent pas suffisamment leur réponse immunitaire et,



par conséquent, ils maîtrisent moins bien la réplication à long terme ou alors cela est dû au fait que les patients qui ne font pas d'antigénémie n'ont jamais reçu d'antiviraux contrairement aux patients Ag+.

Si le risque d'infection aiguë sévère est plus grande pour les patients R- recevant un greffon CMV-séropositif, (réduit efficacement par prophylaxie médicamenteuse) que les R+, nos résultats suggèrent qu'en revanche, les patients R- pourraient avoir un meilleur contrôle sur les infections chroniques. Ce constat met en évidence que les infections aiguës et chroniques présentent des processus pathogéniques distincts avec des règles différentes pour l'agent pathogène et pour l'hôte comme décrit dans la figure XXX (Virgin *et al.*, 2009).



**Figure XXX: Les possibilités d'une infection virale (Virgin, 2009).** Lorsqu'un virus infecte un organisme hôte, il se met en place une phase de « non-équilibre initiale » de l'infection aiguë. Pendant cette phase, les stratégies virales et immunitaires sont en concurrence pour la domination de l'organisme. En supposant que l'hôte survit, un point de décision est atteint au cours duquel l'infection est soit éliminée soit elle devient chronique. Ce point de décision peut être atteint très tôt dans

l'infection par des virus qui peuvent établir une infection latente et dans ce cas, l'infection est permanente quel que soit l'issue de l'infection aiguë. Si l'infection est éradiquée, le système immunitaire doit se réinitialiser en détruisant l'antigène et en permettant le rétablissement de l'homéostasie immunitaire. Si l'équilibre penche vers une infection chronique, de nouvelles stratégies virales et immunitaires de l'hôte interagissent pour définir un équilibre métastable dans laquelle la réplication virale est tenue en échec, mais le virus n'est pas éliminé.

Les résultats discutés ci-dessus suggèrent que la réponse anti-CMV des cellules CD8+ peut jouer un rôle dans la perte du greffon lié au CMV. En effet, il a été précédemment rapporté que le CMV étant un virus très immunogène, une fraction importante du répertoire CD8 lui était consacrée et que de ce fait il contribuait à la mise en place de la sénescence des cellules immunitaires (Khan *et al.*, 2004).

A 2 ans post-transplantation, les patients D+R+ ne développent pas leur nombre de cellules CD8+ en réponse au CMV de manière aussi efficace que les D-R-. Ainsi, la taille du « compartiment » des cellules T CD8+ pourrait être corrélée avec la réponse anti-CMV. Le type de cellules anti-CMV est déterminant dans le contrôle de la réplication virale (Simon *et al.*, 2006) et l'infection à CMV induit chez les sujets atteints une accumulation massive de cellules anti-CMV spécifiques (Khan *et al.*, 2004) (Mattes *et al.*, 2008). Aussi nous avons analysé l'ensemble des cellules T circulantes en fonction du statut sérologique CMV des donneurs et receveurs ainsi qu'en fonction de l'apparition d'une antigénémie positive à ce virus. Nos résultats démontrent que pour tous les patients, le CMV a un impact important et durable sur l'ensemble des cellules CD8+ circulantes mais ne semble pas avoir d'effet sur les cellules CD4+ ou les cellules NK. La littérature est très riche en ce qui concerne la réponse immunitaire anti-CMV en transplantation d'organe solide, cependant, notre étude clinique est la première à mettre en avant, à partir d'un aussi grand nombre de patients (n=414), l'association entre l'évolution du « compartiment » des cellules T CD8+ à long terme et la survie des greffons rénaux en fonction des statuts sérologiques CMV des donneurs et receveurs. De plus, il est intéressant de noter que parmi les patients qui ont développé une antigénémie positive post-greffe, seuls patients R- présentent une forte augmentation de leur « compartiment » cellulaire CD8+, au moins jusqu'à 2 ans suivant la transplantation, par rapport aux patients R+. Cette observation suggère la possibilité d'un épuisement clonal chez les patients R+ infectés depuis plus longtemps ce qui pourrait limiter la capacité de contrôler la réplication du CMV à long terme.

L'impact de l'épuisement clonal sur le contrôle de la réplication virale chronique est bien connu (Virgin *et al.*, 2009, Wherry, 2011) et bien que l'épuisement des cellules T anti-CMV spécifiques soit discuté, plusieurs études rapportent leur affaiblissement sur le long

terme, spécialement chez les individus infectés âgés et chez les patients transplantés (Mattes *et al.*, 2008, Ouyang *et al.*, 2003) (Hadrup *et al.*, 2006) (Antoine *et al.*, 2012, Fletcher *et al.*, 2005). Par exemple, Hadrup et son équipe (Hadrup *et al.*, 2006) ont pu démontrer que le nombre de cellules T CD8<sup>+</sup> anti-CMV spécifiques chez les individus nonagénaires est plus important que chez les individus d'âge mûrs. Cependant, le ratio de cellules fonctionnelles chez ces patients âgés est significativement plus faible laissant supposer un épuisement clonal. De même, un autre travail décrit le CMV comme induisant un large répertoire de clone CD4<sup>+</sup> par rapport à d'autres virus comme l'EBV, l'HSV ou encore le virus du zona, et suggère l'implication d'une molécule sécrétée favorisant la différenciation au cours de l'infection (Fletcher *et al.*, 2005). Cette étude propose l'IFN $\alpha$  comme molécule candidate. Fletcher a ainsi démontré que cette cytokine était produite en grande quantité par des cellules dendritiques stimulées par le CMV. De plus, l'IFN $\alpha$  induit une perte des récepteurs de co-stimulation et une inhibition des télomérases au sein des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Par conséquent, ces cellules CMV-spécifiques chez le sujet âgé voient leurs capacités répliquatives très limitées. Une étude plus récente a indiqué que la protéine PD-1 (programmed cell-death 1, cruciale dans la mise en place de l'épuisement clonal viro-induit) est présente en plus grand nombre à la surface des cellules T CD8<sup>+</sup> CMV spécifiques qu'à la surface des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de la grippe ou encore naïves (Quigley *et al.*, 2010).

L'impact de la perte des cellules CMV-spécifiques lors du dysfonctionnement chronique du greffon a été peu étudié (Labalette) et la plupart des travaux réalisés sur la réponse immunitaire anti-CMV, est basé sur de petites cohortes de patients ne permettant pas d'évaluer de manière fiable la survie des greffons à long terme. Au sein de notre cohorte importante (n=1279), nous avons pu mettre en évidence que l'affaiblissement du « compartiment » cellulaire CD8<sup>+</sup> augmente le risque de perte du greffon chez les patients exposés à CMV. Notre étude est la première à rapporter l'évolution individuelle du « compartiment » cellulaire CD8<sup>+</sup> et à souligner l'association entre l'épuisement des cellules T CMV-spécifiques et la survie des greffons à long terme.

Au sein de cette étude, nous avons aussi pu mettre en évidence certains facteurs de risques de dégradation de la fonction rénale. Le contrôle de la réplication virale du CMV au sein des tissus repose sur le recrutement de cellules compétentes et spécifiques, notamment les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> anti-CMV (Simon *et al.*, 2006)Walter EA 1995) qui, pour la plupart, sont restreints aux molécules de HLA de classe I exprimées par les cellules présentatrices

d'antigène du receveur du fait de l'éducation intrathymique. Nous avons émis l'hypothèse que l'interaction entre les cellules T CD8<sup>+</sup> anti-CMV du receveur et les cellules infectées par le CMV du donneur pouvaient être entravée par l'absence de compatibilité HLA entre donneur et receveur (quatre mésappariement entre les antigènes HLA-A et-B). En effet, selon nos résultats, c'est lors d'un mésappariement complet du HLA I que le facteur de risque de perte du greffon est majeur pour les patients recevant un rein D<sup>+</sup>. Un mésappariement partielle serait donc bénéfique pour les patients D<sup>+</sup>R<sup>+</sup>. L'ensemble de ces données confirme indirectement l'effet à long terme présumé de la réplication du CMV comme cause de dysfonctionnement rénal chronique. Ces observations sont en concordance avec un article très récent (Shabir *et al.*, 2013) qui suggère que l'allogreffe de reins D<sup>+</sup> fortement désapparié avec les HLA I du receveur rend impossible la réponse anti-CMV des cellules CD8<sup>+</sup>.

De même, la forte diminution du nombre de cellules T CD8<sup>+</sup> observée reste associée à un risque accru de perte du greffon chez les 113 patients R<sup>+</sup> qui ont reçu des globulines anti-lymphocytaires. Il est intéressant de rappeler qu'à contrario, nous avons pu démontrer qu'une diminution du nombre de cellules CD8<sup>+</sup> supérieure à 40% n'a aucune incidence sur la survie du greffon chez les patients D<sup>-</sup>R<sup>-</sup>, ce qui nous indique que la réduction au sein du « compartiment » cellulaire n'est pas, par elle-même, associée à une moins bonne survie du greffon. Par conséquent, il serait possible que l'évolution du nombre de cellules CD8<sup>+</sup> chez les patients transplantés rénaux puisse être un marqueur de la réponse immunitaire anti-CMV et sa diminution pourrait prédire des effets néfastes sur la survie du greffon.

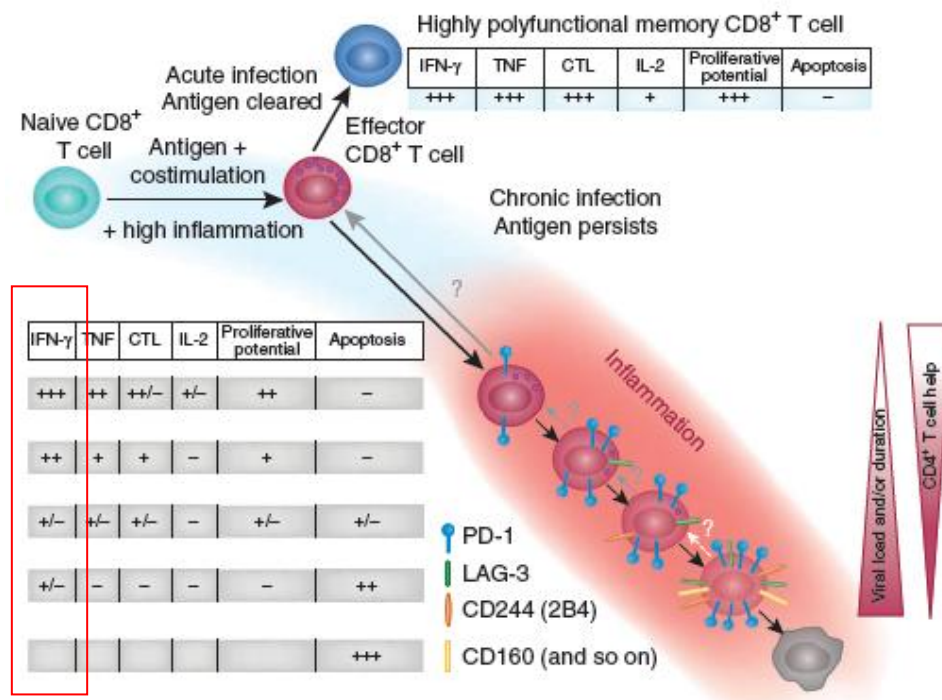
En résumé, la présence de CMV latent au sein des transplants (D<sup>+</sup>) est un facteur de risque indépendant de la perte des greffons rénaux, d'autant plus si le patient receveur est lui-même infecté par le CMV (R<sup>+</sup>) et si le mésappariement HLA entre donneur et receveur est total. Le virus latent au sein des greffons D<sup>+</sup> possède également un effet fort et durable sur le long terme sur le « compartiment » cellulaire CD8<sup>+</sup> dépendant du statut sérologique CMV du receveur. Enfin, la diminution du nombre de cellules T CD8<sup>+</sup> post transplantation associé au CMV est un facteur de risque important de la mise en place du dysfonctionnement chronique de l'allogreffe rénale.

Ce premier axe d'étude nous a amené à nous demander si des facteurs de risques génétiques associés au CMV pouvaient participer à la perte du greffon. De ce fait, notre second axe de recherche se focalise sur le SNP présent au sein du gène *PDCDI* codant pour la

protéine PD-1 décrite comme étant majeure dans l'échappement virale ainsi que dans la mise en place de l'épuisement clonal.

Il est apparu que le CMV murin une fois l'hôte infecté, utilise la cellule dendritique afin d'échapper aux cellules du système immunitaire de la souris (Benedict 2008). Le virus va sur-exprimer la protéine PD-L1 à la surface des cellules dendritiques faisant ainsi pencher la balance vers les signaux de co-inhibition et empêcher l'activation des lymphocytes. Cette stratégie d'échappement viral montre à quel point les souches du CMV sont très adaptés à leur espèce hôte. Aujourd'hui, les connaissances sur les stratégies d'adaptation et de détournement cellulaire du CMV humain ne sont pas encore bien connues.

La protéine PD-1 a aussi été décrite par Wherry (Wherry *et al.*, 2003) Sharpe 2007, (Wherry, 2011) comme étant un élément clé de la mise en place de l'épuisement clonal. En effet, comme il est démontré sur la figure XXXI, plus les cellules progressent vers l'épuisement clonal, plus elles vont présenter la protéine PD-1 à leur surface et moins elles seront capables de produire de l'IFN $\gamma$ .



**Figure XXXI : Modèle d'épuisement clonale hiérarchique lors d'une infection virale chronique (Wherry, 2011).** Durant une infection chronique, la rencontre répétée entre les cellules T spécifique et l'antigène conduit au phénomène d'épuisement clonal. Plus le stade de l'épuisement clonal est avancé, moins les cellules T sont capables de produire de l'IFN $\gamma$  et plus les lymphocytes présentent à leur surface la protéine de co-inhibition PD-1.

De manière intéressante, Bertias a décrit l'impact du polymorphisme PD-1.3 sur l'expression et la fonction de la protéine PD-1 chez des patients de Lupus systémique érythromateux (Bertias *et al.*, 2009). A travers les techniques de cytométrie en flux et d'immunohistochimie, ils ont pu évaluer la prolifération et la production de cytokine en fonction du polymorphisme (GG homozygote sauvage et AA homozygote variant). Il s'avère que dans cette étude, l'allèle A confère une diminution de l'activité transcriptionnelle et de l'inhibition de la production d'IFN $\gamma$  au sein des cellules.

Nos résultats ont d'abord été obtenus chez des patients transplantés rénaux à Tours et, à partir de l'ensemble de la cohorte (n=1120), nous avons pu observer que les patients porteurs de l'allèle A du SNP PD1.3 ont une meilleure survie des greffons et que cette association est encore plus forte lorsque les patients reçoivent le rein d'un donneur séropositif au CMV (D+) quelque soit la période de transplantation. De plus, ces observations faites à partir d'analyses univariées ont été confirmées après ajustement sur l'âge des donneurs, le mésappariement HLA, les traitements immunosuppresseurs par une analyse multivariée. Il est intéressant de noter que cette association n'est pas retrouvée au sein de la population D-, que ce soit parmi les patients D-R+ ou D-R-. Ainsi à nouveau, les effets sont maximums pour les patients qui reçoivent un greffon D+ comme nous l'avons constaté grâce à l'étude clinique.

De la même façon nous avons retrouvé une forte association entre le polymorphisme PD-1.3 et deux facteurs de risques de perte du greffon rénal précédemment cités : les globulines anti-lymphocytaires (GAL) et le mésappariement HLA entre les donneurs et receveurs. En effet, nos résultats démontrent que pour les patients homozygotes sauvage GG ayant reçu un rein D+ et des globulines anti-lymphocytaires, la survie des greffons en mort censurée et dramatiquement faible par rapport aux patients porteurs de l'allèle A. Selon notre hypothèse, les patients GG présenteraient une plus grande difficulté à maîtriser la réplication du virus au sein du greffon par rapport au patients possédant l'allèle variant A. Cette hypothèse associée aux GAL favoriserait donc la réplication du CMV au sein du greffon pouvant conduire à la perte du greffon.

En ce qui concerne les molécules de HLA de classe I, nous avons pu observer que le mésappariement total entre le donneur et le receveur protège contre les effets délétères d'une greffe de rein d'un donneur D+ pour les patients porteurs de l'allèle variant A. Lors de l'étude clinique, nous avons mis en évidence qu'un mésappariement total des molécules de HLA I était délétère pour les patients recevant un rein D+ et notre hypothèse suggérait que l'absence de reconnaissance de ces molécules entre donneur et receveur ne permettait pas une bonne

maîtrise de la réplication virale au sein du greffon. Pour l'étude du polymorphisme PD-1.3, nous nous sommes focalisé sur cette population D+. Et c'est au sein de ce groupe de patients que nous avons mis en évidence l'association bénéfique entre la présence de l'allèle variant A et une meilleure survie des greffons pour les patients recevant un rein D+ et présentant un mésappariement partiel de leurs molécules HLA I entre donneur et receveur. Ainsi, dans le cas d'une transplantation de rein D+, le polymorphisme du gène *PDCDI* n'a pas d'effet lorsque les molécules de HLA I sont totalement désappariées, la reconnaissance ne pouvant se faire entre les cellules du donneur et du receveur. Par contre, lorsque le mésappariement n'est pas total, une reconnaissance cellulaire est possible et par conséquent une prise en charge de la réponse immunitaire anti-CMV. C'est à ce moment qu'intervient l'association avec le SNP PD-1.3 décrivant les patients porteurs de l'allèle A comme ayant une meilleure survie de leur greffon. Ces résultats suggèrent une réponse possiblement plus épuisée chez les patients qui ne présente pas un mésappariement HLA AB total entre donneur et receveur pour les patients D+.

La transplantation pulmonaire est une discipline récente moins souvent sollicitée que la transplantation rénale. Aussi, notre cohorte de patients transplantés pulmonaires regroupe un nombre moins important de patients. Cependant, nous avons pu établir que notre cohorte ne présente pas de biais par rapport aux caractéristiques de la transplantation pulmonaire décrites dans le rapport annuel 2011 de l'agence de biomédecine. De part sa composition multicentrique, extérieur au centre de transplantation de Tours et de part son type de transplantation différent de la greffe rénal, notre groupe de patients transplantés pulmonaires est une bonne cohorte de validation des résultats observées au sein de notre cohorte monocentrique tourangelle de patients transplantés rénaux.

Ainsi, nous avons pu confirmer l'apport bénéfique que confère l'allèle variant A aux patients recevant une transplantation. En effet, à nouveau l'allèle A du SNP de PD-1.3 est associée à une meilleure survie des patients transplantés pulmonaires et cette association est encore plus forte lorsque le greffon provient d'un donneur séropositif au CMV (D+). Il n'existe pas de biais lié au centre de transplantation étant donné que les profils des Kaplan-Meier sont identiques lorsque l'on sépare les patients transplantés à l'hôpital européen Georges Pompidou des patients greffés au centre hospitalier de FOCH.

Nos résultats ont d'abord été obtenus chez des patients transplantés rénaux puis reproduits chez des patients bénéficiaires d'une greffe pulmonaire, et nous avons pu observer

que les risques instantanés, ou *hazard ratio*, étaient similaires conférant ainsi une forte crédibilité à cette association clinique. Très peu d'études d'association dans le domaine de transplantation d'organe ont vu leurs résultats reproduits au sein d'une cohorte de validation, et nous sommes les premiers à répliquer nos observations au sein de deux groupes de patients transplantés par deux types d'organes différents. L'absence d'association entre le polymorphisme PD-1.3 et la survie des greffons chez les patients D-R- suggère que le CMV joue un rôle crucial dans l'effet observé.

Etudier la taille des « compartiments » cellulaires nous a permis d'évaluer à quel point le polymorphisme PD-1.3 pouvait être lié à l'épuisement clonal et donc au devenir du greffon. Tout d'abord, nous avons démontré que chez les patients D+, l'apparition d'une antigénémie positive au CMV durant la première année était un facteur déterminant de l'augmentation du « compartiment » cellulaire CD8+ à deux ans post-transplantation. Puis nous avons pu constater que les patients D+ porteurs de l'allèle variant A présentaient une numération cellulaire CD8+ plus importante que les patients D+ GG et cette observation est à nouveau absente chez les patients D-R-. Cette constatation appuie l'hypothèse que l'ensemble de ces résultats est lié à la présence du CMV. De même, le résultat obtenu avec l'étude cas-témoin présente les patients homozygotes AA comme possédant un plus grand nombre de cellules T productrices d'IFN $\gamma$  en réponse à une stimulation par le peptide pp65 du CMV par rapport aux patients GG. Cela laisse suggérer que les porteurs de l'allèle A auraient une réponse cellulaire T anti-CMV plus robuste.

L'ensemble de ces résultats est d'une part compatible avec une augmentation de l'activité de la protéine PD-1 au sein des cellules T CMV-spécifiques chez les patients homozygotes GG mais il permet aussi d'étayer l'hypothèse selon laquelle les patients porteurs de l'allèle A seraient plus résistants à la « fatigue » occasionnée par le CMV sur les cellules immunitaires que leurs homologues GG. Les patients porteurs de l'allèle A conserveraient alors une forte capacité à contrôler la réplication virale au sein des greffons. Cette hypothèse peut ainsi expliquer la diminution de l'incidence de perte du greffon associé au CMV chez les patients porteurs de l'allèle A.

Il est intéressant de noter que l'association entre l'allèle variant A et la survie des greffons est plus importante chez les patients D+R+ que chez les patients D+R-. Les patients D+R+ ont été infectés antérieurement à la transplantation ce qui suggère chez le receveur une diminution de la capacité des cellules anti-CMV-spécifiques à contrôler les effets chroniques du CMV. Alors que pour les patients D+R-, infecté plus récemment lors de la transplantation, les cellules sont beaucoup moins avancées dans le processus d'épuisement clonal.



Jusqu'à aujourd'hui, la surveillance du CMV chez les patients était limitée à du court terme (au cours de la première année) afin de prévoir prioritairement les effets directs du virus traduit par la survenue d'une virémie ou d'une maladie à CMV (Egli *et al.*, 2012). Le lien supposé entre la réponse immunitaire anti-CMV-spécifique et l'échec de l'allogreffe associée au CMV nécessiterai de surveiller préférentiellement l'évolution du « compartiment » cellulaire CD8<sup>+</sup> sur le long terme au lieu d'évaluer la réplication virale qui reste un marqueur transitoire. Cependant, l'impact de la réponse immunitaire anti-CMV-spécifique de l'hôte sur la modulation de l'effet néfaste à long terme du CMV n'est pas connu.

Un autre travail réalisé au sein de notre laboratoire a déjà reporté que les patients R<sup>+</sup> porteurs de l'allèle variant A du SNP PD-1.3 présentaient un risque plus élevé de développer une antigénémie à CMV suite à la transplantation d'organe (Hoffmann *et al.*, 2010). Ces travaux peuvent paraître difficiles à concilier avec nos résultats de recherche actuels. Cependant, il est important de souligner que l'étude précédente était réalisée uniquement chez les patients R<sup>+</sup> alors que nos travaux centrent exclusivement les patients D<sup>+</sup>. De plus, dans ces travaux de thèse, nous avons démontré que le risque de perte du greffon chez les patients recevant un rein D<sup>+</sup> était indépendant de l'antigénémie à CMV et la survenue d'une antigénémie n'a aucun effet sur la survie des greffons en particuliers chez les patients D<sup>+</sup>R<sup>+</sup> (Gatault *et al.*, 2013).

L'ensemble des travaux exposés ici renforcent l'idée que le CMV joue un rôle important dans le dysfonctionnement de l'allogreffe sur le long terme. Le lien entre le CMV et le dysfonctionnement de l'allogreffe chronique n'est pas uniformément observée au sein des cohortes de patients transplantés que ce soit en greffe rénale comme pulmonaire, et reste ainsi incompris malgré les nombreuses études sur le sujet (Baron *et al.*, 2010). Plusieurs raisons peuvent contribuer à la mise en place d'incohérences entre travaux notamment les facteurs intrinsèques liés à la biologie du virus. En effet, la réactivation du CMV au sein d'un tissu constitue une micro-infection localisée. Elle est transitoire et peut être dispersée laissant ainsi de nombreuses cicatrices histologiques durables et non spécifiques. De plus, un faible taux de réactivation du virus au sein du greffon peut être fréquent et passer facilement inaperçu, surtout si le CMV sort de latence après la première année post-transplantation. Ainsi, les stratégies basées sur l'analyse de la réplication virale locale risquent de conduire à des erreurs d'interprétation sans mettre en évidence le rôle réel du CMV. Les effets du CMV sur la fonction des greffons à long terme pourraient donc être sous-estimés et nécessiteraient une étude plus approfondie, notamment afin d'identifier les patients à risques.

Au terme de ces travaux de thèse, les mécanismes biologiques permettant d'expliquer l'association entre le SNP du gène *PDCDI* et l'épuisement clonal des cellules T ne sont pas encore clairement définis. Le SNP PD-1.3 est localisé dans une région non-codante du gène et comme le sont beaucoup de SNP, il pourrait influencer l'expression du génome. L'allèle A a été associé à une diminution de l'expression du gène *PDCDI* ainsi qu'à une diminution de l'inhibition de la production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes (Bertsias *et al.*, 2009) ce qui est cohérent avec nos résultats obtenus par ELISpot, les patients homozygotes AA ont présenté un nombre plus important de cellules productrices d'IFN $\gamma$  en réponse à une stimulation par des peptides du CMV.

La différence observée dans le nombre de cellules productrices d'IFN $\gamma$  entre les patients homozygotes variant AA et ceux homozygotes sauvages GG peut sembler faible par rapport à la force de l'association entre les SNP PD-1.3 et la survie des greffons. Cependant, la seule autre étude ayant analysé l'expression du gène *PDCDI* au sein de tissus rapporte d'une part que plus la charge virale augmente, plus l'expression du gène *PDCDI* augmente et d'autre part qu'il existe une distribution différente de cette expression génique en fonction des tissus (Blackburn *et al.*, 2010). En effet, les auteurs ont retrouvés une expression plus importante du gène *PDCDI* intra-rénal par rapport au sang suggérant ainsi une avancée plus grande dans l'épuisement clonal au niveau du rein infectés. Or, nous avons pu observer à travers les travaux de Wherry, les différentes étapes de l'épuisement clonal et plus les cellules franchissent ces stades, plus elles vont présenter de protéine PD-1 à leur surface et moins elles seront capables de produire de l'IFN $\gamma$  (Wherry, 2011). Enfin, les greffons peuvent être plus souvent sujet à la réactivation virale du fait de l'inflammation local (Hummel & Abecassis, 2002) par rapport aux organes natifs. De ce fait, les épisodes de réactivations fréquentes associées à l'altération des cellules immunitaires induites par les traitements immunosuppresseurs pourraient accélérer la mise en place de l'épuisement clonal et par conséquent l'altération des fonctions cellulaires comme la production de cytokines. Par conséquent, la faible différence dans le nombre de cellules CMV-spécifiques productrices d'IFN $\gamma$  entre les patients GG et AA pourrait refléter une différence beaucoup plus importante dans l'efficacité des cellules anti-CMV, augmenté par la répétition d'épisodes de réactivation et l'ensemble conduirait à l'accélération de la mise en place de la dysfonction du greffon. Nos travaux sont les premiers à suggérer l'impact de l'épuisement clonale induits par le CMV sur l'évolution clinique des effets chroniques liés à CMV chez les patients transplantés.

Il est important de noter que notre étude présente un sous-groupe de patients transplantés doté d'une forte protection génétique contre le rejet de greffe associé au CMV. Cette constatation pourrait encourager la réflexion sur la conception d'études cliniques futures dans l'adaptation individuelle des stratégies de prévention du CMV et dans les critères de distribution des organes en fonction du génotype du patient. Il serait aussi intéressant d'évaluer si une association existe entre ce SNP et d'autres virus établissant une infection chronique (HIV, HBV, HVC...).

En résumé, ces travaux de thèse identifient pour la première fois le SNP PD-1.3 comme étant un facteur de risque génétique fort de la perte associée au CMV du greffon rénale, et qui a été confirmé par la réplication de l'étude au sein d'une cohorte de patients transplantés pulmonaires. De plus, nos résultats suggèrent un lien entre ce SNP et l'épuisement de la réponse immunitaire anti-CMV spécifique et mettent en avant l'importance de la physiopathologie liée au CMV sur l'association clinique observée. Suite à des recherches approfondies sur la réponse cellulaire CMV-spécifiques en fonction du SNP, ces résultats pourraient améliorer la stratégie de prise en charge des patients afin de diminuer les effets indirects liés au CMV qui continuent, encore actuellement, à limiter le succès de la transplantation d'organes à long terme.

# Bibliographie

## Ouvrages imprimés

WATSON James, BAKER T., BELL S., GANN A., LEVINE M., LOSICK R. *Biologie moléculaire du gène*. Paris : Pearson Education, 2009, 688.

KINDT Thomas J., GOLDSBY R. A., OSBORNE B. A. *Immunologie*. Paris : DUNOD, 2008, 684.

TILNEY Nicholas L., STROM T. B., LEENDERT C. P. *Transplantation Biology : Cellular and Molecular Aspects*. Philadelphia - New York : Lippincott-Raven, 1996, 740.

GIBSON, MUSE. *Précis de Génomique*. Bruxelles : De Boeck, 2004, 347.

DARDEL F., KEPES F. *Bioinformatique génomique et post-génomique*. Palaiseau : Les éditions de l'école polytechnique, 2006, 246.

## Travaux universitaires

HOFFMANN, Thomas. *Association entre polymorphisme de gènes de l'immunité et événements cliniques post-transplantation rénale*. Sciences de la vie et de la Santé, Université François-Rabelais de TOURS, 15 septembre 2009, 210.

JOMPHE, Valérie. *Comparaison de la puissance de tests de déséquilibre de liaison dans les études génétiques*. Faculté des sciences et de génie, Université Laval, QUEBEC, 2006, 107.

## Sites web consultés

Agence de Biomédecine, consulté en septembre 2012, (retrouver l'adresse)

## Articles de périodiques électroniques

Allam S. R., Kruger B., Mehrotra A., Schiano T., Schroppel B. & Murphy B. (2013) The association of il28b polymorphism and graft survival in patients with hepatitis c undergoing liver transplantation. *PLoS One*, 8(1), e54854

Antoine P., Olislagers V., Huygens A., Lecomte S., Liesnard C., Donner C. & Marchant A. (2012) Functional exhaustion of cd4+ t lymphocytes during primary cytomegalovirus infection. *J Immunol*, 189(5), 2665-72

Avery R. K. (2007) Ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease in heart transplant recipients: The dilemma of donor-positive/recipient-negative serostatus. *Clin Infect Dis*, 45(4), 448-9

Baron C., Forconi C. & Lebranchu Y. (2010) Revisiting the effects of cmv on long-term transplant outcome. *Curr Opin Organ Transplant*, 15(4), 492-8

Benedict C. A., Loewendorf A., Garcia Z., Blazar B. R. & Janssen E. M. (2008) Dendritic cell programming by cytomegalovirus stunts naive t cell responses via the pd-11/pd-1 pathway. *J Immunol*, 180(7), 4836-47

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

Blackburn S. D., Crawford A., Shin H., Polley A., Freeman G. J. & Wherry E. J. (2010) Tissue-specific differences in pd-1 and pd-11 expression during chronic viral infection: Implications for cd8 t-cell exhaustion. *J Virol*, 84(4), 2078-89

Cairn J., Yek T., Banner N. R., Khaghani A., Hodson M. E. & Yacoub M. (2003) Time-related changes in pulmonary function after conversion to tacrolimus in bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant*, 22(1), 50-7

Carstens J., Andersen H. K., Spencer E. & Madsen M. (2006) Cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis*, 8(4), 203-12

- Chen D. H., Jiang H., Lee M., Liu F. & Zhou Z. H. (1999) Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology*, 260(1), 10-6
- Chmiel C., Speich R., Hofer M., Michel D., Mertens T., Weder W. & Boehler A. (2008) Ganciclovir/valganciclovir prophylaxis decreases cytomegalovirus-related events and bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Clin Infect Dis*, 46(6), 831-9
- Cook C. H., Bickerstaff A. A., Wang J. J., Zimmerman P. D., Forster M. R., Nadasdy T., Colvin R. B., Hadley G. A. & Orosz C. G. (2009) Disruption of murine cardiac allograft acceptance by latent cytomegalovirus. *Am J Transplant*, 9(1), 42-53
- Cottin V. & Cordier J. F. (2006) [idiopathic pulmonary fibrosis]. *Rev Prat*, 56(11), 1165-71
- Couetil J. P., Tolan M. J., Grousset A., Benaim D., Sapoval M., Hernigou A., Coppens P., Fayolle P. & Carpentier A. (1997) Experimental bilateral lobar lung transplantation and its application in humans. *Thorax*, 52(8), 714-7
- Couzi L., Helou S., Bachelet T., Moreau K., Martin S., Morel D., Lafon M. E., Boyer B., Alain S., Garrigue I. & Merville P. (2012) High incidence of anticytomegalovirus drug resistance among d+r- kidney transplant recipients receiving preemptive therapy. *Am J Transplant*, 12(1), 202-9
- Crough T. & Khanna R. (2009) Immunobiology of human cytomegalovirus: From bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*, 22(1), 76-98, Table of Contents
- Demeritt I. B., Milford L. E. & Yurochko A. D. (2004) Activation of the nf-kappab pathway in human cytomegalovirus-infected cells is necessary for efficient transactivation of the major immediate-early promoter. *J Virol*, 78(9), 4498-507
- Derom F., Barbier F., Ringoir S., Versieck J., Rolly G., Berzsenyi G., Vermeire P. & Vrints L. (1971) Ten-month survival after lung homotransplantation in man. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 61(6), 835-46
- Echlin D. R., Tae H. J., Mitin N. & Taparowsky E. J. (2000) B-atf functions as a negative regulator of ap-1 mediated transcription and blocks cellular transformation by ras and fos. *Oncogene*, 19(14), 1752-63

Egli A., Humar A. & Kumar D. (2012) State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: A primer for the clinician. *Clin Infect Dis*, 55(12), 1678-89

Erdbruegger U., Scheffner I., Mengel M., Schwarz A., Verhagen W., Haller H. & Gwinner W. (2011) Impact of cmv infection on acute rejection and long-term renal allograft function: A systematic analysis in patients with protocol biopsies and indicated biopsies. *Nephrol Dial Transplant*, 27(1), 435-43

Estenne M., Maurer J. R., Boehler A., Egan J. J., Frost A., Hertz M., Mallory G. B., Snell G. I. & Yousem S. (2002) Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: An update of the diagnostic criteria. *J Heart Lung Transplant*, 21(3), 297-310

Fadili W., Habib Allah M. & Laouad I. (2013) Chronic renal allograft dysfunction: Risk factors, immunology and prevention. *Arab J Nephrol Transplant*, 6(1), 45-50

Ferlicot S., Durrbach A., Ba N., Desvaux D., Bedossa P. & Paradis V. (2003) The role of replicative senescence in chronic allograft nephropathy. *Hum Pathol*, 34(9), 924-8

Ferreiros-Vidal I., D'alfonso S., Papasteriades C., Skopouli F. N., Marchini M., Scorza R., Migliaresi S., Sebastiani G. D., Endreffy E., Mavromati M., Kappou-Rigatou I., Ruzickova S., Dostal C., Schmidt R. E., Witte T., Gomez-Reino J. J. & Gonzalez A. (2007) 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*, 8(2), 138-46

Fletcher J. M., Vukmanovic-Stejcic M., Dunne P. J., Birch K. E., Cook J. E., Jackson S. E., Salmon M., Rustin M. H. & Akbar A. N. (2005) Cytomegalovirus-specific cd4+ t cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion. *J Immunol*, 175(12), 8218-25

Frazer K. A., Ballinger D. G., Cox D. R., Hinds D. A., Stuve L. L., Gibbs R. A., Belmont J. W., Boudreau A., Hardenbol P., Leal S. M., Pasternak S., Wheeler D. A., Willis T. D., 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., Zhou J., Gabriel S. B., Barry R., Blumenstiel B., Camargo A., Defelice M., Faggart M., Goyette M., Gupta S., Moore J., Nguyen H., Onofrio R. C., 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., Sun W., Wang H., Wang Y., Xiong X., Xu L., Waye M. M., Tsui S. K., Xue H., Wong J. T., Galver L. M., Fan J. B., Gunderson K., Murray S. S., Oliphant A. R., Chee M. S., Montpetit A., Chagnon F., Ferretti V., Leboeuf M., Olivier J. F., Phillips M. S., Roumy S., Sallee C., Verner A., Hudson T. J., Kwok P. Y., Cai D., Koboldt D. C., Miller R. D., Pawlikowska L., Taillon-Miller P., Xiao M., Tsui L. C., Mak W., Song Y. Q., Tam P. K., Nakamura Y., Kawaguchi T., Kitamoto T., Morizono T., Nagashima A., Ohnishi Y., Sekine A., Tanaka T., Tsunoda T., et al. (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million snps. *Nature*, 449(7164), 851-61

Freeman R. B., Jr. (2009) The 'indirect' effects of cytomegalovirus infection. *Am J Transplant*, 9(11), 2453-8

Gamadia L. E., Rentenaar R. J., Baars P. A., Remmerswaal E. B., Surachno S., Weel J. F., Toebes M., Schumacher T. N., Ten Berge I. J. & Van Lier R. A. (2001) Differentiation of cytomegalovirus-specific cd8(+) t cells in healthy and immunosuppressed virus carriers. *Blood*, 98(3), 754-61

Gatault P., Halimi J. M., Forconi C., Thibault G., Barbet C., Merieau E., Gaudy-Graffin C., Marliere J. F., Goudeau A., Bruyere F., Lebranchu Y., Buchler M. & Baron C. (2013) Cmv infection in the donor and increased kidney graft loss: Impact of full hla-i mismatch and posttransplantation cd8 cell reduction. *Am J Transplant*, 13(8), 2119-29

Glinsky G. V. (2006) Integration of hapmap-based snp pattern analysis and gene expression profiling reveals common snp profiles for cancer therapy outcome predictor genes. *Cell Cycle*, 5(22), 2613-25

Gottlieb J., Szangolies J., Koehnlein T., Golpon H., Simon A. & Welte T. (2008) Long-term azithromycin for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation*, 85(1), 36-41

Hadrup S. R., Strindhall J., Kollgaard T., Seremet T., Johansson B., Pawelec G., Thor Straten P. & Wikby A. (2006) Longitudinal studies of clonally expanded cd8 t cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality and an increased number of dysfunctional cytomegalovirus-specific t cells in the very elderly. *J Immunol*, 176(4), 2645-53

Hammond S. P., Martin S. T., Roberts K., Gabardi S., Fuhlbrigge A. L., Camp P. C., Goldberg H. J., Marty F. M. & Baden L. R. (2012) Cytomegalovirus disease in lung



transplantation: Impact of recipient seropositivity and duration of antiviral prophylaxis. *Transpl Infect Dis*, 15(2), 163-70

Hardy J. D., Webb W. R., Dalton M. L., Jr. & Walker G. R., Jr. (1963) Lung homotransplantation in man. *JAMA*, 186(1065-74

Hayes D., Jr. (2011) A review of bronchiolitis obliterans syndrome and therapeutic strategies. *J Cardiothorac Surg*, 6(92

Hayes D., Jr., Zwischenberger J. B. & Mansour H. M. (2010) Aerosolized tacrolimus: A case report in a lung transplant recipient. *Transplant Proc*, 42(9), 3876-9

Helanterä I., Koskinen P., Finne P., Loginov R., Kyllönen L., Salmela K., Gronhagen-Riska C. & Lautenschlager I. (2006) Persistent cytomegalovirus infection in kidney allografts is associated with inferior graft function and survival. *Transpl Int*, 19(11), 893-900

Hoffmann T. W., Halimi J. M., Buchler M., Velge-Roussel F., Goudeau A., Al-Najjar A., Marliere J. F., Lebranchu Y. & Baron C. (2010) Association between a polymorphism in the human programmed death-1 (pd-1) gene and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *J Med Genet*, 47(1), 54-8

Hughes D., Hafferty J., Fulton L., Friend P., Devaney A., Loke J., Welsh K. I., Handa A. & Klenerman P. (2008) Donor and recipient cmv serostatus and antigenemia after renal transplantation: An analysis of 486 patients. *J Clin Virol*, 41(2), 92-5

Humar A. & Snyderman D. (2009) Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*, 9 Suppl 4(S78-86

Hummel M. & Abecassis M. M. (2002) A model for reactivation of cmv from latency. *J Clin Virol*, 25 Suppl 2(S123-36

Hummel M., Zhang Z., Yan S., Deplaen I., Golia P., Varghese T., Thomas G. & Abecassis M. I. (2001) Allogeneic transplantation induces expression of cytomegalovirus immediate-early genes in vivo: A model for reactivation from latency. *J Virol*, 75(10), 4814-22

Iannone M. A., Taylor J. D., Chen J., Li M. S., Rivers P., Slentz-Kesler K. A. & Weiner M. P. (2000) Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry. *Cytometry*, 39(2), 131-40

Inkinen K., Soots A., Krogerus L., Loginov R., Bruggeman C. & Lautenschlager I. (2005) Cytomegalovirus enhance expression of growth factors during the development of chronic allograft nephropathy in rats. *Transpl Int*, 18(6), 743-9

Johansson M., Arlestig L., Moller B. & Rantapaa-Dahlqvist S. (2005) Association of a pcd1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 52(6), 1665-9

Johansson I., Martensson G. & Andersson R. (2010) Cytomegalovirus and long-term outcome after lung transplantation in gothenburg, sweden. *Scand J Infect Dis*, 42(2), 129-36

Johnson R. J., Clatworthy M. R., Birch R., Hammad A. & Bradley J. A. (2009) Cmv mismatch does not affect patient and graft survival in uk renal transplant recipients. *Transplantation*, 88(1), 77-82

Kastelijjn E. A., Van Moorsel C. H., Ruven H. J., Lammers J. W. & Grutters J. C. (2012) Genetic polymorphisms and bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation: Promising results and recommendations for the future. *Transplantation*, 93(2), 127-35

Kerem E., Reisman J., Corey M., Canny G. J. & Levison H. (1992) Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 326(18), 1187-91

Khan N., Hislop A., Gudgeon N., Cobbold M., Khanna R., Nayak L., Rickinson A. B. & Moss P. A. (2004) Herpesvirus-specific cd8 t cell immunity in old age: Cytomegalovirus impairs the response to a coresident ebv infection. *J Immunol*, 173(12), 7481-9

Kim S. J., Varghese T. K., Zhang Z., Zhao L. C., Thomas G., Hummel M. & Abecassis M. (2005) Renal ischemia/reperfusion injury activates the enhancer domain of the human cytomegalovirus major immediate early promoter. *Am J Transplant*, 5(7), 1606-13

Kroner A., Mehling M., Hemmer B., Rieckmann P., Toyka K. V., Maurer M. & Wiendl H. (2005) A pd-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 58(1), 50-7

Li L., Chaudhuri A., Weintraub L. A., Hsieh F., Shah S., Alexander S., Salvatierra O., Jr. & Sarwal M. M. (2007) Subclinical cytomegalovirus and epstein-barr virus viremia are

associated with adverse outcomes in pediatric renal transplantation. *Pediatr Transplant*, 11(2), 187-95

Liapis H., Storch G. A., Hill D. A., Rueda J. & Brennan D. C. (2003) Cmv infection of the renal allograft is much more common than the pathology indicates: A retrospective analysis of qualitative and quantitative buffy coat cmv-pcr, renal biopsy pathology and tissue cmv-pcr. *Nephrol Dial Transplant*, 18(2), 397-402

Mattes F. M., Vargas A., Kopycinski J., Hainsworth E. G., Sweny P., Nebbia G., Bazeos A., Lowdell M., Klenerman P., Phillips R. E., Griffiths P. D. & Emery V. C. (2008) Functional impairment of cytomegalovirus specific cd8 t cells predicts high-level replication after renal transplantation. *Am J Transplant*, 8(5), 990-9

Nielsen C., Hansen D., Husby S., Jacobsen B. B. & Lillevang S. T. (2003) Association of a putative regulatory polymorphism in the pd-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens*, 62(6), 492-7

Oetting W. S., Zhu Y., Brott M. J., Matas A. J., Corder G. K. & Pan W. (2011) Validation of genetic variants associated with early acute rejection in kidney allograft transplantation. *Clin Transplant*, 26(3), 418-23

Ouyang Q., Wagner W. M., Wikby A., Walter S., Aubert G., Dodi A. I., Travers P. & Pawelec G. (2003) Large numbers of dysfunctional cd8+ t lymphocytes bearing receptors for a single dominant cmv epitope in the very old. *J Clin Immunol*, 23(4), 247-57

Paraskeva M., Bailey M., Levvey B. J., Griffiths A. P., Kotsimbos T. C., Williams T. P., Snell G. & Westall G. (2011) Cytomegalovirus replication within the lung allograft is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant*, 11(10), 2190-6

Parry R. V., Chemnitz J. M., Frauwirth K. A., Lanfranco A. R., Braunstein I., Kobayashi S. V., Linsley P. S., Thompson C. B. & Riley J. L. (2005) Ctla-4 and pd-1 receptors inhibit t-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*, 25(21), 9543-53

Pascual J., Alonso A., Burgos D., Cruzado J. M. & Seron D. (2012) Chronic renal dysfunction in kidney transplant recipients. Consensus document. Spanish consensus group on renal dysfunction in kidney transplantation patients. *Nefrologia*, 32 Suppl 2(1-28)

Patterson G. A., Cooper J. D., Goldman B., Weisel R. D., Pearson F. G., Waters P. F., Todd T. R., Scully H., Goldberg M. & Ginsberg R. J. (1988) Technique of successful clinical double-lung transplantation. *Ann Thorac Surg*, 45(6), 626-33

Pereyra F. & Rubin R. H. (2004) Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis*, 17(4), 357-61

Prokunina L., Castillejo-Lopez C., Oberg F., Gunnarsson I., Berg L., Magnusson V., Brookes A. J., Tentler D., Kristjansdottir H., Grondal G., Bolstad A. I., Svenungsson E., Lundberg I., Sturfelt G., Jonssen A., Truedsson L., Lima G., Alcocer-Varela J., Jonsson R., Gyllensten U. B., Harley J. B., Alarcon-Segovia D., Steinsson K. & Alarcon-Riquelme M. E. (2002) A regulatory polymorphism in *pdc1* is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet*, 32(4), 666-9

Prokunina L., Gunnarsson I., Sturfelt G., Truedsson L., Seligman V. A., Olson J. L., Seldin M. F., Criswell L. A. & Alarcon-Riquelme M. E. (2004) The systemic lupus erythematosus-associated *pdc1* polymorphism *pd1.3a* in lupus nephritis. *Arthritis Rheum*, 50(1), 327-8

Quigley M., Pereyra F., Nilsson B., Porichis F., Fonseca C., Eichbaum Q., Julg B., Jesneck J. L., Brosnahan K., Imam S., Russell K., Toth I., Piechocka-Trocha A., Dolfi D., Angelosanto J., Crawford A., Shin H., Kwon D. S., Zupkosky J., Francisco L., Freeman G. J., Wherry E. J., Kaufmann D. E., Walker B. D., Ebert B. & Haining W. N. (2010) Transcriptional analysis of hiv-specific cd8+ t cells shows that pd-1 inhibits t cell function by upregulating *batf*. *Nat Med*, 16(10), 1147-51

Reynaud-Gaubert M. (2003) [pathophysiology of obliterative bronchiolitis in lung transplants]. *Rev Mal Respir*, 20(2 Pt 1), 224-32

Rubin R. H. (1989) The indirect effects of cytomegalovirus infection on the outcome of organ transplantation. *Jama*, 261(24), 3607-9

Sagedal S., Hartmann A., Nordal K. P., Osnes K., Leivestad T., Foss A., Degre M., Fauchald P. & Rollag H. (2004) Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int*, 66(1), 329-37

Salvadori M., Rosati A., Di Maria L., Becherelli P., Moscarelli L., Bandini S., Piperno R., Larti A., Gallo M. & Bertoni E. (2005) Immunosuppression in renal transplantation: Viral diseases and chronic allograft nephropathy. *Transplant Proc*, 37(6), 2500-1

Schnitzler M. A., Lowell J. A., Hardinger K. L., Boxerman S. B., Bailey T. C. & Brennan D. C. (2003) The association of cytomegalovirus sero-pairing with outcomes and costs following cadaveric renal transplantation prior to the introduction of oral ganciclovir cmv prophylaxis. *Am J Transplant*, 3(4), 445-51

Sester U., Presser D., Dirks J., Gartner B. C., Kohler H. & Sester M. (2008) Pd-1 expression and il-2 loss of cytomegalovirus- specific t cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *Am J Transplant*, 8(7), 1486-97

Shabir S., Kaul B., Pachnio A., Banham G. D., Smith H., Chand S., Jham S., Harper L., Ball S., Rahbar A., Soderberg-Naucler C., Moss P. & Borrows R. (2013) Impaired direct priming of cd8 t cells by donor-derived cytomegalovirus following kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*,

Sharpe A. H., Wherry E. J., Ahmed R. & Freeman G. J. (2007) The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*, 8(3), 239-45

Shin H., Blackburn S. D., Blattman J. N. & Wherry E. J. (2007) Viral antigen and extensive division maintain virus-specific cd8 t cells during chronic infection. *J Exp Med*, 204(4), 941-9

Simon C. O., Holtappels R., Tervo H. M., Bohm V., Daubner T., Oehrlein-Karpi S. A., Kuhnappel B., Renzaho A., Strand D., Podlech J., Reddehase M. J. & Grzimek N. K. (2006) Cd8 t cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. *J Virol*, 80(21), 10436-56

Soroceanu L., Akhavan A. & Cobbs C. S. (2008) Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature*, 455(7211), 391-5

Streblow D. N., Orloff S. L. & Nelson J. A. (2007) Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus. *Curr Opin Immunol*, 19(5), 577-82

Sylwester A. W., Mitchell B. L., Edgar J. B., Taormina C., Pelte C., Ruchti F., Sleath P. R., Grabstein K. H., Hosken N. A., Kern F., Nelson J. A. & Picker L. J. (2005) Broadly targeted human cytomegalovirus-specific cd4+ and cd8+ t cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med*, 202(5), 673-85

Theodore J., Starnes V. A. & Lewiston N. J. (1990) Obliterative bronchiolitis. *Clin Chest Med*, 11(2), 309-21

Thomas L. D., Milstone A. P., Miller G. G., Loyd J. E. & Stephen Dummer J. (2009) Long-term outcomes of cytomegalovirus infection and disease after lung or heart-lung transplantation with a delayed ganciclovir regimen. *Clin Transplant*, 23(4), 476-83

Valantine H. A. (2004) The role of viruses in cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant*, 4(2), 169-77

Van Leeuwen E. M., De Bree G. J., Ten Berge I. J. & Van Lier R. A. (2006) Human virus-specific cd8+ t cells: Diversity specialists. *Immunol Rev*, 211(225-35)

Van Ree R. M., De Vries A. P., Zelle D. M., De Vries L. V., Oterdoom L. H., Gans R. O., Schouten J. P., Lems S. P., Van Son W. J. & Bakker S. J. (2011) Latent cytomegalovirus infection is an independent risk factor for late graft failure in renal transplant recipients. *Med Sci Monit*, 17(11), CR609-617

Varani S. & Landini M. P. (2011) Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. *Herpesviridae*, 2(1), 6

Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., Smith H. O., Yandell M., Evans C. A., Holt R. A., Gocayne J. D., Amanatides P., Ballew R. M., Huson D. H., Wortman J. R., Zhang Q., Kodira C. D., Zheng X. H., Chen L., Skupski M., Subramanian G., Thomas P. D., Zhang J., Gabor Miklos G. L., Nelson C., Broder S., Clark A. G., Nadeau J., Mckusick V. A., Zinder N., Levine A. J., Roberts R. J., Simon M., Slayman C., Hunkapiller M., Bolanos R., Delcher A., Dew I., Fasulo D., Flanigan M., Florea L., Halpern A., Hannenhalli S., Kravitz S., Levy S., Mobarry C., Reinert K., Remington K., Abu-Threideh J., Beasley E., Biddick K., Bonazzi V., Brandon R., Cargill M., Chandramouliswaran I., Charlab R., Chaturvedi K., Deng Z., Di Francesco V., Dunn P., Eilbeck K., Evangelista C., Gabrielian A. E., Gan W., Ge W., Gong F., Gu Z., Guan P., Heiman T. J., Higgins M. E., Ji R. R., Ke Z., Ketchum K. A., Lai Z., Lei Y., Li Z., Li J., Liang Y., Lin X., Lu F., Merkulov G.

V., Milshina N., Moore H. M., Naik A. K., Narayan V. A., Neelam B., Nusskern D., Rusch D. B., Salzberg S., Shao W., Shue B., Sun J., Wang Z., Wang A., Wang X., Wang J., Wei M., Wides R., Xiao C., Yan C., et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507), 1304-51

Virgin H. W., Wherry E. J. & Ahmed R. (2009) Redefining chronic viral infection. *Cell*, 138(1), 30-50

Wherry E. J. (2011) T cell exhaustion. *Nat Immunol*, 12(6), 492-9

Wherry E. J., Blattman J. N., Murali-Krishna K., Van Der Most R. & Ahmed R. (2003) Viral persistence alters cd8 t-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol*, 77(8), 4911-27

Womer K. L., Vella J. P. & Sayegh M. H. (2000) Chronic allograft dysfunction: Mechanisms and new approaches to therapy. *Semin Nephrol*, 20(2), 126-47

Zhang J. Y., Zhang Z., Jin B., Zhang S. Y., Zhou C. B., Fu J. L. & Wang F. S. (2008a) Cutting edge: Programmed death-1 up-regulation is involved in the attrition of cytomegalovirus-specific cd8+ t cells in acute self-limited hepatitis b virus infection. *J Immunol*, 181(6), 3741-4

Zhang Z., Kim S. J., Varghese T., Thomas G., Hummel M. & Abecassis M. (2008b) Tnf receptor independent activation of the cytomegalovirus major immediate early enhancer in response to transplantation. *Transplantation*, 85(7), 1039-45

## Annexes



# Annexe 1 : Courrier du CPP de Tours



## Comité de Protection des Personnes TOURS - Région Centre - Ouest 1 <http://cpp.med.univ-tours.fr>

**Dr Philippe BERTRAND**  
Président ☎ 02-47-47-80-79  
E-mail : [bertrand@med.univ-tours.fr](mailto:bertrand@med.univ-tours.fr)  
**Mme Anne OULES**  
Vice-Présidente ☎ 02-47-47-82-25  
**Mme Marie-Pierre ADAM**  
Secrétaire Générale ☎ 02-54-23-33-10  
**Mme Catherine ROUSSEL**  
Secrétaire Générale ☎ 02-47-47-97-89  
**M. Jean-Louis GIRAULT**  
Trésorier ☎ 02-47-39-44-08  
**Secrétariat Administratif**  
Mme Gaëlle BENHARRAT  
Tél. : 02-47-47-82-21  
Fax : 02-47-47-84-39  
E-Mail : [cpp@med.univ-tours.fr](mailto:cpp@med.univ-tours.fr)

**Madame Catherine FORCONI**  
**Université François Rabelais**  
**E4245 - Cellules dendritiques et greffes**

Tours, le 11 mars 2010

Madame,

Nous avons bien reçu la nouvelle version de votre protocole intitulé « *Genetic polymorphism and clinical outcome after lung transplantation* ». Il s'agit toujours de la version n° 1 du 10/02/2010.

Concernant le formulaire de consentement et la lettre d'information, il est nécessaire d'être beaucoup plus spécifique sur le type de caractérisation génétique que vous avez l'intention de faire.

S'agissant d'un simple dosage sur des prélèvements déjà effectués (utilisation secondaire d'échantillons biologiques), et sous réserve du consentement éclairé et spécifique du patient, ce protocole ne nécessite pas l'avis du CPP.

Respectueusement.

Le Président

Docteur Philippe BERTRAND

## Annexe 2 : Formulaire de consentement

Recherche de Facteurs génétiques influençant le devenir des greffes pulmonaires.

J'ai été informé(e) de la nature et des objectifs des analyses proposées. J'ai reçu une lettre d'information explicative.

J'accepte l'analyse de mon ADN pour la recherche exclusivement.

J'accepte que l'échantillon ainsi que les résultats, soient conservés au laboratoire du Pr Lebranchu, dans le respect du secret médical.

Je sais que je peux refuser ces analyses sans en indiquer les raisons et sans que cela n'influence la qualité des soins que je recevrai.

Je pourrai à tout moment demander des informations complémentaires au médecin qui me propose ces analyses.

Date :

Nom et prénom du ou de la patiente

Nom et prénom du médecin

Signature du ou de la patiente

signature du médecin

## Annexe 3 : Lettre informative

But de l'étude : analyser des facteurs génétiques influençant le devenir des greffes pulmonaires.

Madame, Monsieur

Ce document est destiné à vous apporter des informations sur l'étude à laquelle votre médecin vous a demandé de participer.

### **Justification de l'étude**

Vous avez reçu une greffe pulmonaire. La survie à long terme du greffon est conditionnée en partie par la nature de la réponse du système immunitaire du receveur spécifiquement dirigée contre le greffon. Les traitements immunosuppresseurs que vous prenez quotidiennement ont pour but de contrôler cette réponse mais exposent aussi à un risque accru d'infections. Nous disposons à ce jour d'assez peu de moyens pour évaluer le risque individuel de perte de greffon ou de survenue d'infection. Evaluer plus précisément ce risque pourrait être capital dans le futur afin de mieux adapter la stratégie thérapeutique à chaque patient.

### **Présentation de quelques notions génétiques de base.**

Chaque cellule d'un organisme vivant renferme dans son noyau de l'ADN qui consiste en une chaîne d'acides nucléiques paraissant dans un ordre donné appelé séquence. Cet ADN est le support moléculaire codant pour l'information génétique à l'origine des caractéristiques physiques, biochimiques de l'organisme. Un gène est un morceau de cet ADN qui est traduit en une protéine spécifique. Un gène codant pour une protéine donnée peut avoir une séquence identique chez tous les individus d'une même espèce ou au contraire avoir une séquence légèrement différente. On parle alors de **polymorphisme génique**. Ces différences peuvent influencer sur le niveau de synthèse de certaines protéines. Ainsi il a été montré que le polymorphisme de certains gènes, tels que les gènes codant pour certaines molécules de co-stimulation et certaines interleukines, était associé à un risque plus élevé de perte de greffons. Cependant, de nombreux autres polymorphismes sont très probablement impliqués dans la survie des greffons. C'est ce que nous souhaitons rechercher.

### **Objectif de l'étude**

Identifier de nouveaux facteurs génétiques individuels tels que les molécules impliquées dans la mise en place de la réponse immunitaire influençant la fonction des greffons et la survenue d'infection après transplantation pulmonaire.

**Moyens de l'étude**

Un échantillon de votre sang qui a été prélevé lors de votre greffe et conservé actuellement à l'Etablissement Français du Sang sera utilisé et conservé au laboratoire Cellules Dendritiques, Immunointervention et Greffes dirigé par le Pr Lebranchu, à Tours dans le strict respect du secret médical.

**Risques**

Aucun effet indésirable spécifiquement lié à cette étude n'est à attendre. Participer à cette étude ne modifiera en rien votre prise en charge thérapeutique.

**Bénéfice**

En participant à cette étude vous contribuez à l'amélioration du savoir scientifique en transplantation pulmonaire. Une meilleure connaissance des facteurs génétiques qui influencent la survie des greffons pourrait permettre dans le futur d'adapter le traitement immunosuppresseur ou les traitements préventifs individuellement afin de diminuer les risques de complications liés à ces médicaments. Ainsi, vous pouvez contribuer à aider d'autres patients à l'avenir.

**Confidentialité des informations**

L'échantillon ainsi que les résultats, seront conservés au laboratoire du Pr Lebranchu, dans le strict respect du secret médical. Les données enregistrées à l'occasion de cette étude feront l'objet d'un traitement informatique et statistique mené par l'investigateur lui même ou pour son compte. Le droit d'accès aux informations prévu par la loi informatique et liberté (article 40) s'exerce auprès du Pr Lebranchu.

**Conditions de participation**

Votre participation à cette recherche est entièrement libre et volontaire. Vous pouvez refuser de participer sans en indiquer les raisons et sans que cela n'influence la qualité des soins que vous recevrez.

**Complément d'information**

Si vous décidez de participer à cette étude, vous pourrez à tout moment demander à votre médecin toutes les informations complémentaires dont vous estimez avoir besoin.

Pr Lebranchu

## Annexe 4: Protocol de l'ELISpot

### A-Préparation et blocage des plaques pré-cotées

1. Retirer la plaque de l'emballage scellé et laver 4 fois avec PBS stérile (200µl/puits)
2. Bloquer avec un milieu contenant 10% du même sérum que celui utilisé pour les suspensions cellulaires (200µl/puits). Incuber minimum 30 minutes à T° ambiante

### B- Incubation des cellules dans la plaque

1. Sortir le milieu de blocage et ajouter la suspension de cellules y compris les éventuels agents stimulateurs tels que l'antigène (volume final de 100-150µl/puits). Le CD3 mAb-2, inclus dans le kit, est recommandée comme un contrôle positif pour la production de cytokines en utilisant une concentration finale de 100 ng / ml
2. Mettre la plaque dans les 37 ° C incubateur humidifié avec 5% de CO<sub>2</sub> et incuber pendant 12-48 heures. **Ne déplacez pas la plaque pendant ce temps** et prendre des mesures pour éviter l'évaporation (par enroulement de la plaque dans du papier d'aluminium)

### C- Détection des spots

1. Retirez les cellules en vidant la plaque et laver avec du PBS 5 fois, 200µl/puits
2. Diluer le réactif de détection en une seule étape (mAb 7-B6-1 de détection conjugué à l'alkaline phosphatase) à 1:200 dans du PBS filtré contenant 0,5% de sérum de veau fœtal. Ajouter 100 µl dans chaque puits. Incuber pendant 2 heures à température ambiante
3. Laver la plaque 5 fois avec du PBS, 200µl/puits
4. Filtrer la solution prête à l'utilisation du substrat (BCIP / NBT-plus) à travers un filtre 0,45 µm et ajouter 100 µl de substrat par puits. Développer jusqu'à ce que les spots apparaissent. **Attention, un développement de plus de 15 min peut se traduire par un fort bruit de fond.** Arrêter le développement de la couleur en lavant longuement à l'eau du robinet. Retirer le drain (le plastique souple sous la plaque) et rincer à l'arrière des membranes

5. Laissez sécher la plaque. Inspecter et compter les spots avec un microscope à dissection (x40) ou dans un lecteur ELISpot
6. Conserver la plaque dans l'obscurité et à température ambiante

# Annexe 5: Article American Journal of Transplantation

American Journal of Transplantation 2013; 13: 2119–2129  
Wiley Periodicals Inc.

© Copyright 2013 The American Society of Transplantation  
and the American Society of Transplant Surgeons

doi: 10.1002/ajt.12298

## CMV Infection in the Donor and Increased Kidney Graft Loss: Impact of Full HLA-I Mismatch and Posttransplantation CD8<sup>+</sup> Cell Reduction

P. Gatault<sup>1,2,3,\*</sup>, J-M. Halimi<sup>1,2</sup>, C. Forconi<sup>1</sup>,  
G. Thibault<sup>3,4</sup>, C. Barbet<sup>2</sup>, E. Mérieau<sup>2</sup>,  
C. Gaudy-Graffin<sup>5,6</sup>, J-F. Marlière<sup>2</sup>,  
A. Goudeau<sup>5,6</sup>, F. Bruyère<sup>7</sup>, Y. Lebranchu<sup>1,2</sup>,  
M. Büchler<sup>1,2</sup> and C. Baron<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>EA4245 Cellules Dendritiques et Greffes, Université François-Rabelais, Tours, France

<sup>2</sup>Service de néphrologie et Immunologie Clinique, CHRU de Tours, Tours, France

<sup>3</sup>Laboratoire d'immunologie, CHRU de Tours, Tours, France

<sup>4</sup>CNRS UMR 7292, Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer, Tours, France

<sup>5</sup>Laboratoire de bactériologie et virologie, CHRU de Tours, Tours, France

<sup>6</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U966, Tours, France

<sup>7</sup>Service d'Urologie, CHRU de Tours, Tours, France

\*Corresponding author: Philippe Gatault,  
philippe.gatault@univ-tours.fr

**Despite a large body of literature, the impact of chronic cytomegalovirus (CMV) infection in donor on long-term graft survival remains unclear, and factors modulating the effect of CMV infection on graft survival are presently unknown. In this retrospective study of 1279 kidney transplant patients, we analyzed long-term graft survival and evolution of CD8<sup>+</sup> cell population in donors and recipients by CMV serology and antigenemia status. A positive CMV serology in the donor was an independent risk factor for graft loss, especially among CMV-positive recipients (R<sup>+</sup>). Antigenemia was not a risk factor for graft loss and kidneys from CMV-positive donors remained associated with poor graft survival among antigenemia-free recipients. Detrimental impact of donor's CMV seropositivity on graft survival was restricted to patients with full HLA-I mismatch, suggesting a role of CD8<sup>+</sup> cells. In R<sup>+</sup> patients with positive CMV antigenemia during the first year, CD8<sup>+</sup> cell count did not increase at 2 years posttransplantation, in contrast to R<sup>-</sup> recipients. In addition, marked CD8<sup>+</sup>-cell decrease was a risk factor of graft failure in these patients. This study identifies HLA-I full mismatch and a decrease of CD8<sup>+</sup> cell count at 2 years as important determinants of CMV-associated graft loss.**

**Key words:** Allocation, cytomegalovirus, HLA matching, kidney transplantation, T cell

**Abbreviations:** CMV, cytomegalovirus; D<sup>+</sup>, CMV seropositive donor; D<sup>-</sup>, CMV seronegative donor; R<sup>+</sup>, CMV seropositive recipient; R<sup>-</sup>, CMV seronegative recipient; CMV-Ag, CMV antigenemia; ALG, anti-lymphocyte globulins.

**Received 11 January 2013, revised 29 March 2013 and accepted 02 April 2013**

### Introduction

Cytomegalovirus (CMV) is the leading cause of viral infection after solid organ transplantation. This double-stranded DNA virus establishes a lifelong infection characterized by latency alternating with periodic reactivations for spreading infectious progeny in 60–100% of the adult population worldwide (1,2). Many studies have shown that local inflammation can induce the virus to exit of latency from dendritic cell and macrophages (3,4), and in turn CMV reactivation promotes local inflammation (5). The quality of the immune response to CMV has a crucial role in controlling this cycle (6,7). CMV infection stimulates a tremendous number of CMV-specific T cells (8). Over time, chronic persistence of CMV causes the accumulation of an increasing number of dysfunctional CMV-specific T cells that progressively lose several of their effectors functions (9–16).

In transplant patients, drug-induced chronic immunosuppression may create a microenvironment favorable to a new equilibrium between local periodic subclinical reactivations and the host's immune response, which can be deleterious to the transplanted organ (17–19). CMV has been implicated in chronic cardiac allograft vasculopathy (20) and bronchiolitis obliterans in lung transplant patients (21,22). Despite a large body of literature on CMV, the impact of transplanting kidneys from CMV-positive donor on long-term graft survival remains highly controversial (23–26). Several studies reported that CMV was a risk factor for interstitial fibrosis/tubular atrophy (27,28) and chronic allograft dysfunction (29,30), while others studies did not find such effects (31,32).

The impact of CMV on long-term kidney function may be obscured by many factors. First, because of the increased

incidence of latent CMV infection with age, differentiating age- from CMV-related events is difficult, especially in evaluating kidney graft survival. Second, many studies in transplant patients relied on blood samples to survey CMV reactivation although it is now recognized that interactions between host tissues and chronic viruses are organ-specific. This is well illustrated during infection by murine  $\gamma$ -herpes virus 68, which is removed from the arteries by the immune system whereas other tissues are not efficiently cleared (33). Third, reactivation of CMV infection is known to be transient and patchy, while obtaining sequential, repeated, large-sized biopsies of kidneys is not possible for ethical reasons. Finally, host factors that may modulate the long-term effects of CMV infection in transplant patients have never been documented. Therefore, the impact of transplanting kidneys from CMV-infected donors (i.e. CMV-seropositive donors) on long-term kidney graft survival may have been misjudged and needs further analysis. The aim of the present study was to determine the impact of CMV infection in the donor on graft survival and to identify host factors, which modulate this risk.

## Patients and Methods

### Patients

In all, 1281 consecutive renal transplantations were performed between October 1985 and December 2008 in our center (end of follow-up, December 31, 2010). Donor CMV serology was unknown for two patients, so we investigated 1279 renal transplantations. The median follow-up was 6.6 years (range 0 days to 24.6 years).

Initial immunosuppression involved methylprednisolone, polyclonal anti-lymphocyte globulins (Thymoglobuline<sup>®</sup> or lymphoglobuline<sup>®</sup>, Imtix-Sangsat, Lyon, France) or basiliximab (Simulect<sup>®</sup>, Novartis, Rueil-Malmaison, France). The maintenance immunosuppressive regimen was azathioprine or mycophenolate mofetil, cyclosporine, tacrolimus or sirolimus and prednisone as described (34).

Renal biopsy was performed when serum creatinine raised by 20% or more over the baseline, without any other obvious cause. Date of biopsy-proven acute rejection (BPAR) was defined by the date of the biopsy.

The patients with the highest risk of CMV disease (CMV-positive donors into CMV-negative recipients [D<sup>+</sup>/R<sup>-</sup>] at the time of the transplantation) received prophylaxis with a weekly infusion of immunoglobulin therapy for one month (from 1985 to 1994), aciclovir or valaciclovir (1995–2003) or valganciclovir (2004–2008) for 3 months in absence of contraindication and severe adverse events. Patients with a lower risk of CMV disease (pretransplantation CMV-positive recipients [R<sup>+</sup>]) received preemptive therapy. Since 1995, antiviral drugs were used for asymptomatic patients with CMV-Ag above 50 stained neutrophils per milliliter and those with CMV syndrome or disease, whatever the CMV-Ag values.

### CMV infection diagnosis

From 1984 to 1994 diagnosis of systemic CMV infection relied on optimized CMV culture on MRC5 human cells with indirect immunofluorescence plaque staining using E13 mouse monoclonal antibody directed to CMV protein IE1 72. Stained nuclei were observed after 24 and 48 h incubation.

CMV antigenemia (CMV-Ag) was added in 1995 as a more rapid and direct evaluation of CMV viremia. Briefly, after lysis of red cells, leucocytes of the patient were collected, standardized to 10<sup>6</sup> cells/mL and cytocentrifuged on a spot slide. Then, indirect immunofluorescence assay was performed with mouse monoclonal antibodies C10 and C11 directed to the early CMV protein pp65. The number of stained-polynuclear cells per 2 × 10<sup>5</sup> leucocytes was recorded. Weekly CMV-antigenemia monitoring was performed during 4 and 6 months following transplantation in R<sup>+</sup> and D<sup>+</sup>R<sup>-</sup>, respectively.

### Variables studied

At the time of transplantation, the following variables were recorded: type of donor (living or deceased), CMV serology, age and gender of the recipient and donor, diabetes and weight of recipient, number of class I (-A, -B) and class II (-DR) HLA mismatches, immunosuppressive treatments, cold ischemia time and delayed graft function. The CMV serology was usually not performed after transplantation.

At the 3-month visit, the following variables were measured: systolic and diastolic arterial pressure, serum creatinine level, and proteinuria, estimated glomerular filtration rate (eGFR as measured by the Modification of Diet in Renal Disease formula in adults (35) and the Schwartz formula in children (36)). The occurrence and date of BPAR episodes were recorded.

Phenotypic analyses of lymphocytes were performed according to standard whole blood procedure using a FACStar plus (Becton Dickinson) or an EPICS-XL-MCL (Beckman Coulter) flow cytometer. CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and natural-killer (NK) cell counts were recorded at day 0 (D0) and year 2. CMV-Ag values were available from 1995 in 898 patients.

### Statistical analyses

Results are expressed as percentage or mean ± SD for normally distributed variables and median and range for non-normally distributed variables. Qualitative data were compared using chi-square. Quantitative data were compared using Mann-Whitney when two groups were compared, and using ANOVA (followed by pair-wise comparisons using PSLD Fisher test) when more than two groups were compared.

Kaplan-Meier curves were used to estimate the predictive value of donor CMV serostatus (and other relevant parameters) on uncensored graft survival (death or end-stage renal disease [ESRD]), patient survival (ESRD was censored) and death-censored graft survival (equivalent to graft survival). Log-rank test was used to compare survival curves. End of follow-up was defined as death (with a functioning graft) or graft loss (i.e. dialysis or re-transplantation). Of note, only 6/1279 (0.5%) patients were lost during follow-up; in these six patients, end of follow-up was defined as the date of last visit. Parameters used as covariates were those associated (p value < 0.10) with graft loss in univariate analyses using Cox regression: we first used usual clinical and biochemical covariates (Model 1), and then added immunosuppressive medications (Model 2); we finally added donor age (Model 3) because donor age was associated with graft loss after adjustment on graft year. Results are expressed with hazard ratios (HR), 95% confidence intervals (95% CI) and p values. Statistical analyses were performed using SAS v9.1 (SAS Inst., Cary, NC). A p < 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Baseline characteristics

Donor and recipient characteristics at the time of transplantation and at the 3-month visit are shown in Table 1



**Table 1:** Baseline characteristics of patients with transplantation between 1985 and 2008

	All (n = 1279)	D <sup>+</sup> R <sup>-</sup> (n = 277)	D <sup>+</sup> R <sup>+</sup> (n = 284)	D <sup>-</sup> R <sup>+</sup> (n = 360)	D <sup>-</sup> R <sup>-</sup> (n = 358)
<b>Donor characteristics</b>					
Age (years)	43.2 ± 15.3	43.6 ± 17.6 <sup>†</sup>	46.4 ± 16.8	43.9 ± 15.5	39.7 ± 17.5 <sup>§</sup>
Male sex (%)	63.5	61.4	61.7	61.9	67.3
Living donor (%)	1.5	1.4	0.7	0.8	2.8
<b>Recipient characteristics</b>					
Age (years)	45.6 ± 15.3	44.5 ± 15.9*	48.7 ± 13.7	47.6 ± 13.8	42.1 ± 16.4 <sup>†</sup>
Male sex (%)	61.5	64.3 <sup>†</sup>	55.3	57.5	68.4 <sup>†</sup>
Diabetes mellitus (%)	9.0	6.0 <sup>†</sup>	12.0	12.5	7.9
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	24.1 ± 4.3	23.8 ± 4.1	23.6 ± 4.2	24. ± 4.4	24.2 ± 4.4
<b>Graft characteristics</b>					
First graft (%)	86.1	88.4	85.6	84.4	84.9
HLA class I AB mismatch	2.7 ± 1.0	2.6 ± 1.1	2.8 ± 1.0	2.8 ± 1.0	2.7 ± 0.9
HLA class II DR mismatch	1.3 ± 0.7	1.3 ± 0.6	1.3 ± 0.7	1.2 ± 0.7	1.2 ± 0.7
DGF (%)	20.7	19.5	21.0	21.0	20.0
BPAR during the first year (%)	28.3	28.2	25.4	29.2	30.2
Cold ischemia (hours)	20.8 ± 8.3	21.5 ± 9.2	21.0 ± 8.2	20.6 ± 7.7	20.4 ± 8.1
<b>Initial immunosuppressive regimen</b>					
Antilymphocyte globulins (%)	65.1	63.2	66.9	66.1	64.5
Interleukin 2 receptor antagonists (%)	29.1	31.0	28.2	27.8	29.6
Cyclosporine (%)	70.0	69.0	64.8	68.9	76.8 <sup>§</sup>
Tacrolimus (%)	24.2	25.6	27.1	26.4	18.4 <sup>§</sup>
Mycophenolate mofetyl (%)	65.9	65.0	69.7	69.2	60.3 <sup>†</sup>
Azathioprine (%)	33.4	33.2	29.2	30.8	39.4 <sup>†</sup>
Sirolimus (%)	2.3	1.8	3.5	1.7	2.5
<b>Clinical and biochemical variables at 3 months</b>					
Systolic arterial pressure (mmHg)	138 ± 17	137 ± 17	139 ± 17	139 ± 17	137 ± 17
Diastolic arterial pressure (mmHg)	80 ± 11	80 ± 11	80 ± 10	81 ± 10	80 ± 11
Serum creatinine level (μmol/L)	132 ± 48	134 ± 51	137 ± 55	130 ± 40	129 ± 47
eGFR (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	54.3 ± 19.0	54.7 ± 20.9	51.0 ± 17.6	53.0 ± 15.9	57.7 ± 20.6
Proteinuria (g/day)	0.32 ± 0.83	0.33 ± 0.90	0.33 ± 0.92	0.31 ± 0.56	0.33 ± 0.92

D<sup>+</sup>, CMV-positive donor; D<sup>-</sup>, CMV-negative donor; CMV, cytomegalovirus; HLA, human leukocyte antigen; DGF, Delayed graft dysfunction; BPAR, Biopsy-proven acute rejection; eGFR, estimated creatinine clearance.

\*p < 0.05 for comparison with D<sup>-</sup> R<sup>+</sup>.

<sup>†</sup>p < 0.05 for comparison with D<sup>+</sup> R<sup>+</sup>.

<sup>§</sup>p < 0.05 for comparison with all other groups.

<sup>†</sup>p < 0.05 for comparison with D<sup>+</sup> R<sup>+</sup> and D<sup>-</sup> R<sup>+</sup>.

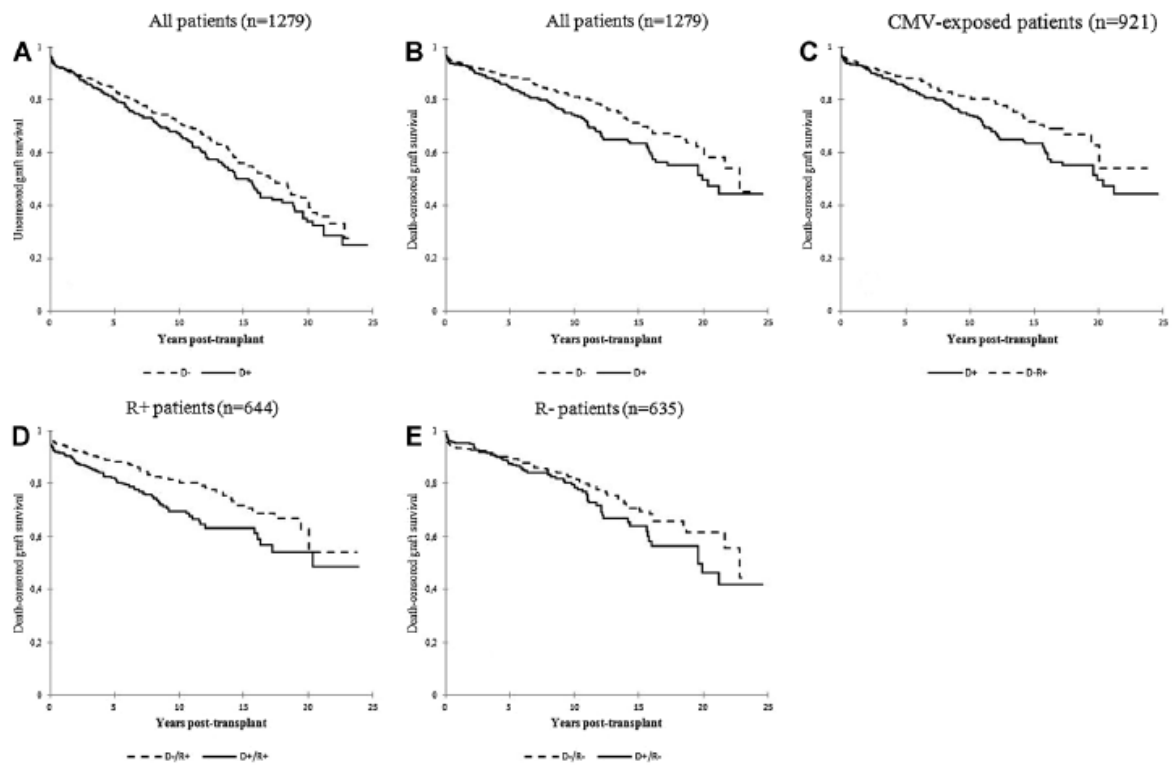
(n = 1279). In the study period, 1219 adults and 62 recipients under 18 years were transplanted. There was 1118 (86%) first transplantation. Sixty-two percent of patients were male. Recipient and donor age were respectively 45.6 ± 15.3 and 43.2 ± 15.3 years. At 3 months, mean eGFR was 54.3 ± 19 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>. BPAR occurred in 28.3% during the first year. Patients were then analyzed separately according to donor and recipient CMV serology (Table 1). D<sup>-</sup>R<sup>-</sup> patients were younger than D<sup>+</sup>R<sup>+</sup> and D<sup>-</sup>R<sup>+</sup> patients and received a kidney from younger donor than all other groups. Of note, cyclosporine was more often used in D<sup>-</sup>R<sup>-</sup> patients than in other patients.

**CMV Infection in the donor is an independent risk factor of graft loss, especially in R<sup>+</sup> patients**

Among 1279 patients, death, ESRD occurred in 150 (11.7%), 284 (22.2%), respectively, during follow-up. On univariate analysis, CMV-positive serology in the donor was associated

with increased risk of uncensored graft loss (p = 0.053), with an estimated half-life of 14.5 and 17.0 years in the D<sup>+</sup> and D<sup>-</sup> groups, respectively (Figure 1A). Patient survival did not differ between the two groups (p = 0.558). However, death-censored graft survival was lower with kidneys from CMV-positive than -negative donors (Figure 1B, p = 0.005). This result remained when only CMV-exposed were analyzed (i.e. D<sup>-</sup>R<sup>-</sup> were excluded), as shown in Figure 1C (p = 0.023). Interestingly, by year 1 and 2, D<sup>+</sup> patients had a lower GFR as compared to D<sup>-</sup> recipients (57.7 ± 19.6 vs. 62.5 ± 19.2 ml/mn and 55.8 ± 19.9 vs. 60.8 ± 19.1 ml/mn, p < 0.0001, respectively).

We identified variables associated with risk of graft loss on univariate analysis: use of antilymphocyte globulins (1.536 [1.129–2.092], p = 0.006), mycophenolate mofetil (0.737 [0.566–0.957], p = 0.022) and cyclosporine (0.530 [0.404–0.694], p < 0.001), serum creatinine level (HR 1.010 [95% CI 1.008–1.012], p < 0.0001), proteinuria (HR per g/day



**Figure 1: Kidneys from CMV-infected donors show lower survival, especially in R<sup>+</sup> recipients.** Estimated uncensored graft survival by donor CMV serostatus in 1279 consecutive patients with transplantation between 1985 and 2008 are represented (A) ( $p = 0.053$ ). Death-censored graft survival in the same 1279 patients and in 921 CMV-exposed recipients (i.e. D<sup>-</sup>R<sup>-</sup> excluded) are presented in B ( $p = 0.005$ ) and C ( $p = 0.023$ ), respectively. Lower graphs represent estimated death-censored graph survival in 644 CMV-seropositive recipients (D,  $p = 0.008$ ) and 635 CMV-seronegative recipients (E,  $p = 0.210$ ).

1.267 [1.184–1.357],  $p < 0.0001$ ) and systolic arterial pressure (HR per 10 mmHg 1.011 [1.004–1.019],  $p = 0.004$ ) at 3 months, BPAR (HR 2.660 [2.062–3.437],  $p < 0.0001$ ) and date of transplantation (HR per year 0.964 [0.944–0.984],  $p = 0.0005$ ). The increased risk of graft loss for the D<sup>+</sup> group remained significant after adjustment for donor age and these variables (Table 2). In addition, acute rejection (HR 2.216 [1.670–2.941],  $p < 0.0001$ ), year of transplantation (HR per year 0.934 [0.890–0.980],  $p = 0.0006$ ), proteinuria (HR per g/day 1.262 [1.169–1.363],  $p < 0.0001$ ) and serum creatinine (HR per  $\mu\text{mol/L}$  1.007 [1.005–1.010],  $p < 0.0001$ ) remained independently and significantly associated with graft survival (Supplementary Table S1). In 921 patients exposed to CMV (i.e. after exclusion of the D<sup>-</sup>R<sup>-</sup> transplant group), receiving a kidney from a CMV-seropositive donor remained an independent risk of graft loss (Table 2).

Since the capacity to control CMV replication may differ according to CMV serostatus of the recipient, we estimated the risk of graft loss associated with donor CMV in relation to recipient CMV serostatus. The increased risk of death-

censored graft loss observed in patients who received a graft from a CMV-positive donor was highly significant in R<sup>+</sup> recipients (Figure 1D,  $p = 0.008$ ) but not in R<sup>-</sup> recipients (Figure 1E,  $p = 0.21$ ). Moreover in R<sup>+</sup> recipients, the risk was not really modified after adjustment for variables (Table 2). Therefore, CMV infection in the donor was an independent risk factor of graft loss, especially in R<sup>+</sup> recipients before engraftment (R<sup>+</sup>).

**CMV-positive donors are associated with high risk of CMV-antigenemia in CMV-positive recipients but the increased risk of graft lost is independent from CMV viremia**

We wondered whether CMV infection in donors conferred an increased risk of viral replication in R<sup>+</sup> recipients without any viral prophylaxis ( $n = 429$ ). Receiving a graft from a CMV-positive donor significantly increased the risk of CMV-Ag in R<sup>+</sup> recipients (D<sup>+</sup>/R<sup>+</sup>: 68.5% vs. D<sup>-</sup>/R<sup>+</sup>: 49.6%,  $p < 0.0001$ ). However, multivariate analysis revealed positive CMV-Ag was not associated with an increased risk of graft loss in patients CMV D<sup>+</sup> patients ( $n = 395$ ; HR 1.27

**Table 2:** CMV-positive donor is an independent risk factor of death-censored graft loss

	Univariate analysis				Multivariate analysis		
	HR	95% CI	p		HR	95% CI	p
All patients (n = 1279)	1.393	1.104–1.759	0.005	Model 1	1.366	1.039–1.796	0.026
				Model 2	1.326	1.007–1.744	0.044
				Model 3	1.330	1.010–1.751	0.042
D <sup>-</sup> R <sup>-</sup> excluded (n = 921)	1.391	1.044–1.855	0.024	Model 1	1.442	1.025–2.029	0.036
				Model 2	1.423	1.011–2.004	0.043
				Model 3	1.417	1.007–1.995	0.046
R <sup>+</sup> patients (n = 644)	1.550	1.121–2.144	0.008	Model 1	1.512	1.021–2.239	0.039
				Model 2	1.471	0.993–2.179	0.054
				Model 3	1.458	0.984–2.161	0.060

HR, hazard ratio; 95% CI, 95% confidence interval; D<sup>+</sup>, CMV-positive donor, R<sup>+</sup>, CMV-positive recipient. Model 1: adjustment on creatinine, proteinuria, systolic blood pressure at 3 months, biopsy-proven acute rejection occurrence during the first year and date of transplantation. Model 2: model 1 + adjustment on mycophenolate mofetil, cyclosporine, anti-lymphocyte globulins use. Model 3: model 2 + adjustment on donor age.

[0.92–1.74], p = 0.146) and in patients potentially exposed to CMV (i.e. all patients except D<sup>-</sup>/R<sup>-</sup> patients (n = 663: HR 1.03 [0.06–1.78], p = 0.92).

Then, we assessed risk of graft loss according to donor CMV serostatus in antigenemia-free recipients. Interestingly, as shown in Table 3, kidneys from CMV-positive donors were also associated with worse outcome in these patients, especially in R<sup>+</sup> recipients. Overall these results show that the increased risk of graft loss associated with donor CMV seropositivity was independent from CMV viremia.

**Full HLA class I mismatch increases the detrimental impact of receiving a kidney from a CMV positive donor**

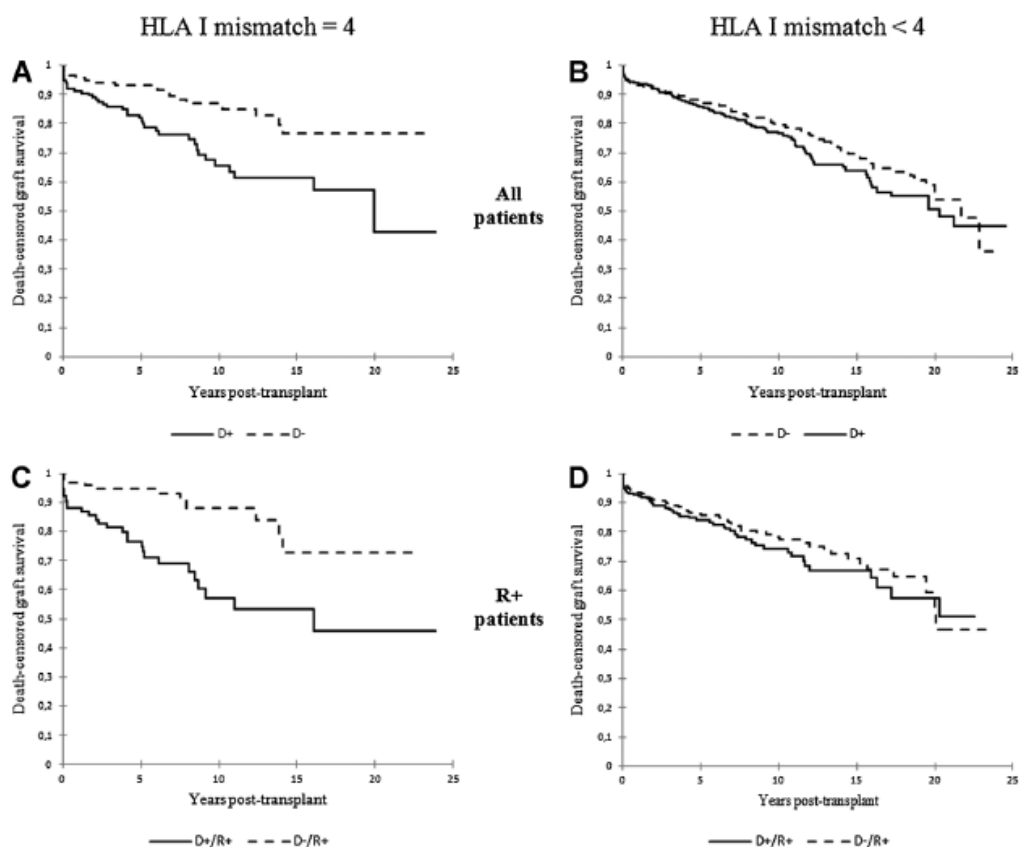
The control of CMV replication in tissues relies on the recruitment of competent CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells (6, 7),

which, for most, is restricted to classical HLA class I expressed by recipient antigen-presenting cells. We hypothesized that interactions between recipient CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells and CMV-infected donor cells could be impaired with lack of any HLA class I compatibility between the donor and recipient (four mismatches in HLA-A and -B antigens). The Figure 2 shows that the detrimental effect of receiving a kidney from a CMV-positive donor was indeed maximal in recipients with full HLA class I mismatch (upper left panel, p = 0.0004), and was even more pronounced in R<sup>+</sup> patients (lower left panel, p = 0.0001). This detrimental effect remained after adjustment on variables of the previously described model 3 (All: HR 1.666 [1.359–5.234], p = 0.004; R<sup>+</sup>: HR 3.051 [1.012–7.254], p = 0.012). In contrast, D<sup>+</sup> and D<sup>-</sup> grafts had similar survival in patients with at least one HLA-I matching with their donor (Figure 2, right column).

**Table 3:** CMV+ donor still an independent risk factor of graft loss in the absence of CMV antigenemia

CMV-Ag free patients	Univariate analysis				Multivariate analysis		
	HR	95% CI	p		HR	95% CI	p
All (n = 547)	1.924	1.174–3.154	0.009	Model 1	2.452	1.424–4.221	0.001
				Model 2	2.337	1.354–4.036	0.002
				Model 3	2.321	1.344–4.008	0.003
D <sup>-</sup> R <sup>-</sup> excluded (n = 321)	2.239	1.138–4.468	0.020	Model 1	3.921	1.713–8.978	0.001
				Model 2	3.774	1.616–8.817	0.002
				Model 3	3.749	1.611–8.722	0.002
R <sup>+</sup> (n = 216)	2.487	1.164–5.314	0.019	Model 1	3.349	1.377–8.148	0.008
				Model 2	3.243	1.322–7.959	0.010
				Model 3	3.319	1.349–8.164	0.009

HR, hazard ratio; 95% CI, 95% confidence interval; D<sup>+</sup>, CMV-positive donor, R<sup>+</sup>, CMV-positive recipient. Model 1: adjustment on creatinine, proteinuria, systolic blood pressure at 3 months, biopsy-proven acute rejection occurrence during the first year and date of transplantation. Model 2: model 1 + adjustment on mycophenolate mofetil, cyclosporine, anti-lymphocyte globulins use. Model 3: model 2 + adjustment on donor age.



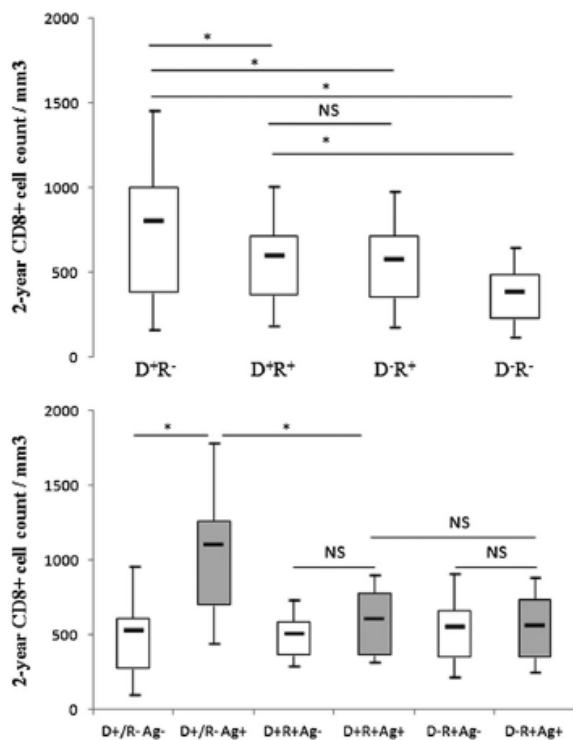
**Figure 2: Partial human leukocyte antigen (HLA) class I matching protects against the detrimental effect of receive a kidney from CMV-infected donor.** Death-censored graft survival in patients with full HLA class I AB mismatch (A and C) or partial HLA class I mismatch (B and D) by donor CMV serology. Upper and lower panels represent all patients (310 with full mismatch and 969 partially mismatch), and R<sup>+</sup> recipients (n = 644), respectively. Graft survival is lower for D<sup>+</sup> than D<sup>-</sup> kidneys only in patients with full HLA class I mismatch (A, p = 0.0004; C, p = 0.0001).

**At 2 years, the D<sup>+</sup>R<sup>+</sup> recipients do not expand their CD8<sup>+</sup> cell count in response to CMV as efficiently as did the D<sup>+</sup>R<sup>-</sup> recipients**

The aforementioned data suggest that the CD8<sup>+</sup> cell response may play a role in the CMV-driven graft loss. We decided to further explore this immune response in this large cohort of patients. It has previously been reported that a large fraction of the CD8 repertoire is devoted to defense against CMV (37). We hypothesized that the size of the CD8<sup>+</sup> cell compartment would correlate with the anti-CMV response.

For the purpose of the present study, we analyzed the circulating CD8<sup>+</sup> cell count at D0 and year-2 after transplantation by donor and recipient CMV serology (i.e. D<sup>-</sup>R<sup>-</sup>, D<sup>+</sup>R<sup>-</sup>, D<sup>-</sup>R<sup>+</sup>, D<sup>+</sup>R<sup>+</sup>) and CMV-Ag. The CD8<sup>+</sup> cell counts, recorded for 663 at D0, was greater in R<sup>+</sup> patients than in R<sup>-</sup> patients (520 ± 270 vs. 407 ± 206/mm<sup>3</sup>, respectively; p < 0.0001). Two-year CD8<sup>+</sup> cell counts

were recorded for 164 D<sup>-</sup>R<sup>-</sup> (3 Ag<sup>+</sup>), 128 D<sup>+</sup>R<sup>-</sup> (51 Ag<sup>+</sup>), 169 D<sup>-</sup>R<sup>+</sup> (69 Ag<sup>+</sup>) and 130 D<sup>+</sup>R<sup>+</sup> (71 Ag<sup>+</sup>). At year 2, ANOVA analysis showed that CD8<sup>+</sup> cell counts were different between groups presented in each panel of Figure 3. Paired-wise analyses indicated that CD8<sup>+</sup> cell count was lowest for D<sup>-</sup>R<sup>-</sup> patients (vs. all other groups at year 2, p < 0.0001; Figure 3, upper panel). These data indicate that the size of the CD8<sup>+</sup> cell compartment is driven by CMV. Interestingly, the 2-year CD8<sup>+</sup> cell count was much lower in D<sup>+</sup>R<sup>+</sup> than in D<sup>+</sup>R<sup>-</sup> patients (599 ± 410 vs. 811 ± 647/mm<sup>3</sup>, p < 0.0001), but not different of that in D<sup>-</sup>R<sup>+</sup> (490 ± 397/mm<sup>3</sup>, p = 0.745). CMV-Ag was associated with increased number of CD8<sup>+</sup>-cells in D<sup>+</sup>R<sup>-</sup> patients (1112 ± 678/mm<sup>3</sup> vs. 530 ± 432/mm<sup>3</sup>, p < 0.0001), but not in D<sup>+</sup>R<sup>+</sup> (605 ± 296/mm<sup>3</sup> vs. 510 ± 224/mm<sup>3</sup>, p = 0.221) and D<sup>-</sup>R<sup>+</sup> (567 ± 318/mm<sup>3</sup> vs. 558 ± 350/mm<sup>3</sup>, p = 0.902). In addition, the difference between D<sup>+</sup>R<sup>+</sup>Ag<sup>+</sup> and D<sup>+</sup>R<sup>-</sup>Ag<sup>+</sup> was dramatic (p < 0.0001), while no difference was observed between D<sup>+</sup>R<sup>+</sup>Ag<sup>+</sup> and



**Figure 3: At 2 years, CMV drives a much weaker expansion in D<sup>+</sup>R<sup>+</sup> patients as compared to D<sup>+</sup>R<sup>-</sup>.** Each graph represents number of CD8<sup>+</sup> cells/mm<sup>3</sup> at 2 year after transplantation by donor (D<sup>+/+</sup>) and recipient (R<sup>+/+</sup>) CMV serostatus. In upper panel, patients are presented by CMV serology group. In lower panel, patients are presented according to CMV-antigenemia occurrence during the first year. Mean is represented by a black bar, with the first and third quartiles. Upper and lower whiskers represent standard deviation. NS: no significant, \*p < 0.0001; pair-wise PSLD Fisher test.

D<sup>-</sup>R<sup>+</sup>Ag<sup>+</sup> patients (p = 0.574). In addition, we found that NK and CD4<sup>+</sup> cells that have been implicated in CMV immune response did not increase in patients exposed to CMV (Supplementary Figure S1). These data together suggested that long after the primary phase of CMV replication, D<sup>+</sup>R<sup>-</sup> recipients kept a higher number of CD8<sup>+</sup> cells as compared to D<sup>+</sup>R<sup>+</sup> recipients, for whom renal allograft outcome was poorer.

We next analyzed individual variations in CD8<sup>+</sup> cell counts between D0 and year-2 posttransplantation. We had 414 patients for whom T cell subpopulation counts were recorded at both D0 and year-2. Since the size of the CD8<sup>+</sup> cell compartment was similar in D<sup>+</sup>R<sup>+</sup> and D<sup>-</sup>R<sup>+</sup> patients, we grouped them together for analysis of the individual evolution of the CD8<sup>+</sup> cell subpopulation. We focused on patients who unambiguously reactivated CMV (i.e. 106 R<sup>+</sup>Ag<sup>+</sup> and 43 D<sup>+</sup>R<sup>-</sup>Ag<sup>+</sup>). Spearman correlation tests showed that pretransplant CD8<sup>+</sup> cell number was

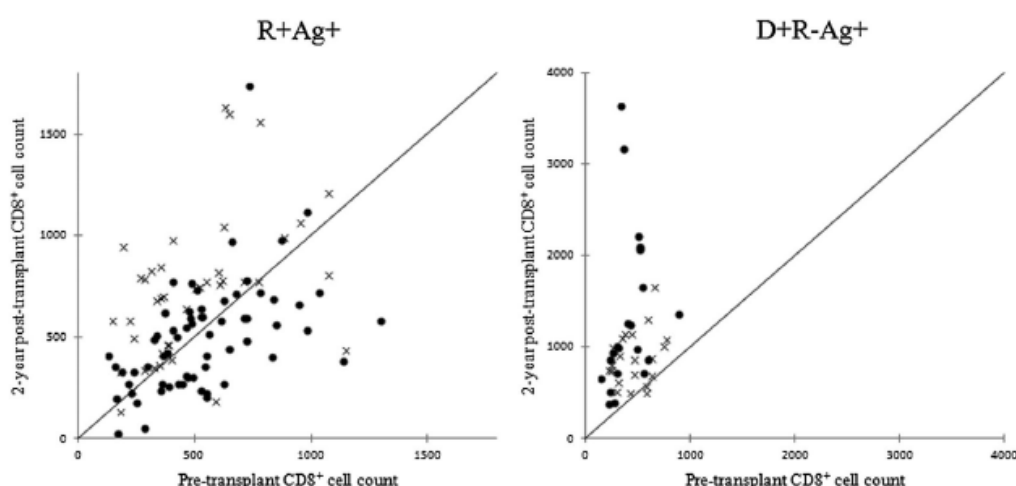
weakly correlated with the 2-year posttransplant count in R<sup>+</sup>Ag<sup>+</sup> patients (R = 0.465, p = 0.0001) and D<sup>+</sup>R<sup>-</sup>Ag<sup>+</sup> (R = 0.367, p = 0.017). As shown in Figure 4, CMV reactivation was associated with an individual increase of the CD8<sup>+</sup> cell count in virtually all D<sup>+</sup>R<sup>-</sup>Ag<sup>+</sup> patients (95%). In contrast, 36% of R<sup>+</sup>Ag<sup>+</sup> patients showed a reduction of the CD8<sup>+</sup> cell count after CMV reactivation. In addition, mean value of the individual variation of the CD8<sup>+</sup> cell count was higher in D<sup>+</sup>R<sup>-</sup>Ag<sup>+</sup> in comparison to R<sup>+</sup>Ag<sup>+</sup> patients (197 ± 190 vs. 29 ± 79%, p < 0.0001). Together these data indicate that in R<sup>+</sup> recipients the CD8<sup>+</sup> response triggered by previous CMV-Ag was highly heterogeneous compare to D<sup>+</sup>R<sup>-</sup>Ag<sup>+</sup>.

**Posttransplantation contraction of the CD8<sup>+</sup> cell compartment increases the risk of graft loss in patients exposed to CMV**

First, we evaluated the individual evolution of the CD8<sup>+</sup> cell count ((Year 2 – D0)/D0) × 100) in CMV-exposed patients. Then, we compared graft survival in patients with severe reduction in CD8<sup>+</sup> cell count (≤10<sup>o</sup> percentile or reduction ≥40%) to others. R<sup>+</sup> patients with such reduction showed significantly reduced graft survival (Figure 5, left panel, p = 0.003); importantly, the two groups had similar age (48.1 ± 13.2 vs. 49.7 ± 13.1 years, respectively, p = 0.58). Interestingly, severe CD8<sup>+</sup> cell count reduction remained associate with increased risk of graft loss in 113 R<sup>+</sup> patients who had received ALG (p = 0.014). In contrast, >40% reduction in CD8<sup>+</sup> cell count had no impact on graft survival among D<sup>-</sup>R<sup>-</sup> patients (p = 0.991), which indicates that the reduction in the compartment is not by itself associated with poor graft survival. Therefore, evolution in the number of the CD8<sup>+</sup> cell in kidney transplant patients might be a marker of the anti-CMV immune response and its reduction negatively affects graft survival.

**Discussion**

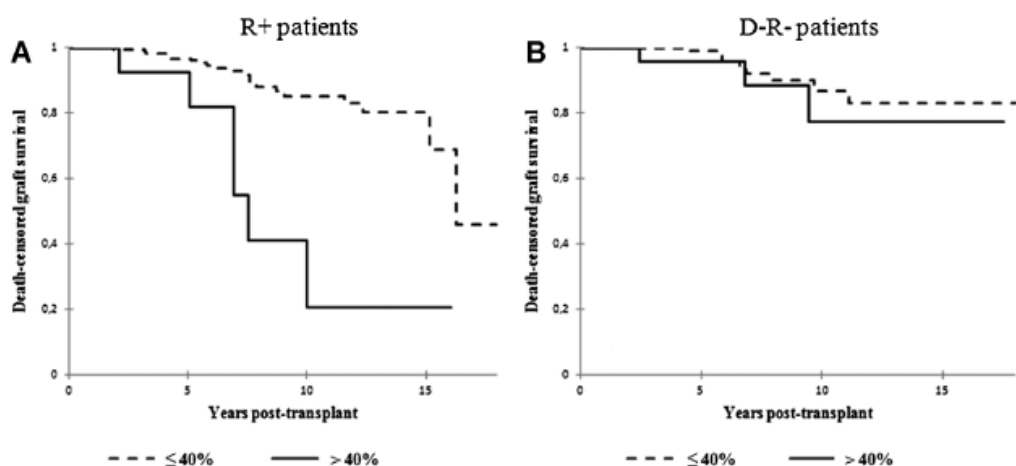
We report that latent CMV infection in the donor was an independent risk factor of kidney graft loss, especially for recipients with latent infection before engraftment. The impact of chronic CMV infection on long-term kidney graft function remains highly controversial. An epidemiologic study by Schnitzler et al. (24) reported that CMV latent infection in the donor was a risk factor of graft loss at year-2 in CMV-negative but not CMV-positive recipients. In contrast another study found that D<sup>+</sup>R<sup>+</sup> rather than D<sup>+</sup>R<sup>-</sup> transplants showed the lowest allograft survival at 3 years but this effect disappeared after adjustment for donor age (23). Therefore, our work contrasts with these studies. However, it must be stressed that in our cohort, similarly to the aforementioned studies, the year-2 graft survival was not affected by latent CMV infection in the donor for R<sup>+</sup> recipients (p = 0.2, data not shown), which suggests that the effects of CMV are subtle and cumulative and need a long time to become evident. Of note, our



**Figure 4: Early CMV viremia drives a long lasting expansion of the CD8<sup>+</sup> cell compartment in all R<sup>+</sup> patients, in contrast to R<sup>+</sup> recipients in which the CD8<sup>+</sup> response is highly heterogeneous.** Distribution of patients by CD8<sup>+</sup> cell count at day 0 (D0; x-axis) and year 2 (y-axis) for patients who had an episode of viremia during the first year posttransplantation (Ag<sup>+</sup>). R<sup>+</sup> patients (n = 106) and D<sup>+</sup>R<sup>-</sup> combinations (n = 43) are represented on the left and right panel, respectively. Black circle represents patients who received anti-lymphocyte globulins, and cross, patients who never received treatment. Black line is the bisector ( $[(\text{Year 2} - \text{D0})/\text{D0}] \times 100 = 1$ ).

results are in line with other recent epidemiologic studies finding that CMV latency, especially in the donor, is an independent risk factor of late graft failure (25,26), as well as other studies finding CMV infection associated with chronic allograft nephropathy (38). Interestingly, our results suggest that R<sup>+</sup> rather than R<sup>-</sup> recipients are more susceptible to the adverse consequences of transplanting kidneys from CMV-infected donors. Therefore, we focused on this group of R<sup>+</sup> patients.

Kidneys from CMV-infected donor carry a high-risk of viremia, as previously reported (32,39). Nonetheless, an episode of CMV-Ag was not a significant risk factor of graft loss, which agrees with Sagedal et al. (40). Furthermore, the outcome was also worse for kidneys from CMV-positive donors in antigenemia-free R<sup>+</sup> recipients. Therefore, CMV-Ag may not be a good surrogate marker of pathogenic effect of CMV over the long-term. Anyway, this high risk of viremia in R<sup>+</sup> recipients transplanted with kidneys from CMV-



**Figure 5: Severe reduction of CD8<sup>+</sup> cell count after transplantation increases the risk of graft loss in R<sup>+</sup> recipients.** Graphs represent risk of death-censored graft survival by reduction in CD8<sup>+</sup> cell count at year 2 in R<sup>+</sup> recipients (left graph, n = 204) or D<sup>-</sup>R<sup>-</sup> patients (right graph, n = 121). Bold black lines indicate recipients with >40% reduction in CD8<sup>+</sup> cell count (R<sup>+</sup>, n = 26; D<sup>-</sup>R<sup>-</sup>, n = 36); dashed lines, recipients without >40% reduction (R<sup>+</sup>, n = 178; D<sup>-</sup>R<sup>-</sup>, n = 85). CD8<sup>+</sup> cell count reduction was associated with graft loss in R<sup>+</sup> recipients ( $p = 0.003$ ) but not D<sup>-</sup>R<sup>-</sup> patients ( $p = 0.991$ ).

infected donors suggests that the supplemental viral burden brought by the graft was not efficiently controlled by memory T cells present in CMV-seropositive patients.

Because CMV induces a massive accumulation of CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells (13,37), which have a crucial role in control of CMV replication (6), we analyzed the circulating CD8<sup>+</sup> cell subpopulation by donor and recipient CMV serostatus and the occurrence of CMV-Ag. We found that CMV had a long-lasting and profound impact on recipients' circulating pool of CD8<sup>+</sup> but not CD4<sup>+</sup> or NK cells in D<sup>+</sup>R<sup>-</sup> patients. Despite the large body of literature dealing with anti-CMV T cell response in transplantation, none has compared the long-term evolution of the CD8<sup>+</sup> T cell count by CMV serostatus and in correlation with graft survival in such large number of patients ( $n = 414$ ). Interestingly, among patients in whom CMV-Ag developed in the posttransplant period, only CMV-seronegative recipients showed marked expansion of the CD8<sup>+</sup> cell count until at least 2 years as compared with CMV-positive recipients. This might cause poor ability to control chronic CMV replication and may account for the serious effects of CMV chronic infection in these recipients. Interestingly, in accordance with this interpretation we found that posttransplantation reduction of the CD8<sup>+</sup> cell count increased the risk of graft loss in patients exposed to CMV. We might envision that the poor ability to increase the CD8 count in response to CMV reactivation might indicate a process of clonal exhaustion. The impact of clonal exhaustion on the control of chronic viral replication is well known (41). Although exhaustion of CMV-specific T cells is debated, many studies have reported impairment of CMV-specific T cells over the long term, in older-aged infected individuals or in transplant patients (10–16). Furthermore, a recent study reported that programmed cell death-1 (PD-1) signature was higher in CMV-specific T cells than in naïve or influenza-specific T cells (9). The role of CMV-associated T cell impairment in chronic organ-specific dysfunction has not yet been investigated. Most of the studies of anti-CMV immune response in transplantation involved small series of patients, which did not allow for reliably assessing long-term graft survival. Interestingly, we have just completed a large clinical study ( $n = 1318$  patients) in two independent kidney and lung transplant cohorts aimed at analyzing the association between graft survival and polymorphism of the *PDCD-1* gene, a crucial gene in viral-induced T cell clonal exhaustion (42). Results indicate that a polymorphism in this gene was a risk factor of CMV-associated graft loss in both cohorts of patients. Interestingly, this polymorphism also correlated with posttransplantation CD8<sup>+</sup> cell counts only in patients exposed to CMV. We should acknowledge that the retrospective design and the lack of analysis of the specific anti-CMV response constitute important limitations of our work. Nonetheless, we feel that these results along with those of the genetic study should encourage further exploration of the role of CMV-specific CD8<sup>+</sup> cell exhaustion in long term graft survival. The fact that we did not assess intragraft CMV replication by sensitive techniques in

biopsies might appear as a limitation. However in our opinion, this strategy has important limitations for many reasons, intrinsic to the biology of the virus. CMV reactivations within a tissue are known to be transient and patchy and may leave behind durable and nonspecific histological scars, making it difficult to establish a causal relationship by histopathology or even PCR tests. In addition, reactivation occurring after the first year, when biopsies are seldom performed, will remain largely unrecognized. Hence, strategies based on analyzing intragraft viral replication in kidneys besides being costly and invasive are likely to lead to misclassification bias and failure to evidence the role of CMV in long-term graft survival. If indeed risk of severe acute infection (i.e. efficiently prevented by drug prophylaxis) is greater for naïve kidney recipients (R<sup>-</sup>) than R<sup>+</sup> recipients, our results suggest that in contrast, these naïve recipients might have better control over chronic infections. This finding highlights that acute and chronic infections are distinct pathogenic processes with different rules for both the pathogen and the host, as was shown in other experimental models (41).

Finally, we identified full HLA-I mismatch as a major risk factor in the detrimental effects associated with CMV seropositivity of the donor. This result might be explained by the fact that memory CD8<sup>+</sup> T cells from R<sup>+</sup> recipients are restricted to their HLA class I and are therefore poorly able to clear viral replication in full HLA-I mismatched target cells of donors, especially endothelial cells. Indeed, those recipients may have some difficulties to generate new CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells able to recognize CMV peptides presented by fully allogeneic class I. So, poor ability of T cells to control intragraft CMV replication could favor graft injuries especially the development of vasculopathy. Therefore, our data suggest that full HLA-I mismatch should be avoided in R<sup>+</sup> patients receiving a kidney from a CMV-infected donor.

In summary, we report that positive CMV serology in the donor was an independent risk factor for graft loss, especially in R<sup>+</sup> recipients with full HLA class I mismatch, even in antigenemia-free patients. Moreover, R<sup>+</sup> recipients with marked posttransplantation reduction of the CD8<sup>+</sup> cell count had the lowest graft survival. These results may lead to improve organ allocation strategies in order to prevent CMV-associated chronic allograft dysfunction.

## Acknowledgments

We thank Laura Smales for editing the manuscript.

**Funding source:** None.

## Disclosures

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

## References

- Staras SA, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988–1994. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 1143–1151.
- Davison AJ, Dolan A, Akter P, et al. The human cytomegalovirus genome revisited: Comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol* 2003; 84: 17–28.
- Soderberg-Naucler C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 1997; 91: 119–126.
- Reeves MB, MacAry PA, Lehner PJ, Sissons JG, Sinclair JH. Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 4140–4145.
- Soderberg-Naucler C. HCMV microinfections in inflammatory diseases and cancer. *J Clin Virol* 2008; 41: 218–223.
- Simon CO, Holtappels R, Tervo HM, et al. CD8 T cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. *J Virol* 2006; 80: 10436–10456.
- Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 1995; 333: 1038–1044.
- Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 2005; 202: 673–685.
- Quigley M, Pereyra F, Nilsson B, et al. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med* 2010; 16: 1147–1151.
- Ouyang Q, Wagner WM, Voehringer D, et al. Age-associated accumulation of CMV-specific CD8+ T cells expressing the inhibitory killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1). *Exp Gerontol* 2003; 38: 911–920.
- Ouyang Q, Wagner WM, Wikby A, et al. Large numbers of dysfunctional CD8+ T lymphocytes bearing receptors for a single dominant CMV epitope in the very old. *J Clin Immunol* 2003; 23: 247–257.
- Ouyang Q, Wagner WM, Zheng W, Wikby A, Remarque EJ, Pawelec G. Dysfunctional CMV-specific CD8(+) T cells accumulate in the elderly. *Exp Gerontol* 2004; 39: 607–613.
- Mattes FM, Vargas A, Kopycinski J, et al. Functional impairment of cytomegalovirus specific CD8 T cells predicts high-level replication after renal transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 990–999.
- Hadrup SR, Strindhall J, Kollgaard T, et al. Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality and an increased number of dysfunctional cytomegalovirus-specific T cells in the very elderly. *J Immunol* 2006; 176: 2645–2653.
- Antoine P, Ollislaegers V, Huygens A, et al. Functional exhaustion of CD4+ T lymphocytes during primary cytomegalovirus infection. *J Immunol* 2012; 189: 2665–2672.
- Fletcher JM, Vukmanovic-Stejic M, Dunne PJ, et al. Cytomegalovirus-specific CD4+ T cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion. *J Immunol* 2005; 175: 8218–8225.
- Li L, Chaudhuri A, Weintraub LA, et al. Subclinical cytomegalovirus and Epstein-Barr virus viremia are associated with adverse outcomes in pediatric renal transplantation. *Pediatr Transplant* 2007; 11: 187–195.
- Streblov DN, Orloff SL, Nelson JA. Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 577–582.
- Freeman RB, Jr. The 'indirect' effects of cytomegalovirus infection. *Am J Transplant* 2009; 9: 2453–2458.
- Grattan MT, Moreno-Cabral CE, Starnes VA, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE. Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *JAMA* 1989; 261: 3561–3566.
- Snyder LD, Finlen-Copeland CA, Turbyfill WJ, Howell D, Willner DA, Palmer SM. Cytomegalovirus pneumonitis is a risk for bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 1391–1396.
- Paraskeva M, Bailey M, Levvey BJ, et al. Cytomegalovirus replication within the lung allograft is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant* 2011; 11: 2190–2196.
- Johnson RJ, Clatworthy MR, Birch R, Hammad A, Bradley JA. CMV mismatch does not affect patient and graft survival in UK renal transplant recipients. *Transplantation* 2009; 88: 77–82.
- Schnitzler MA, Lowell JA, Hardinger KL, Boxerman SB, Bailey TC, Brennan DC. The association of cytomegalovirus sero-pairing with outcomes and costs following cadaveric renal transplantation prior to the introduction of oral ganciclovir CMV prophylaxis. *Am J Transplant* 2003; 3: 445–451.
- van Ree RM, de Vries AP, Zelle DM, et al. Latent cytomegalovirus infection is an independent risk factor for late graft failure in renal transplant recipients. *Med Sci Monit* 2011; 17: 609–617.
- Kyllonen L, Kahu J, Salmela K. Kidney transplantation from 1119 deceased donors in Finland, 1991 to 2003: Impact of donor factors. *Transplant Proc* 2005; 37: 3248–3252.
- Smith JM, Corey L, Bittner R, et al. Subclinical viremia increases risk for chronic allograft injury in pediatric renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1579–1586.
- Reischig T, Jindra P, Hes O, Bouda M, Kormunda S, Treska V. Effect of cytomegalovirus viremia on subclinical rejection or interstitial fibrosis and tubular atrophy in protocol biopsy at 3 months in renal allograft recipients managed by preemptive therapy or antiviral prophylaxis. *Transplantation* 2009; 87: 436–444.
- Helanterä I, Koskinen P, Finne P, et al. Persistent cytomegalovirus infection in kidney allografts is associated with inferior graft function and survival. *Transpl Int* 2006; 19: 893–900.
- 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: 1879–1883.
- Giral M, Nguyen JM, Daguin P, et al. Mycophenolate mofetil does not modify the incidence of cytomegalovirus (CMV) disease after kidney transplantation but prevents CMV-induced chronic graft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1758–1763.
- Erdbruegger U, Scheffner I, Mengel M, et al. Impact of CMV infection on acute rejection and long-term renal allograft function: A systematic analysis in patients with protocol biopsies and indicated biopsies. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 27: 435–443.
- Dal Canto AJ, Swanson PE, O'Guin AK, Speck SH, Virgin HW. IFN-gamma action in the media of the great elastic arteries, a novel immunoprivileged site. *J Clin Invest* 2001; 107: 15–22.
- Roland M, Gatault P, Al-Najjar A, et al. Early pulse pressure and low-grade proteinuria as independent long-term risk factors for new-onset diabetes mellitus after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 1719–1728.
- Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation. modification of diet in renal disease study group. *Ann Intern Med* 1999; 130: 461–470.



36. Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM, Jr., Spitzer A. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics* 1976; 58: 259–263.
37. Khan N, Hislop A, Gudgeon N, et al. Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: Cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. *J Immunol* 2004; 173: 7481–7489.
38. Liapis H, Storch GA, Hill DA, Rueda J, Brennan DC. CMV infection of the renal allograft is much more common than the pathology indicates: A retrospective analysis of qualitative and quantitative buffy coat CMV-PCR, renal biopsy pathology and tissue CMV-PCR. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 397–402.
39. Hughes D, Hafferty J, Fulton L, et al. Donor and recipient CMV serostatus and antigenemia after renal transplantation: An analysis of 486 patients. *J Clin Virol* 2008; 41: 92–95.
40. 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: 329–337.
41. Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. Redefining chronic viral infection. *Cell* 2009; 138: 30–50.
42. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 2011; 12: 492–499.

### Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

**Table S1:** Risk of graft loss in 1279 patients

**Figure S1:** Number of CD8<sup>+</sup> and NK cells at 2 years after transplantation by donor and recipient CMV serostatus.

## Annexe 6: Article en soumission

**Strong association between polymorphism in the Programmed Cell Death-1 gene and CMV-associated graft failure in renal and in lung transplantation: correlation with CMV-immune response.**

\*Catherine Forconi MSc<sup>1</sup>, \*Dr Philippe Gatault MD<sup>1,2,3</sup>, Prof Jean-Michel Halimi MD<sup>1,2</sup>, Dr Louis Prat MD<sup>1,2</sup>, Dr Thomas W. Hoffmann PhD<sup>1</sup>, Prof Marc Stern MD<sup>4</sup>, Prof Romain Guillemain MD<sup>5</sup>, Prof Antoine Magnan MD<sup>6</sup>, Dr Caroline Suberbielle PhD<sup>7</sup>, Dr Emeline Masson PharmD<sup>7</sup>, Dr Anne Cesbron-Gautier PhD<sup>8</sup>, Dr Catherine Gaudy-Graffin PharmD<sup>9,10</sup>, Prof Alain Goudeau MD<sup>9,10</sup>, Dr Gilles Thibault PharmD<sup>3,11</sup>, Jean-Frédéric Marlière BSc<sup>2</sup>, Roseline Guibon<sup>1</sup>, Prof Yvon Lebranchu MD<sup>1,2</sup>, Prof Matthias Büchler MD<sup>1,2</sup>, Prof Christophe Baron MD<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>: EA4245 Dendritic Cells, Immunomodulation and Grafts, Tours University, 10 Boulevard Tonnelle, 37032 Tours France. <sup>2</sup>: Department of Nephrology and Clinical Immunology, CHRU Tours, 2 Boulevard Tonnelle, 37032 Tours France. <sup>3</sup>: Laboratory of Immunology, CHRU de Tours, 2 Boulevard Tonnelle, 37032 Tours, France. <sup>4</sup>: Pneumology and Lung Transplant Unit, FOCH hospital, 40 rue Worth 92151 Suresnes, France <sup>5</sup>: Department of Thoracic Surgery and Lung Transplant, HEGP hospital, 20 rue Leblanc 75908 Paris, France. <sup>6</sup>: INSERM UMR 915, Institut du Thorax, IRT-UN, Boulevard Jacques Monod 44093 Nantes, France. <sup>7</sup>: Laboratory of Immunology and Histocompatibility, Saint-Louis hospital, APHP, 1 avenue Claude Vellefaux 75010 Paris, France. <sup>8</sup>: Laboratory of Histocompatibility, National Blood Bank, 34 Boulevard Jean Monnet 44000 Nantes, France. <sup>9</sup>: Laboratory of Bacteriology and Virology, CHRU de Tours, 2 Boulevard Tonnelle, 37032 Tours, France. <sup>10</sup>: INSERM U966, Tours University, 10 Boulevard Tonnelle, 37032 Tours France. <sup>11</sup>: CNRS UMR 7292; Genetics; Immunotherapy; Chemistry and Cancer; Tours University, 10 Boulevard Tonnelle, 37032 Tours France.

\*Catherine Forconi and Philippe Gatault have equally contributed to this work

**Keywords:** Cytomegalovirus, Renal and Lung Transplantation, PDCD1 polymorphism, Graft survival, Clonal Exhaustion.

\*Catherine Forconi MSc<sup>1</sup> [catherine.forconi@etu.univ-tours.fr](mailto:catherine.forconi@etu.univ-tours.fr), \*Dr Philippe Gatault MD<sup>1,2,3</sup> [philippe.gatault@univ-tours.fr](mailto:philippe.gatault@univ-tours.fr), Prof Jean-Michel Halimi MD<sup>1,2</sup> [halimi@med.univ-tours.fr](mailto:halimi@med.univ-tours.fr), Dr Louis Prat MD<sup>1,2</sup> [louis.prat-2@etu.univ-tours.fr](mailto:louis.prat-2@etu.univ-tours.fr), Dr Thomas W. Hoffmann PhD<sup>1</sup> [thomas.hoffmann@hotmail.fr](mailto:thomas.hoffmann@hotmail.fr), Prof Marc Stern MD<sup>4</sup> [stern.houssaye@wanadoo.fr](mailto:stern.houssaye@wanadoo.fr), Prof Romain Guillemain MD<sup>5</sup> [romain.guillemain@egp.aphp.fr](mailto:romain.guillemain@egp.aphp.fr), Prof Antoine Magnan MD<sup>6</sup> [antoine.magnan@univ-nantes.fr](mailto:antoine.magnan@univ-nantes.fr), Dr Caroline Suberbielle PhD<sup>7</sup> [caroline.suberbielle@sls.aphp.fr](mailto:caroline.suberbielle@sls.aphp.fr), Dr Emeline Masson PharmD<sup>7</sup> [emeline.masson@sls.aphp.fr](mailto:emeline.masson@sls.aphp.fr), Dr Anne Cesbron-Gautier PhD<sup>8</sup> [Anne.Cesbron@efs.sante.fr](mailto:Anne.Cesbron@efs.sante.fr), Dr Catherine Gaudy-Graffin PharmD<sup>9,10</sup> [catherine.gaudy-graffin@univ-tours.fr](mailto:catherine.gaudy-graffin@univ-tours.fr), Prof Alain Goudeau MD<sup>9,10</sup> [alain.goudeau@univ-tours.fr](mailto:alain.goudeau@univ-tours.fr), Dr Gilles Thibault PharmD<sup>3,11</sup> [gilles.thibault@univ-tours.fr](mailto:gilles.thibault@univ-tours.fr), Jean-Frédéric Marlière BSc<sup>2</sup> [jf.marliere@chu-tours.fr](mailto:jf.marliere@chu-tours.fr), Roseline Guibon<sup>1</sup> [roseline.guibon@univ-tours.fr](mailto:roseline.guibon@univ-tours.fr), Prof Yvon Lebranchu MD<sup>1,2</sup> [lebranchu@med.univ-tours.fr](mailto:lebranchu@med.univ-tours.fr), Prof Matthias Büchler MD<sup>1,2</sup> [buchler@med.univ-tours.fr](mailto:buchler@med.univ-tours.fr), Prof Christophe Baron MD<sup>1,2</sup> [christophe.baron@univ-tours.fr](mailto:christophe.baron@univ-tours.fr).

**Corresponding author:**

Prof Christophe Baron, MD-PhD

Service de Néphrologie et Immunologie Clinique

CHRU Bretonneau

2, Bd Tonnellé. 37044 Tours cedex 9

Phone: +33 (0) 2 47 47 72 63

Fax: +33 (0) 2 47 47 89 01

E-mail: [christophe.baron@univ-tours.fr](mailto:christophe.baron@univ-tours.fr)

**Conflicts of interests:**

The authors declare no competing financial interests.

**Role of the funding source:**

This study was supported by the association VLM (Vaincre-La-Mucoviscidose) and the programme FEDER (Fonds-Européens-de-DEveloppement-Régional). The funders had permitted the data collection but they had no role in study design, data analysis, decision to publish and preparation of the manuscript. I, Christophe Baron, affirm to have full access to all the data in the study and to have final responsibility for the decision to submit for publication.

**Acknowledgments:**

We would like to thank all the transplanted patients and all the persons who have contributed to this project, Julien Chauveau, Samuel Smith and Laura Smales for English editing.

## Abstract

**Background** Cytomegalovirus (CMV) infection has been associated with chronic allograft dysfunction in lung and kidney transplant patients, but no genetic risk factor has yet been identified. Programmed cell death 1 (PD-1) is crucial in CMV-specific T cell exhaustion. A single nucleotide polymorphism (SNP), rs11568821 (G to A substitution; PD1.3), in *PDCD-1* gene has been associated with decreased PD-1 function. **Objective** We investigated whether this SNP was associated with risk of CMV-associated graft loss in kidney and lung transplantation and the anti-CMV immune response. **Design and Participants** We studied the PD-1.3 SNP and graft survival in recipients of organs from CMV-positive donor (D+) and in patients for which donor were seronegative for CMV (D-) from a monocentric cohort of 1119 kidney transplant patients and in a multi-centric cohort of 182 lung transplant patients. We also explored CD8<sup>+</sup> T-cell subpopulation according to the genotype and the CMV-specific immune response in a case-control study in homozygous patients. **Results** Multivariate analysis of D+ patients revealed that the carriers of the A allele were strongly protected against kidney graft failure (hazard ratio: 0.381, 95% CI 0.209–0.696; p=0.0017) and against death for lung transplant patients (HR: 0.305, 95% CI 0.128–0.716; p=0.006); in the D- SNP alleles were not associated with outcome in either setting (p=0.486 and p=0.798 for kidney and lung transplant, respectively). CMV-driven increased of the CD8<sup>+</sup>-cell count was greater with the A allele than GG genotypes (164±215 vs. 85±131%; p=0.034), and the interferon  $\gamma$ -producing T-cell response to CMV peptides was greater with the AA than matched GG wild-type genotypes (3343±1556 vs 1295±1192 spots/10<sup>6</sup> PBMC, p=0.003, **Interpretation** We identified a strong association between polymorphism in *PDCD-1* gene and CMV-specific immune response and CMV-associated graft loss in renal and lung transplantation. These findings may help improve the strategy to limit the indirect sequelae of CMV that continue, perhaps surprisingly, to dampen the enduring success of organ transplantation.

**Fundings** Vaincre-La-Mucoviscidose (VLM) and Fond-Européen-DEveloppement-Régional (FEDER).

## **Introduction**

Cytomegalovirus (CMV) is a leading cause of infection after organ transplantation, especially in lung transplant patients. Up to 60% to 100% of the worldwide adult population is infected with this double-stranded DNA herpes virus. The virus establishes a life-long infection characterized by phases of latency punctuated by periodic reactivation<sup>1</sup>. In animal models of transplantation, the alloimmune response triggers productive replication of the virus<sup>2</sup> inside the graft through activation of the NF- $\kappa$ B pathway, which in turn induces local inflammation<sup>3</sup>. Hence, CMV infection promotes chronic allograft dysfunction<sup>4</sup> and can break tolerance in animal models.

Despite the exquisite adaptation of the virus to its host, chronic CMV infection still elicits challenging morbidity and mortality in humans<sup>5</sup>, particularly in lung transplant patients. CMV pneumonitis increases the risk of bronchiolitis obliterans syndrome<sup>6</sup> (BOS) and the detection of CMV DNA in bronchoalveolar fluids has been associated with BOS regardless of tissue-invasive disease<sup>7</sup>. Furthermore, in a recent study, only 32% of patients with CMV disease survived 10 years after lung transplantation<sup>8</sup>. In kidney transplantation, several studies reported CMV as a risk factor of kidney interstitial fibrosis/tubular atrophy<sup>9</sup> and persistent active CMV replication in the human kidney decreasing graft survival<sup>10</sup>. Furthermore, we have recently reported that CMV infection of the donor (referred to as D+ thereafter in the text) was an independent risk factor of graft failure<sup>11</sup>, in agreement with other human clinical studies<sup>10 12 13</sup> and with animal transplantation models. These chronic pathogenic effects of CMV are likely due to a metastable equilibrium between local periodic reactivations inside the graft and the host local immune response. A recent study showed CMV replication in all organs of seropositive donor examined<sup>14</sup>. Furthermore, we recently reported that HLA class I mismatch increases the detrimental impact of receiving a kidney from a CMV positive donor suggesting that the CMV-infected recipient's cells of Class I HLA-mismatched seropositive

donors were poorly accessible to recipient's CD8<sup>+</sup> T cell responses<sup>11</sup>. This was confirmed by a recent study<sup>14</sup>. These data together strongly suggested that immune response to CMV impacted graft survival. The T-cell compartment in humans comprises a great number of CMV-specific T cells<sup>15</sup>. However, over time, chronic persistence of CMV increases the number of dysfunctional CMV-specific T cells<sup>16-18</sup> that are continuously driven to replicative exhaustion<sup>16 19</sup> eventually causing their apoptosis<sup>19 20</sup>. In this context, we have recently reported that a post-transplantation reduction of the CD8<sup>+</sup> cell count increased the risk of CMV-associated graft failure<sup>11</sup>, especially when both donor and recipient were infected prior to the graft (D+R+). This inability to increase the CD8<sup>+</sup> count in response to CMV reactivation might indicate a process of clonal exhaustion leading to a poor ability to control chronic CMV replication within the graft. In recent years, programmed cell death 1 (PD-1) was revealed as a crucial player in the attrition of human CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells<sup>19</sup> and in exhaustion of HIV-specific T cells<sup>21 22</sup>. Hence, PD-1 has been found involved in the clinical control of HIV infection<sup>22</sup> and in CMV infection in kidney<sup>23</sup> and liver transplantation<sup>24</sup>. An intronic single nucleotide polymorphism (SNP) (G to A substitution; rs11568821) in *PDCD-1* gene disrupts the binding of the transcription factor Runx1 and has been found associated with reduced transcriptional activity of the gene<sup>25</sup> as well as decreased inhibitory function in T cells<sup>26 27</sup>.

In this study, we tested the hypothesis whether this SNP might be associated with the risk of CMV-associated graft failure in recipients of CMV-positive grafts (D+ recipients) and with anti CMV immune response. To test this hypothesis, we studied the association of this SNP and graft survival by CMV serostatus of the donor in a kidney transplant cohort and verified the association in a lung transplant cohort. Finally to better understand the relationship, we also analyzed the association of the SNP and the post-transplantation CD8<sup>+</sup>-cell subpopulation and the CMV-specific immune response in kidney transplant patients.



## **Patients and Methods**

### **Patients and design of the retrospective study**

The DNA samples of kidney and lung transplant patients were obtained after patients gave their signed informed consent. Collection of DNA samples and the study received ethic committee approval by the Comité de Protection des Personnes Tours-Région Centre ouest<sup>1</sup>. The study included patients who underwent kidney transplantation between 1985 and 2008 in Tours, France. We separately analyzed data for patients at high risk of post-transplantation CMV (ie, who received a kidney from a CMV-infected donor [D+]) and low risk (ie recipients of CMV-negative donor [D-]). All D+R- kidney transplant patients received prophylaxis with a weekly infusion of immunoglobulin therapy for one month (from 1985 to 1994), aciclovir or valaciclovir (1995 to 2003) or valganciclovir (2004 to 2008) for 3 months. Patients with a lower risk of CMV disease (pre-transplantation CMV-positive recipients [R<sup>+</sup>]) received preemptive therapy based on CMV-antigenemia assessment. The following variables were recorded for kidney transplant patients: type of donor (living or deceased), CMV serology, age and gender of the recipient and donor, the cause of the renal disease, graft rank, number of class I (-A, -B) and class II (-DR) HLA mismatches, immunosuppressive treatments, cold ischemia time, delayed graft function (dialysis during the first week post transplantation), occurrence of CMV antigenemia and acute rejection.

Among the 1280 transplantations performed during the study period, there were 561 D+ and 719 D- recipients. DNA samples were available for 1119 of these patients (486 D+ and 633 D-) and the mean duration of follow-up time post-transplantation is seven years. Among these patients studied, 19% of patients returned to dialysis and 9% died. We also performed subgroup analysis in light of the evolution in CMV therapeutic strategies and diagnostics that took place during the period 1996-1997. At that time pp65 antigenemia was introduced for routine monitoring of CMV infection and mycophenolate mofetil replaced azathioprine. As

well, gancyclovir was initiated as treatment of CMV infection. Therefore, we analyzed data for patients who received transplants from 1985 to 1995 (n=116 D+, n=176 D-) and from 1996 to 2008 (n=370 D+, n=457 D-). There was no missing data for all the patients. Then, we established a multicenter replication study of 182 patients (n=86 D+ and n=96 D-) who underwent lung transplantation between 1992 and 2009 at 3 different centers in France (Hopital Européen Georges Pompidou, Paris; FOCH hospital, Suresnes; and Nantes hospital). The following variables were recorded for lung transplantation: CMV serology, age and gender of the recipient, graft rank, cause of the lung disease, type of transplanted organs and immunosuppressive treatments.

Phenotypic analyses of lymphocytes were performed by flow cytometry according to standard whole blood procedure (FACStar plus, Becton Dickinson or an EPICS-XL-MCL, Beckman Coulter). CD8<sup>+</sup> cell counts were recorded at day 0 (D0), and year 2 since 1996. For each patient, the extent of variation of the CD8<sup>+</sup> cell count at year 2 was calculated as:  $100 \times \frac{[2\text{-year CD8}^+] - [\text{baseline-CD8}^+]}{[\text{baseline-CD8}^+]}$ .

### **Diagnosis of CMV infection**

From 1984 to 1994 diagnosis of systemic CMV infection relied on optimized CMV culture on MRC5 human cells with indirect immunofluorescence plaque staining using E13 mouse monoclonal antibody directed to CMV protein IE1 72. Stained nuclei were observed after 24h and 48h incubation. CMV antigenemia (CMV-Ag) was added in 1995 as a more rapid and direct evaluation of CMV viremia. Briefly, after lysis of red cells, leucocytes of the patient were collected, standardized to 10<sup>6</sup> cells/ml and cytocentrifuged on a spot slide. Then, indirect immunofluorescence assay was performed with mouse monoclonal antibodies C10 and C11 directed to the early CMV protein pp65. The number of stained-polynuclear cells per 2.10<sup>5</sup>

leucocytes was recorded. Weekly CMV-antigenemia monitoring was performed during 4 and 6 months following transplantation in R+ and D+R-, respectively.

### **Characterization of the *PDCD-1* SNP**

Patients underwent genotyping for the PD-1.3 SNP (rs11568821) by oligonucleotide ligation assay<sup>28</sup>. PCR involved the primer sequences, forward, 5'CCAGGCAGCAACCTCAATC3', and reverse, 5'GTCCCCCTCTGAAATGTCC3'. Then, the PCR product was split into 2 ligation solutions containing a "trap probe" specific for the wild-type allele (5'CGGTCGACGAGCTGCCGCGCAAGATGCACCCCCGAGACC3') or the variant allele (5'CGGTCGACGAGCTGCC-GCGCAAGATGCACCCCCGAGACT3') and an FITC-labeled reporting probe (5'GCAGGTGGGCTG3'). The trap probe was captured to fluorescent beads for analysis by flow cytometry (FACScanto, BD).

### **Case-control study for in vitro analysis of the CMV-specific immune response**

We designed a case-control study to analyze the anti-CMV immune response with the SNP in kidney transplant recipients. We included patients with only homozygous alleles (AA or GG) with a functioning graft at the time of analysis and who were infected with CMV before transplantation (R+ recipients). Each carrier of the homozygous variant allele AA was matched with 2 carriers of homozygous wild-type alleles GG by donor CMV serologic status, recipient age at transplantation +/-8 years, year of transplantation +/-5 years, anti globulin at time of transplantation and current drugs taken by the patient at the time of blood sampling (CNI or not). Freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC, 10<sup>5</sup>) from patients were incubated for 24h at 37°C with human CMV peptides Peptivator CMV-pp65 130-093-438; Miltenyi Biotec) in 96-well plates pre-coated with interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ; Mabtech 3420-2APW-10 Human IFN $\gamma$  ELISpot PRO kit). Analysis was by use of ImmunoSpot Counter

(CTL-ImmunoSpot S6 FluoroSpot line, Cleveland, OH, USA). The numbers of spots (reported as per million PBMC) were compared for patients with AA and GG genotypes.

### **Statistical analysis**

Qualitative and quantitative data were compared using chi-square or Mann-Whitney tests respectively. Kaplan Meier curves were used to estimate the predictive value of polymorphism on uncensored graft survival (death or end-stage renal disease [ESRD]), patient survival (ESRD was censored) and death-censored graft survival. End of follow-up in kidney transplant patients was defined as death (with a functioning graft) or ESRD (ie, dialysis or re-transplantation) or lost to follow-up (2 kidney transplant patients were lost to follow-up). Log-rank tests were used to compare survival for carriers of GA or AA and GG alleles. In addition, we used univariate and multivariate Cox regressions. Results were expressed with hazard ratios (HR), 95% confidence intervals (95% CI) and p values.

We also analyzed the SNP in an independent cohort of lung transplant patients. Because CMV has a strong impact on survival in heart–lung and lung transplant recipients, we expected a greater number of CMV-related events in these patients. Given the results in kidney recipients and assuming a slightly weaker HR, we estimated that we would achieve sufficient power with analysis of about 90 lung transplantations with CMV-infected donors (risk  $\beta = 0.2$ , risk  $\alpha = 0.05$ ). In lung transplant patients only patient survival was analyzed and no patients were lost to follow-up. Statistical analyses were performed using SAS v9.1 (SAS Inst., Cary, NC, USA), a  $p < 0.05$  was considered significant.

## **Results**

### **PD-1.3 genotypes by demographic characteristics of study populations**

The genotyping success rate exceeded 98% for both transplantation cohorts. The frequency of the A allele was 13% and 13.7% for kidney and lung transplant patients, respectively. There was no evidence to reject the assumption of Hardy-Weinberg equilibrium ( $p>0.05$ ). Carriers of the variant allele (GA or AA) compared to patients with the wild-type homozygous allele (GG) did not differ by demographic characteristics with CMV high or low risk for kidney or lung transplant patients (Tables 1 and 2).

### **PD-1.3 SNP is strongly associated with graft survival in recipients of CMV-positive kidneys**

We have recently reported that D+ recipients have an increased risk of graft failure and that the immune response might modulate this risk<sup>10 12 13</sup>. The involvement of PD-1 in CMV-specific CD8<sup>+</sup> T-cell dysfunction<sup>19 22</sup> led us to investigate whether a polymorphism in PD-1 gene might be associated with risk of kidney graft loss in these D+ recipients. Thus, we analyzed *PDCD-1* polymorphism for 486 D+ and for 633 D- patients from a single center. Among D+ and D- recipients, end stage renal disease occurred with 107 and 112 patients respectively, while death occurred with 38 and 65 patients, respectively during follow-up. The PD-1.3 SNP was significantly associated with graft survival ( $p=0.006$ ) for D+ patients, with lower graft survival for GG than A carriers (GA or AA) (Figure 1). The SNP was significantly associated with death-censored graft survival ( $p=0.001$ , Figure 1) but was not associated with patient survival ( $p=0.993$ , Figure 1).

After adjustment for donor and recipient age, acute rejection, and HLA mismatch, multivariate analysis revealed that the A allele of the SNP remained a strong and independent protective factor for graft failure for D+ patients (HR: 0.381, 95% CI 0.209–0.696;

p=0.0017). In contrast, for recipients at low risk of CMV (*i.e* D- recipients), graft survival did not differ by genotype (p=0.486, Figure 1). Of note the results were similar for D-R+ and D-R- (data not shown). Interestingly, in dividing D+ patients by period of transplantation (1985 to 1995 and 1996 to 2008), the association of the PD-1.3 SNP and death-censored graft survival remained significant for D+ recipients in both cohorts (p=0.014 and p=0.022, respectively, Figure 2). Multivariate analysis demonstrated that the SNP remained an independent risk factor in both periods (HR: 0.336, 95% CI 0.132–0.851; p=0.021 and HR: 0.421, 95% CI 0.190–0.934, p=0.033 for 1985-1995 and 1996-2008 periods, respectively). Thus, the association was strong and robust in kidney transplant patients receiving a CMV-positive organ regardless of the period of transplantation.

### **PD-1.3 SNP is associated with patient survival in recipients of CMV-positive lungs**

To validate our results for kidney transplant patients, we analyzed the SNP in an independent cohort of lung transplant patients. We carried out a multicentric study which included 86 D+ and 96 D- patients who underwent lung transplantation from 3 centers in France. For D+ patients, survival was better for carriers of the A than GG allele (Figure 3, HR: 0.305, 95% CI 0.128–0.716; p=0.006); for patients at low risk of CMV (D-), survival did not differ by genotype (p=0.798, Figure 3). Because of lack of data for acute rejection and donor HLA typing, for many patients, statistical adjustment for these parameters was not appropriate. However, after adjustment for recipient age, multivariate analysis revealed that the A allele strongly protected against death in D+ patients, (HR: 0.302, 95% CI 0.128–0.716; p=0.006, A vs GG). Interestingly, HRs were similar for both types of transplantation and when combining data for kidney and lung transplant patients, the association was highly significant (HR: 0.384, 95% CI 0.235–0.628; p=0.0001). Thus, the results of this multicenter lung transplant study confirmed those obtained for the kidney transplant patients and indicate that the PD-1.3

SNP is an independent and robust risk factor of graft loss for patients who received organs from CMV-infected donors (HR=0.38, 95% CI 0.23-0.62; p=0.0001 when kidney and lung transplant patients are combined).

### **Post-transplant CMV-driven expansion of the CD8<sup>+</sup> cell count is greater in A carriers than in GG**

This robust clinical association with a SNP in a gene involved in viral-specific T-cell immune exhaustion prompted us to further explore whether this SNP might be associated with the anti-CMV immune response. We retrospectively analyzed the individual evolution of the CD8<sup>+</sup>-cell count between day 0 and 2 years after kidney transplantation in D+ patients who replicated CMV during the first year post-transplantation (as assessed by pp65 antigenemia, D+Ag<sup>+</sup><sub>pp65</sub>) and in D-R- patients. CD8<sup>+</sup>-cell counts on both day 0 and 2 years after transplantation were available for 211 patients (90 D+ Ag<sup>+</sup><sub>pp65</sub> and 121 D-R-). We found that the mean variation in CD8<sup>+</sup> cell count was much greater for D+ Ag<sup>+</sup><sub>pp65</sub> than D-R- recipients (110±159% vs. -6±55%, p<0.0001; Figure 4A). This indicated that CMV replication during the first year post-transplantation drove a massive and long-lasting increased of the CD8<sup>+</sup>-cell count. Then we analyzed this individual parameter by the PD-1 SNP. For D+ Ag<sup>+</sup><sub>pp65</sub> patients, expansion of the CD8<sup>+</sup>-cell count was significantly greater for A than GG allele carriers (164±215% vs. 85±131%; p=0.034, Figure 4B), but for D-R- patients, expansion did not differ by allele (-0.8±55% vs 12±80% p=ns, Figure 4B). Of note, for D+ Ag<sup>+</sup><sub>pp65</sub> patients, A and GG carriers were similar in age (48 vs. 50 years, p=0.65) and in polyclonal anti-lymphocyte globulins treatments (52% vs 54%, p=0.85).

### **Greater number of CMV-responding T cells in AA homozygous subjects than in GG**

The aforementioned results suggested that this SNP might be associated with the magnitude of the CMV-specific immune response. To have a deeper insight into CMV-specific immune response, we assessed the number of IFN- $\gamma$ -producing T cells responding to CMV pp65 peptides in kidney transplant patients. We analyzed carriers of homozygous alleles to maximize the likelihood to reveal differences in a small number of patients. As the long-term persistence of CMV infection causes the accumulation of impaired CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells<sup>16-18</sup>, we analyzed data for patients infected prior to transplantation ie, a long time before the analysis took place. Finally, to increase the efficiency of the study, we performed individual matching on clinical variables likely to influence the anti-CMV immune response as described in the method section. Hence, we included all R+ patients who were homozygous AA carriers and who were still being followed in our transplant unit (n=7), then each AA patient was matched with 2 GG patients in a case-control study. Because of their large number, all matching criteria were not fully met. Thus, among the 21 patients, one matching criterion was not complied for 4 patients: age at transplantation for one patient, CNI at time of transplantation for 2 patients and year of transplantation for 1 patient (characteristics of each group are presented in table 3). The figure 4 indicates that the number of IFN- $\gamma$ -producing cells responding to pp65 peptides per 10<sup>6</sup> PBMC was significantly higher for AA than paired GG carriers with otherwise similar clinical characteristics (3343 $\pm$ 1556 vs 1295 $\pm$ 1192/million cells, p=0.003, Figure 4C). Analysis of the number of spots per 10<sup>6</sup> lymphocytes gave similar results (4980 $\pm$ 2104 vs 1929 $\pm$ 1995, p=0.006)



## Discussion

We have recently reported that CMV infection of kidney graft donors was an independent risk factor of graft failure<sup>11</sup>, in agreement with other human clinical studies<sup>10 12 13</sup> and with animal transplantation models. The risk factors (especially genetic) of developing CMV-associated graft failure remain largely unknown. The present study reports a strong and robust association of a polymorphism in *PDCD-1* gene and graft survival for subjects who received organ transplants from CMV-infected donors. These results were first obtained in kidney transplant patients regardless of the period of transplantation and replicated in lung recipients, with similar HRs thus conferring a strong credibility to this clinical association. Of note, in terms of graft survival, only a few gene-association studies have had results replicated and none have had results replicated in 2 different organ settings. The lack of association in D-R- patients strongly suggested that CMV played a crucial role in the association. This was further reinforced by showing the association between the SNP and the anti-CMV immune response which helps in understanding the biological mechanisms underlying the association. We first demonstrated, in D+ recipients, that occurrence of positive CMV pp65-antigenemia during the first post-transplant year was the major determinant of the CD8<sup>+</sup> cell count at 2 years. Then, we found that A allele carriers showed higher rate CD8<sup>+</sup> cell count expansion than GG carriers while there was no significant differences in D-R- patients, indicating that the difference between A and GG carriers was truly mediated by CMV. This result together with those of the case control study in homozygous AA and matched GG-carriers suggested a more robust T-cell response to CMV in A allele carriers. Hence, these results were compatible with increased PD-1 activity in CMV-specific T cells from GG patients and substantiate the hypothesis that A carriers would be more resistant to CMV-mediated exhaustion than their GG counterparts and may retain robust ability for longer control of CMV replication within organ transplants. This may account for the reduced incidence of CMV-associated graft loss

in A carriers. Of note, the association between the SNP and graft survival was stronger in D+R+ than D+R- (data not shown) in accordance with weaker ability of R+ patients to control chronic effects CMV that might be due to the accumulation of more exhausted T cells in D+R+ than in D+R-, the latter having been infected at more recently. These results, by suggesting a link between the CMV-specific immune response and CMV-associated allograft failure, may encourage to serially monitor the CMV-specific immune response over the long term instead of assessing viral replication in the allograft which may very transient. However, so far most of these evaluations have been limited to short-term studies (during the first year) and mainly to predict direct effects such as CMV disease or early CMV viremia<sup>29</sup>. Nonetheless, the role of the recipient's CMV-specific immune response in modulating the long-term detrimental effect of CMV is not yet known.

We have previously reported that R+ recipients carrying the A allele of PD1 SNP had a higher risk of developing CMV antigenemia after transplantation<sup>30</sup>. This might appear difficult to reconcile with the present results. However it must be stressed that the previous published study only included R+ recipients while the present one is exclusively focused on D+. Furthermore, we have reported that the higher risk of graft loss associated with receiving a kidney from a CMV-positive donor was independent of CMV antigenemia, and the occurrence of antigenemia had no effect on graft survival especially in the D+R+ group<sup>11</sup>.

Our present results together, strengthen the notion that CMV plays an important role in long-term allograft dysfunction in these transplantation settings. Indeed, the link between CMV and chronic allograft dysfunction in lung or kidney transplant patients has not been uniformly observed and remains poorly understood despite the number of studies on the topic.<sup>31</sup> Many reasons may contribute to inconsistencies in the literature especially factors intrinsic to the biology of the virus. Indeed, CMV reactivation within a tissue (microinfection) is known to be transient and scattered and may leave behind durable and non-specific histological scars, for

difficulties in establishing a causal relationship. In addition, a low rate of viral reactivation in the organ allograft might be frequent and largely unrecognized, especially if occurring after the first year. Hence, strategies based on analyzing local viral replication are likely to lead to misclassification bias and failure to show the role of CMV. Therefore, the effects of CMV on long-term graft function might be underestimated and deserve attentive consideration, especially to identify patients at risk.

The exact biological mechanisms underlying the association of the SNP and PD-1 function and T-cell clonal exhaustion are still uncertain. The SNP is localized in a non-coding region of the gene, as are many SNPs known to influence the expression of the genome. The A allele has been associated with decreased expression of PD-1 and increased IFN- $\gamma$  production<sup>25</sup>, which is consistent with our results of increased number of IFN- $\gamma$ -producing T cells in AA patients in response to CMV peptides.

The difference in the number of IFN- $\gamma$ -producing T cells among peripheral blood mononuclear cells between AA and GG patients may appear small to account for the strong effect of the SNP on the graft survival. However, the only study that analyzed PD-1 expression in tissues, found it much higher in infected kidneys than in the blood<sup>32</sup> suggesting a higher level of exhaustion in infected kidney. Furthermore IFN- $\gamma$  production is lost after the cytotoxic function has become inefficient.<sup>20</sup> Finally, as compared with native organs, transplanted organs might be prone to viral-induced T cell exhaustion because of more frequent episodes of subclinical CMV replications and alteration of T-cell functions induced by immunosuppressive drugs. Therefore, a weak difference in number of CMV-specific IFN- $\gamma$ -producing cells among blood T cells could reflect a much larger difference in T-cell efficiency within transplant organs that could increase inflammation at each episode of reactivation and accelerate graft dysfunction. Interestingly, this is the first study to suggest

that CMV-induced clonal exhaustion impacts on the clinical course of CMV-related chronic effects in transplant patients.

Importantly our study identifies a subgroup of transplant patients with strong genetic protection against CMV-associated graft failure. This could encourage the design of studies with the aim of individually tailoring CMV-preventive strategies and organ allocation criteria to patient genotype. Interestingly, our findings might also lead to evaluate whether this SNP is associated with the viral burden in HIV or hepatitis C virus infection.

In summary, our study identifies for the first time an SNP in *PDCD-1* as a strong and robust genetic risk factor of CMV-associated kidney graft failure, which was confirmed by analyzing the survival of lung transplant patients. In addition, our results suggest a link between the SNP and exhaustion of the anti-CMV immune response and shed some light on the pathophysiology of the clinical association. These findings may improve the strategy to limit the indirect sequelae of CMV that continues, perhaps surprisingly, to dampen the enduring success of organ transplantation. In addition, our study encourages exploring this SNP in other chronic viral infections.

## References

1. Reeves M, Sinclair J. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;325:297-313.
2. Soderberg-Naucler C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 1997;91(1):119-26.
3. Hummel M, Zhang Z, Yan S, DePlaen I, Golia P, Varghese T, et al. Allogeneic transplantation induces expression of cytomegalovirus immediate-early genes in vivo: a model for reactivation from latency. *J Virol* 2001;75(10):4814-22.
4. Orloff SL, Hwee YK, Kreklywich C, Andoh TF, Hart E, Smith PA, et al. Cytomegalovirus latency promotes cardiac lymphoid neogenesis and accelerated allograft rejection in CMV naive recipients. *Am J Transplant* 2011;11(1):45-55.
5. Streblov DN, Orloff SL, Nelson JA. Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus. *Curr Opin Immunol* 2007;19(5):577-82.
6. Snyder LD, Finlen-Copeland CA, Turbyfill WJ, Howell D, Willner DA, Palmer SM. Cytomegalovirus pneumonitis is a risk for bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181(12):1391-6.
7. Paraskeva M, Bailey M, Levvey BJ, Griffiths AP, Kotsimbos TC, Williams TP, et al. Cytomegalovirus replication within the lung allograft is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant* 2011;11(10):2190-6.
8. Johansson I, Martensson G, Andersson R. Cytomegalovirus and long-term outcome after lung transplantation in Gothenburg, Sweden. *Scand J Infect Dis* 2010;42(2):129-36.
9. Reischig T, Jindra P, Hes O, Bouda M, Kormunda S, Treska V. Effect of cytomegalovirus viremia on subclinical rejection or interstitial fibrosis and tubular atrophy in protocol biopsy at 3 months in renal allograft recipients managed by preemptive therapy or antiviral prophylaxis. *Transplantation* 2009;87(3):436-44.
10. Helantera I, Koskinen P, Finne P, Loginov R, Kyllonen L, Salmela K, et al. Persistent cytomegalovirus infection in kidney allografts is associated with inferior graft function and survival. *Transpl Int* 2006;19(11):893-900.
11. Gatault P, Halimi JM, Forconi C, Thibault G, Barbet C, Merieau E, et al. CMV Infection in the Donor and Increased Kidney Graft Loss: Impact of Full HLA-I Mismatch and Posttransplantation CD8 Cell Reduction. *Am J Transplant* 2013.
12. Schnitzler MA, Woodward RS, Brennan DC, Spitznagel EL, Dunagan WC, Bailey TC. The effects of cytomegalovirus serology on graft and recipient survival in cadaveric renal transplantation: implications for organ allocation. *Am J Kidney Dis* 1997;29(3):428-34.
13. Dzabic M, Rahbar A, Yaiw KC, Naghibi M, Religa P, Fellstrom B, et al. Intra-graft cytomegalovirus protein expression is associated with reduced renal allograft survival. *Clin Infect Dis* 2011;53(10):969-76.
14. Shabir S, Kaul B, Pachnio A, Banham GD, Smith H, Chand S, et al. Impaired Direct Priming of CD8 T Cells by Donor-Derived Cytomegalovirus Following Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2013.
15. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 2005;202(5):673-85.
16. Fletcher JM, Vukmanovic-Stejic M, Dunne PJ, Birch KE, Cook JE, Jackson SE, et al. Cytomegalovirus-specific CD4+ T cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion. *J Immunol* 2005;175(12):8218-25.
17. Hadrup SR, Strindhall J, Kollgaard T, Seremet T, Johansson B, Pawelec G, et al. Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage

- predicting mortality and an increased number of dysfunctional cytomegalovirus-specific T cells in the very elderly. *J Immunol* 2006;176(4):2645-53.
18. Mattes FM, Vargas A, Kopycinski J, Hainsworth EG, Sweny P, Nebbia G, et al. Functional impairment of cytomegalovirus specific CD8 T cells predicts high-level replication after renal transplantation. *Am J Transplant* 2008;8(5):990-9.
  19. Zhang JY, Zhang Z, Jin B, Zhang SY, Zhou CB, Fu JL, et al. Cutting edge: programmed death-1 up-regulation is involved in the attrition of cytomegalovirus-specific CD8+ T cells in acute self-limited hepatitis B virus infection. *J Immunol* 2008;181(6):3741-4.
  20. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 2011;12(6):492-9.
  21. Petrovas C, Casazza JP, Brechley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 2006;203(10):2281-92.
  22. Quigley M, Pereyra F, Nilsson B, Porichis F, Fonseca C, Eichbaum Q, et al. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med* 2010;16(10):1147-51.
  23. 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(7):1486-97.
  24. La Rosa C, Krishnan A, Longmate J, Martinez J, Manchanda P, Lacey SF, et al. Programmed death-1 expression in liver transplant recipients as a prognostic indicator of cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 2008;197(1):25-33.
  25. Bertias GK, Nakou M, Choulaki C, Raptopoulou A, Papadimitraki E, Goulielmos G, 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(1):207-18.
  26. Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Maurer M, et al. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2005;58(1):50-7.
  27. Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 2002;32(4):666-9.
  28. Iannone MA, Taylor JD, Chen J, Li MS, Rivers P, Slentz-Kesler KA, et al. Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry. *Cytometry* 2000;39(2):131-40.
  29. Egli A, Humar A, Kumar D. State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin Infect Dis* 2012;55(12):1678-89.
  30. Hoffmann TW, Halimi JM, Buchler M, Velge-Roussel F, Goudeau A, Al-Najjar A, et al. Association between a polymorphism in the human programmed death-1 (PD-1) gene and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *J Med Genet* 2010;47(1):54-8.
  31. Baron C, Forconi C, Lebranchu Y. Revisiting the effects of CMV on long-term transplant outcome. *Curr Opin Organ Transplant* 2010;15(4):492-8.
  32. Blackburn SD, Crawford A, Shin H, Polley A, Freeman GJ, Wherry EJ. Tissue-specific differences in PD-1 and PD-L1 expression during chronic viral infection: implications for CD8 T-cell exhaustion. *J Virol* 2010;84(4):2078-89.

**Table 1: Demographic characteristics of patients from Tours, France, who underwent kidney transplantation between 1985 and 2008**

Clinical data <sup>a</sup>	D+ patients			D- patients		
	G/G N= 371	G/A & A/A N= 115	<i>p</i> <sup>b</sup>	G/G N= 476	G/A & A/A N= 157	<i>p</i> <sup>b</sup>
Mean Donor age ± SD (years)	46 ± 17	43 ± 18	0.16	42 ± 16	41 ± 16	0.67
Living donor (%)	5 (1)	1 (1)	0.87	8 (1)	3 (1)	0.87
Mean Recipient age ± SD (years)	47 ± 15	46 ± 15	0.42	45 ± 15	46 ± 15	0.41
Recipient male(%)	225 (39)	65 (43)	0.49	302 (63)	100 (63)	0.95
<b>Cause of renal disease</b>						
Diabetes (%)	22 (6)	6 (5)	0.95	25 (5)	5 (3)	0.39
Glomerulonephritis (%)	57 (15)	16 (14)	0.82	53 (11)	12 (8)	0.26
Polycystis kidney (%)	68 (18)	25 (22)	0.50	67 (14)	37 (23)	0.009
IgA nephropathy (%)	29 (8)	12 (10)	0.49	54 (12)	20 (13)	0.76
Other (%)	195 (53)	56 (49)	0.54	274 (58)	83 (53)	0.31
<b>CMV serology before graft <sup>c</sup></b>						
D-/R- (%)	176 (47)	57 (49)	0.77	233 (49)	72 (46)	0.56
D-/R+ (%)	195 (52)	58 (50)	0.77	243 (51)	85 (64)	0.56
CMV prophylaxis (%)	176 (49)	52 (47)	0.80	19 (4)	6 (4)	0.87
<b>Graft characteristics</b>						
Graft rank >1 (%)	56 (15)	12 (10)	0.27	58 (12)	22 (14)	0.64
Mean cold Ischemia time ± SD (hours)	21 ± 9	21 ± 8	0.99	20 ± 7.5	21 ± 8	0.25
Mean HLA mismatch AB ± SD	2.7 ± 1	2.7 ± 1	0.58	2.7 ± 1	2.8 ± 1	0.29
Mean HLA mismatch DR ± SD	1.3 ± 0.7	1.3 ± 0.6	0.93	1.2 ± 0.7	1.2 ± 0.6	0.51
Anti-HLA immunization (%)	80 (24)	19 (18)	0.25	91 (20)	31 (22)	0.85
Delayed graft function (%)	78 (21)	26 (23)	0.82	101 (21)	37 (23)	0.61
Acute rejection (%)	108 (29)	26 (23)	0.21	161 (33)	54 (34)	0.97
<b>Treatments in the first 3 months</b>						
Anti-lymphocyte globulins (%)	247 (67)	67 (59)	0.19	300 (63)	116 (73)	0.018
Anti-IL2R (%)	110 (30)	35 (31)	0.92	143 (30)	35 (22)	0.07
Ciclosporine (%)	251 (68)	78 (68)	0.99	348 (73)	112 (71)	0.74
Tacrolimus (%)	94 (25)	29 (25)	0.92	109 (22)	35 (22)	0.95
Mycophenolate mofetil (%)	251 (68)	78 (68)	0.94	302 (63)	99 (63)	0.98
Azathioprine (%)	108 (29)	35 (30)	0.88	160 (33)	57 (36)	0.60

D+, donor positive for cytomegalovirus (CMV) (n=486), D-, donor negative for CMV (n=633).<sup>a</sup> Data are number (%) or mean ± SD. <sup>b</sup> By chi-square test for categorical data and Mann-Whitney test for numeric data. <sup>c</sup> D/R indicates donor/recipient, and +/- indicates positive/negative CMV serological status. Delayed graft function was defined by dialysis during the first week following transplantation.

**Table 2: Demographic characteristics of lung transplant patients from 3 hospitals from France**

Clinical data <sup>a</sup>	D+ patients			D- patients		
	G/G N= 64	G/A & A/A N= 22	<i>p</i> <sup>b</sup>	G/G N= 75	G/A & A/A N= 21	<i>p</i> <sup>b</sup>
Mean Donor age ± SD (years)	44 ± 14	43 ± 17	0.91	38 ± 13	42 ± 15	0.21
Mean Recipient age ± SD (years)	36 ± 14	35 ± 13	0.75	36 ± 14	39 ± 15	0.75
Recipient male (%)	29 (55)	9 (59)	0.91	44 (58)	11 (52)	0.79
Graft rank >1 (%)	3 (5)	2 (10)	0.80	4 (6)	1 (5)	0.69
<b>Cause of lung disease</b>						
Cystic Fibrosis (%)	33 (56)	10 (48)	0.69	44 (58)	10 (48)	0.51
Emphysema (%)	9 (15)	4 (19)	0.95	15 (20)	6 (29)	0.58
Pulmonary fibrosis (%)	6 (10)	1 (5)	0.76	5 (7)	3 (14)	0.50
Other (%)	11(19)	6 (28)	0.52	11 (15)	2 (9)	0.77
<b>CMV serological status before graft <sup>d</sup></b>						
D-/R- (%)	32 (50)	12 (55)	0.90	44 (60)	15 (71)	0.49
D-/R+ (%)	32 (50)	10 (45)	0.90	29 (40)	6 (29)	0.49
CMV prophylaxis (%)	21 (33)	12 (28)	0.74	14 (18)	2 (9)	0.50
<b>Transplanted organ</b>						
Mono-pulmonary (%)	14 (22)	4 (18)	0.76	12 (16)	7 (33)	0.17
Bi-pulmonary (%)	40 (62)	15 (68)	0.19	52 (72)	12 (57)	0.29
Heart and lung (%)	1 (2)	1 (5)	0.98	4 (6)	1 (5)	0.68
Others (%)	9 (14)	2 (9)	0.82	4 (6)	1 (5)	0.68
<b>Treatment in the first 3 months <sup>e</sup></b>						
Anti-lymphocyte globulins (%)	23 (44)	6 (31)	0.49	31 (50)	8 (44)	0.88
Ciclosporine (%)	45 (86)	17 (89)	0.94	56 (90)	18 (100)	0.38
Tacrolimus (%)	4 (7)	2 (10)	0.91	1 (1)	-	0.50
Mycophenolate mofetil (%)	23 (44)	5 (26)	0.27	23 (37)	8 (44)	0.77
Azathioprine (%)	28 (54)	15 (79)	0.10	36 (58)	10 (55)	0.93
steroids (%)	45 (86)	13 (68)	0.16	40 (64)	13 (72)	0.74

D+, CMV-positive donor (n=86), D-R-, donor and recipient were CMV negative (n=96). <sup>a</sup>

Data are number (%) or mean ± SD. <sup>b</sup> By chi-square test for categorical data and Mann-Whitney test for numeric data. <sup>c</sup> D/R indicates donor/recipient, and +/- indicates positive/negative CMV serological status. <sup>d</sup> Data available for 114 donors. <sup>e</sup> Data available for 151/182 patients.



## Figure legends

### **Figure 1: Variant A allele of the PD-1.3 single nucleotide polymorphism (SNP) is strongly associated with graft survival in patients who received kidneys from CMV-infected donors**

Kaplan-Meier analyses of data for kidney transplant patients at high risk of CMV (received organs from CMV-positive donors [D+, n=486]) and low risk of CMV (D-, n=633). Graft survival, patient survival and death-censored graft survival are in the top, middle and lower graphs respectively. Bold lines represent GG allele carriers and dashed lines A allele carriers (AA or GA). The presence of the A allele is associated with a better graft survival rate in D+ recipients (upper left, p=0.006) and with death-censored graft survival rate (lower left graph, p=0.001). Of note, the SNP was not associated with patient survival (middle left p=0.748). In the D- group (right graphs), the SNP was not associated with global graft survival, patient survival or death-censored graft survival (p=0.885, 0.471 and 0.486, respectively).

### **Figure 2: Variant A allele of PD-1.3 SNP is associated with kidney graft survival in D+ recipients regardless of period of transplantation**

Kaplan-Meier analysis of graft survival. Upper graphs represent death-censored graft survival for transplantations between 1985 and 1995 (panel a: n=116; panel b: n=176) and lower graphs from 1996 to 2008 (panel c: n=370; panel d: n=457). Bold lines represent GG-allele carriers and dashed lines A-allele carriers (AA and GA). The presence of the A allele is associated with a better graft survival in D+ recipients for both periods of transplantation (panels a and c: p=0.014 and p=0.022, respectively), in contrast, there was no association in D- (panels b and d: p=0.696 and p=0.540, respectively).

**Figure 3: PD-1.3 SNP is associated with survival of lung transplant patients receiving CMV-positive grafts (D+)**

Kaplan-Meier analysis of patient survival. A allele carriers (dashed lines) had significantly better survival than GG genotype carriers (bold lines) (left graph, n=86, p=0.005, hazard ratio [HR]=0.305 [0.128-0.716]). In contrast, patient survival was similar regardless the genotype in D- patients (right graph, n=96, p=0.798).

**Figure 4: Expansion of the CD8<sup>+</sup> T-cell count greater in A than GG allele carriers and number of CMV-responding T-cells greater with homozygous AA than wild-type GG genotype**

A, B and C show the evolution of the CD8<sup>+</sup> cell compartment between post-operative day 0 and year-2 post-transplantation (calculated as  $100 \times ([2\text{-year-CD8}^+/\text{mm}^3] - [\text{baseline-CD8}^+/\text{mm}^3]) / [\text{baseline-CD8}^+/\text{mm}^3]$ ). **Panel A:** D+ patients with reactivated CMV early after transplantation as assessed by antigenemia (D+Ag<sup>+</sup><sub>pp65</sub>; n=90) and in D-R- (n=121) \*\*\*p<0.0001. **Panels B:** presence (empty box) or absence (filled box) of A allele of the SNP in D+Ag<sup>+</sup><sub>pp65</sub> patients (n=86), \*\*p=0.034, or D-R- patients (n=103), p=0.925. **Panel C:** ELISPOT assay of number of IFN- $\gamma$ -producing cells/10<sup>6</sup> peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in response to CMV-pp65 peptides. Data are mean  $\pm$ SD interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) spots/10<sup>6</sup> PBMC in AA homozygous patients (grey histogram) and GG homozygous patients (light grey histogram); \*p=0.006.

Figure 1:

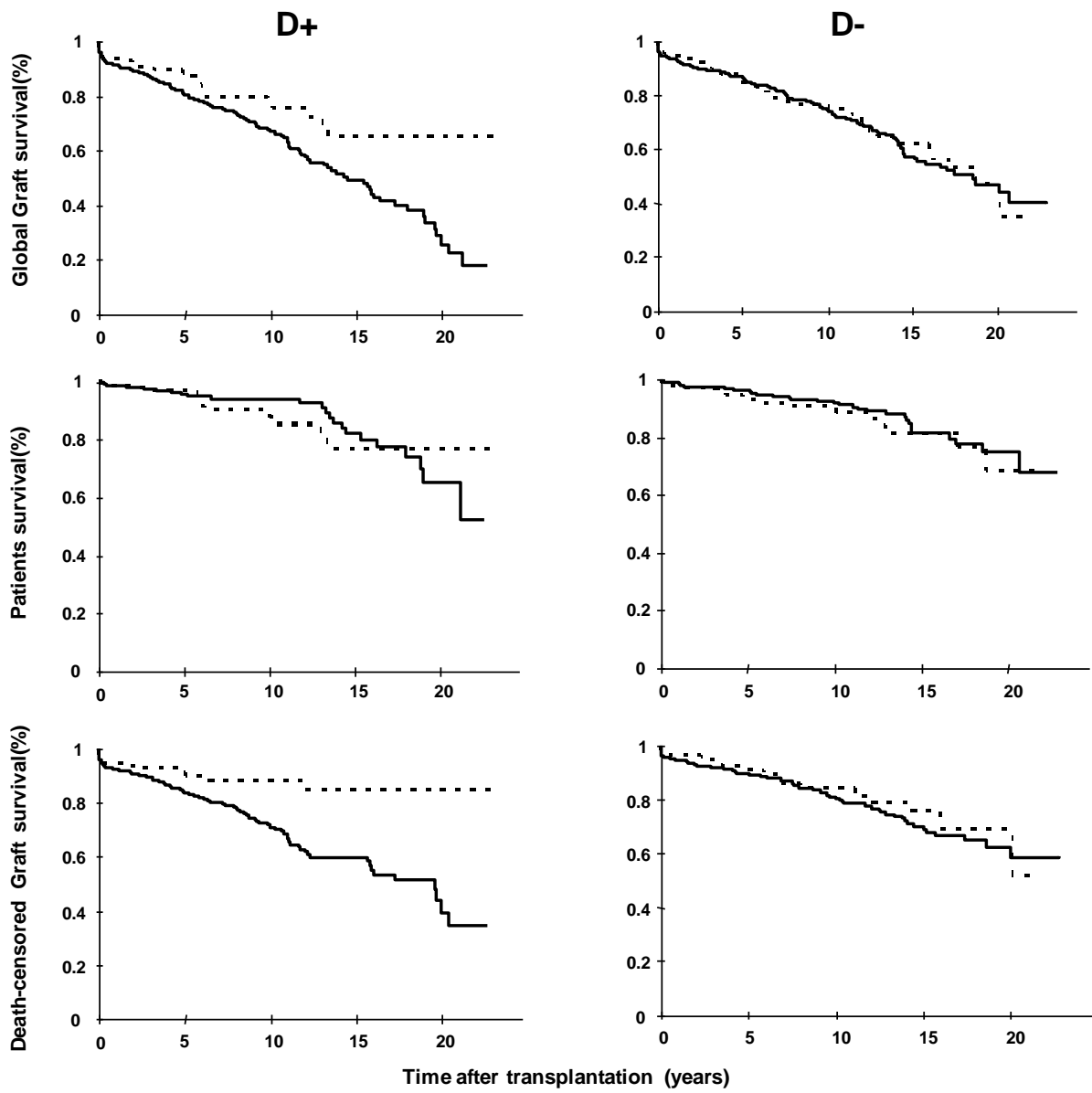


Figure 2 :

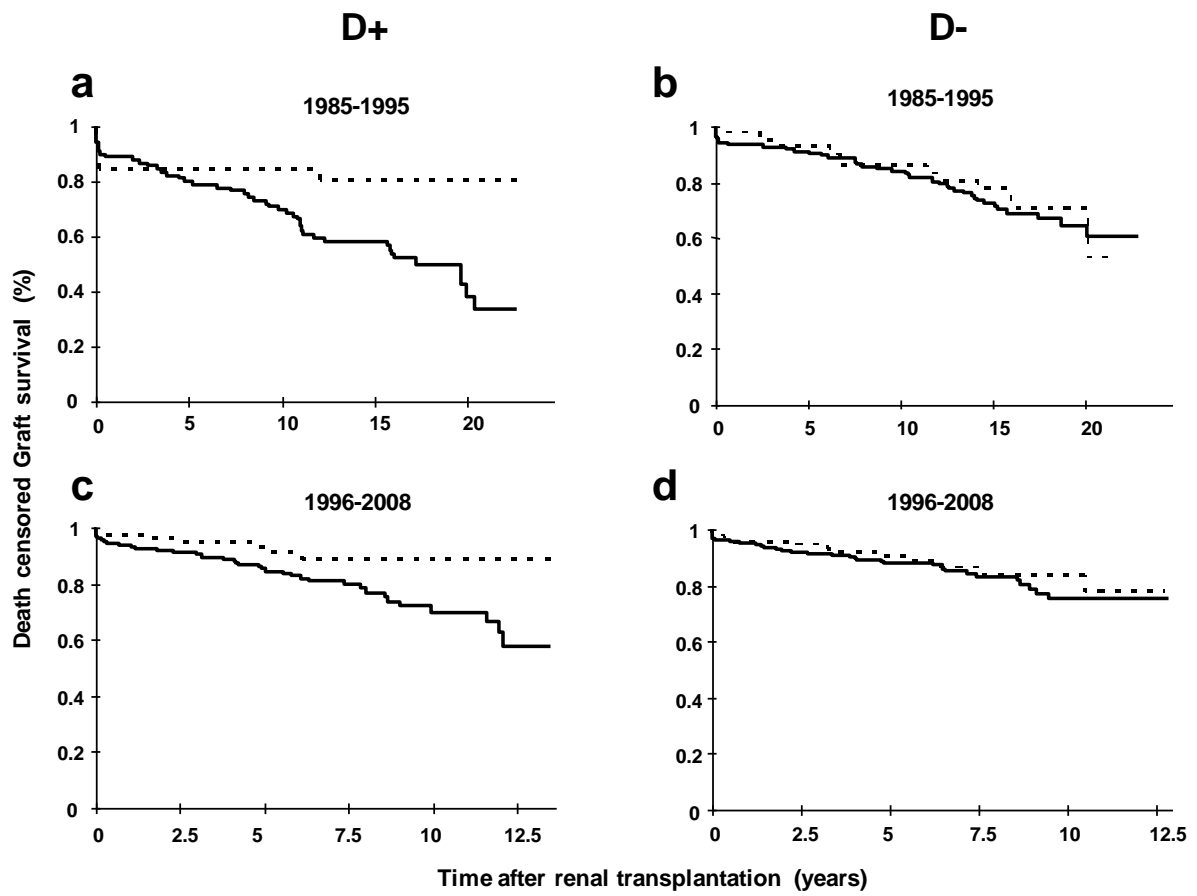


Figure 3 :

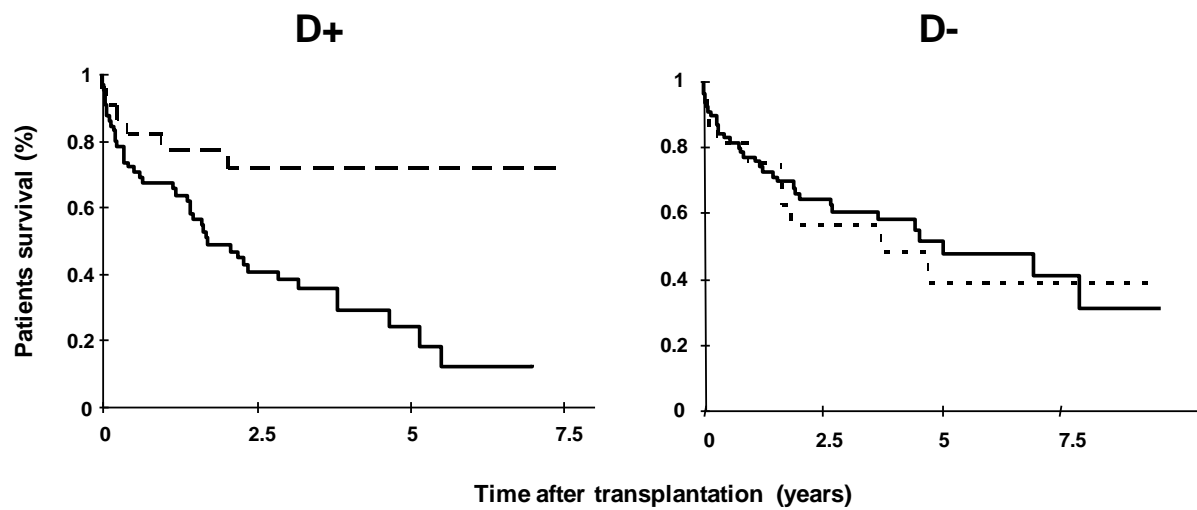
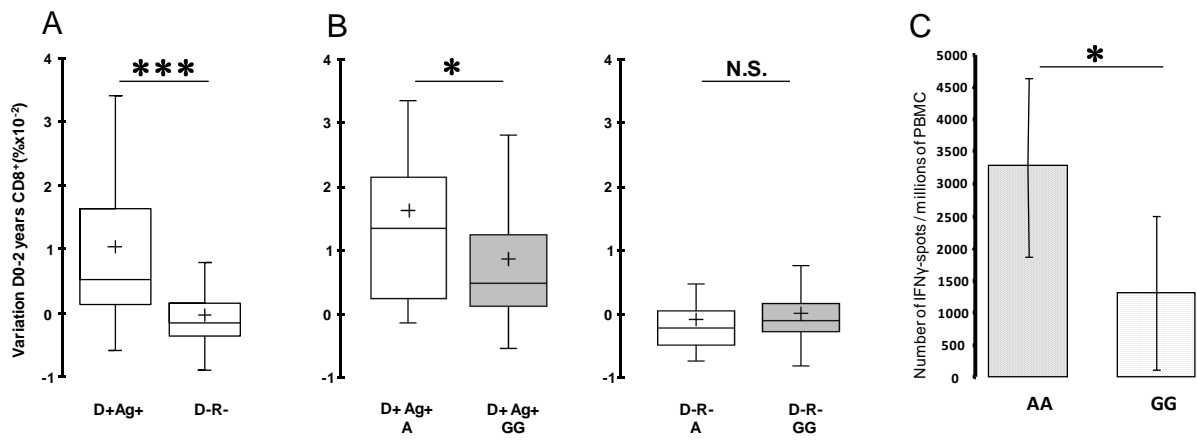


Figure 4 :







**Catherine FORCONI**

## **Cytomégalo­virus et survie à long terme des greffes d'organes solides :**



**Etude clinique et génétique**



### Résumé

Suite à une transplantation, les patients présentent un affaiblissement de leur système immunitaire laissant ainsi place libre aux infections opportunistes et principalement au CMV. L'implication de ce virus dans l'accélération de la mise en place du rejet chronique du greffon reste controversée et largement incomprise. Nos objectifs ont été d'une part de déterminer l'impact de l'infection à CMV du donneur sur la survie du greffon rénal et d'autre part d'identifier certains facteurs liés à la réponse immunitaire de l'hôte pouvant moduler ce risque. Selon nos résultats, l'infection à CMV du donneur est un facteur de risque indépendant de la perte des greffons rénaux, d'autant plus si le receveur est aussi infecté. Le SNP PD-1.3 est un facteur de risque génétique fort de la perte du greffon rénal associé au CMV du donneur et ce résultat est confirmé grâce à une cohorte de validation de patients transplantés pulmonaires. Ce travail suggère un lien fort entre ce SNP et l'épuisement de la réponse immunitaire anti-CMV et met en avant l'importance de la physiopathologie liée au CMV sur l'association clinique observée.

Mots-clés : Cytomégalo­virus, transplantation, survie greffons rénaux, polymorphisme PD-1, survie patients pulmonaires

### Abstract

Following a solid organ transplant, and to prevent the risk of rejection, patients take immunosuppressive treatments that weaken their immune system and promote tumors and infections, including cytomegalovirus (CMV). This virus is the cause of clinical infectious syndromes but also many "indirect" effects which are not yet clearly understood. Our objectives were firstly to determine the impact of the CMV donor infection on the renal graft survival and secondly to identify factors related to the immune response of the host which can modulate the risk. We showed that the CMV donor is an independent risk factor for kidney graft loss, especially if the recipient is infected. The SNP PD-1.3 is a strong genetic risk factor for renal graft loss associated with CMV donor and this result is confirmed by a validation cohort of lung transplant patients. This work suggests a strong link between this SNP and the exhaustion of the immune response specific anti -CMV and highlights the importance of the pathophysiology associated with CMV on the observed clinical association.

Key words: Cytomegalovirus, transplantation, renal graft survival, PD-1 polymorphism, pulmonary patients' survival