

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

SSBCV

EA 4245 – Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes

THÈSE présentée par :
Philippe GATAULT

soutenue le : **31 janvier 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**
Discipline/ Spécialité : **Santé Sciences Biologiques / Infectiologie et
Transplantation**

**Infection du donneur par le CMV et
transplantation d'organe : impact sur la
réponse immunitaire spécifique et sur la
survie des greffons**

THÈSE dirigée par :

Monsieur BARON Christophe Professeur, Université François-Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

Monsieur Dany Anglicheau Professeur, Université Paris V

Monsieur Alain Le Moine Professeur, Université Libre de Bruxelles

JURY :

Monsieur Dany Anglicheau Professeur, Université Paris V

Monsieur BARON Christophe Professeur, Université François-Rabelais, Tours

Monsieur Matthias Büchler Professeur, Université François-Rabelais, Tours

Monsieur Lionel Couzi Professeur, Université de Bordeaux

Monsieur Alain Le Moine Professeur, Université Libre de Bruxelles

Madame Catherine Gaudy-Graffin Maître de conférences, Université François-Rabelais, Tours

Table des matières

Remerciements

Abréviations

I.	Introduction générale	6
II.	L'infection par le HCMV	9
A.	Biologie de l'infection par le HCMV	9
1.	Caractéristiques du virion	9
2.	Mode d'entrée dans les cellules	12
3.	Cycle de réplication virale et propagation de l'infection (phase productive de l'infection)	14
4.	La phase de latence virale.....	15
5.	Sortie de latence virale : réactivation du virus	18
a)	La sortie de latence : inflammation et alloréactivité.....	18
b)	La sortie de latence: rôle de la différenciation des cellules myéloïdes.....	19
c)	Le rôle de l'immunosuppression	21
6.	Mécanismes d'action des médicaments antiviraux	21
B.	Conséquences cliniques de l'infection par le CMV	23
1.	Conséquences cliniques de l'infection par le CMV chez l'individu immuno-compétent.....	23
2.	Conséquences cliniques de l'infection par le CMV sur l'individu immunodéficient et/ou greffé	25
a)	Effet directs	25
b)	Effets indirects du CMV relatifs au devenir des greffons.....	28
(1)	CMV et néphropathie chronique du transplant.....	29
(2)	CMV et bronchiolite oblitérante.....	33
(3)	CMV et coronaropathie du transplant	34
(4)	La physiopathologie du développement des lésions chroniques des greffons en rapport avec le CMV.....	38
c)	Stratégies thérapeutiques anti CMV et impact des traitements antiviraux sur les effets indirects en transplantation.....	43
(1)	Données expérimentales.	43
(2)	Données cliniques.....	46

III.	Réponse immunitaire anti-CMV	48
A.	Immunité innée.....	48
1.	Les lymphocytes NK	48
2.	Les lymphocytes T gamma-delta.....	49
3.	Les cellules dendritiques	50
4.	Le complément	52
B.	Immunité adaptative.....	52
1.	Lymphocytes T CD4	53
2.	Les lymphocytes T CD8	59
a)	Les différents types de lymphocytes T CD8 anti-CMV	59
b)	Les lymphocytes T CD8 circulants.....	60
3.	Contrôle de la réponse adaptative et échappement immunitaire du virus	64
a)	Concept d'épuisement clonal.....	64
b)	L'épuisement/la dysfonction lymphocytaire existe t il pour le CMV?	68
c)	Echappement à la réponse immunitaire adaptative.....	70
4.	L'immunité adaptative anti CMV après transplantation d'organe/ Rôle des traitements IS.	72
C.	Monitoring de la réponse immunitaire anti-CMV en transplantation d'organe	77
1.	Monitoring de la réponse immunitaire spécifique.....	77
2.	Monitoring des LT $\gamma\delta$ V δ 2 ^{neg}	84
3.	Monitoring de la réponse anti-CMV et survenue d'effets indirects.....	84
IV.	Articles originaux.....	86
A.	Premier article : "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;13:1219-2019)	86
B.	Second article " CMV-infected kidney grafts drive the expansion of blood-born CMV-specific T-cells restricted by shared HLA molecules through presentation on donor's cells." (soumis à publication)	102
C.	Troisième article: "Polymorphism in programmed cell death 1 gene is strongly associated with lung and kidney allograft survival in recipients from CMV-positive donors." (J Heart Lung Transplant 2016, published on line, in press)	124
V.	Discussions et perspectives.....	137
VI.	Références bibliographiques	146

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté de juger ce travail de thèse

- le Professeur Alain Le Moine qui a traversé la frontière et a une grande expertise dans le domaine de la transplantation
- le Professeur Dany Anglicheau, dont la force de raisonnement et la simplicité sont des exemples
- le Professeur Lionel Couzi, qui côtoie le CMV depuis plus longtemps que moi avec enthousiasme et je l'espère, aura plaisir à s'éloigner temporairement du LTgamma delta
- le Docteur Gaudy-Graffin, avec qui j'ai toujours le plus grand plaisir à travailler et converser, et qui (je l'espère) n'aura pas à rectifier trop d'approximations virologiques
- Matthias, qui n'imaginait probablement pas lire une seconde thèse il y a quelques années, me soutient et m'encourage avec toute sa bienveillance
- et bien entendu Christophe pour son encadrement marqué par le plaisir et la volonté de partager ses réflexions, de transmettre ses connaissances ainsi que la minutie dans l'écriture, et la précision dans le raisonnement.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance à l'ensemble des personnes ayant contribué à ces travaux et en particulier à Catherine, Sally, Johan, Eloi et Marie. Je remercie également toutes les personnes de "l'EA" avec qui j'ai eu ou ai encore le plaisir de partager quelques moments : Rose, Audrey, Daniel, Stéphanie, Laurianne, Claudie, Linda, Chantal et Denis. J'ai également une pensée particulière pour le professeur Lebranchu, qui a su (entre autres) m'alpaguer vers la recherche, ce que je n'ai jamais regretté, mais également pour Jean-Michel, qui m'accompagne dans certains de ces travaux et plus généralement au quotidien.

Bien entendu j'ai une pensée chaleureuse pour tous mes collègues du service de néphrologie, et particulièrement pour celles qui ont compensées ces dernières semaines (et se reconnaîtront).

Tout le reste va à ma famille et notamment poun, mam, so, polo, "tonton tati", Francis et Dany et mes 4 grands parents. Pour mes 5 amours cela n'a pas besoin d'être couché sur le papier. Juste pour Swan, ayé c'est fini!

Abréviations.

ADN : Acide déoxyribonucléique
Ag(-pp65) : Antigénémie (pp65)
ARN : Acide ribonucléique
ATG : Antithymocyte globulin
BOS : Bronchiolitis obliterans syndrome
CAM : Cellular adhesion molecule
CAN : Chronic allograft nephropathy
CAV : Cardiac allograft vasculopathy
CMV : Cytomégalovirus
D+/- : Donneur séropositif/séronégatif avant la transplantation
EBV : Epstein Barr virus
HCMV : Human cytomégalovirus
HHV : Human herpes virus
HLA : Human leucocyte antigen
HSV : Herpes simplex virus
IFN : Interféron
IL : Interleukine
IvIg : Immunoglobulines intraveineuses
KIR : Killer cell Ig-like receptor
LFA : Lymphocyte function-associated antigen
LPS : Lipopolysaccharide
LT_{CM} : Lymphocytes T centraux mémoire
LT_{EM} : Lymphocytes T effecteurs mémoire
LT_{RM} : Lymphocytes T résidents mémoire
LT $\gamma\delta$: Lymphocytes T gamma-delta
MCMV : Mouse cytomegalovirus
MIE : Major immediate early
NKG2 : Natural-killer group 2
NK : Natural killer
NF κ B : Nuclear factor-kappa B
ORF : Open Reading Frame
PCR : Polymerase chain reaction
PD-1: Programmed cell death 1
PTEN : Phosphatase and tensing homolog
R+/- : Receveur séropositif/séronégatif avant la transplantation
RCMV : Rat cytomegalovirus
TCR : T cell receptor
TEMRA : Terminally differentiated effector memory
TNF : Tumor necrosis factor
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

I. Introduction générale

L'infection par le cytomégalovirus humain (HCMV) est la plus fréquente des infections après greffe d'organe. Certains aspects de sa pathogénicité sont assez bien décrits, notamment ses effets directs qui se manifestent essentiellement à court terme. En revanche des effets indirects à plus long terme sont fortement suspectés mais restent encore largement incompris. Le HCMV appartient à la famille des *herpes viridae* susceptibles d'infecter les humains. Les virus CMV, apparus il y a environ 300 millions d'années, peuvent infecter l'ensemble du règne animal. Ils ont ainsi co-évolué en s'adaptant très finement avec leurs différents hôtes, ce qui a abouti au développement de divers sous-types de CMV propres à chaque espèce, tels que le MCMV pour la souris et le RCMV pour le rat. Le terme HCMV est réservé au CMV qui infecte l'Homme. L'infection est contractée suite à un contact direct ou indirect avec un liquide biologique infecté comme les sécrétions de voies aériennes supérieures et salive, le sang, l'urine, les sécrétions génitales, le liquide lacrymal et le lait. Les modes de transmission sont donc multiples. La transplantation d'un organe ou la transfusion de produits sanguins labiles de donneurs infectés sont aussi des modes connus de contamination et représentent les seules situations où la date de l'infection est connue. L'infection par le HCMV se produit majoritairement dans l'enfance mais peut survenir à tout moment de la vie, de la période intra-utérine où la transmission materno-fœtale peut compliquer une primo-infection de la femme enceinte, jusqu'à un âge avancé (1). L'incidence et la prévalence à travers le monde sont très élevées avec des variations géographiques importantes. Par exemple, la prévalence chez des femmes âgées de 12 à 49 ans varie de 40% à plus de 90% entre des pays comme la France et la Finlande. Les facteurs de risques épidémiologiques d'infections à CMV sont le sexe féminin, le faible niveau socio-économique, et la couleur de peau.

A la phase initiale de l'infection, appelée communément primo-infection, le sujet immunocompétent est le plus souvent asymptomatique ou peu symptomatique, bien que des syndromes mononucléosiques et des hépatites puissent parfois être observés. Les manifestations plus sévères digestives, respiratoires et neurologiques sont en effet relativement exceptionnelles en l'absence de déficit immunitaire. Le fœtus est lui plus exposé au risque de développer des formes cliniques sévères lorsque la mère est infectée au cours de la grossesse. Finalement, la résolution de la phase aiguë de l'infection est la règle chez le sujet immunocompétent mais le HCMV va persister tout au long de la vie de l'hôte.

S'installe alors une cohabitation entre le CMV et son hôte, déterminée par les caractéristiques du virus qui est capable d'entrer en phase de latence et d'échapper au système immunitaire. Cette phase chronique de l'infection est caractérisée par une alternance de phases de réplifications virales asymptomatiques, au cours desquelles sont produits les virions, et de périodes d'infection quiescente. On oppose ainsi l'infection productive ou lytique, à l'infection latente. Les types cellulaires permissifs pour la répllication virale complète sont très nombreux alors que la latence ne peut s'établir que dans un nombre limité de cellules. Les deux principaux mécanismes à l'origine de la sortie de latence sont l'inflammation et la différenciation des cellules de la lignée myéloïde, qui induisent tous les deux la transcription de certains gènes viraux et permettent l'entrée dans le cycle de répllication. Notons que l'immunosuppression *per se* n'est pas un facteur de sortie de latence.

Chez les sujets avec un déficit de l'immunité cellulaire, tels que les sujets infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou recevant des traitements immunosuppresseurs, les conséquences cliniques de l'infection sont fréquentes. En effet, des lésions viscérales (pneumopathies, colites, hépatites, rétinites...) directement liées à la cytopathogénicité du CMV peuvent survenir, notamment au cours de la première année suivant la transplantation. Ces atteintes d'organes, regroupées sous le terme de maladie à CMV, peuvent compliquer une

primo-infection, mais également survenir chez un patient immunisé avant la transplantation. Le HCMV est également à l'origine d'effets indirects plus insidieux, hétérogènes, dont la physiopathologie est plus complexe et souvent incertaine. Ils sont souvent considérés comme des conséquences de perturbations des réponses immunitaires vis-à-vis d'autres pathogènes et d'un entretien des processus inflammatoires, conduisant chez le sujet transplanté à une augmentation du risque de développer des infections opportunistes ainsi que des lésions tissulaires chroniques (2). Concernant ce dernier point, alors qu'habituellement les effets indirects ne sont pas rattachés à l'effet cytopathogène du virus, plusieurs études ont rapporté qu'il pourrait tout de même être le résultat de réplifications virales épisodiques au sein du greffon lui-même. Plusieurs raisons laissent penser qu'autant la greffe en elle-même que les traitements immunosuppresseurs altèrent profondément l'équilibre entre les phases de répllication virale et de retour en latence. Rappelons tout d'abord que les cytokines produites durant une inflammation sont les principaux facteurs utilisés par le virus pour sortir de sa latence, comme le TNF- α (3-4). Or l'organe greffé est souvent le site d'une inflammation plus ou moins chronique (rejet aigu, rejet chronique, infections). De plus, les traitements immunosuppresseurs pourraient altérer la capacité de la réponse immunitaire anti-CMV à éliminer les cellules productives de virions, alors que les nombreux mécanismes d'échappement viral à la réponse immunitaire anti-CMV ne sont pas ou peu altérés chez le sujet transplanté. Par conséquent, cela pourrait favoriser l'extension (dans la durée et dans l'espace) des épisodes de sorties de latence virale, notamment au sein du greffon.

Notre travail de thèse s'est intéressé à mieux comprendre les conséquences de l'infection du donneur par le HCMV sur la réponse immunitaire du receveur et sur le devenir de son greffon (rénal et dans une moindre mesure pulmonaire). Nous avons d'abord fait une étude épidémiologique visant à mieux décrire les effets indirects du CMV sur le greffon rénal. Nous avons ainsi rapporté que les reins provenant de donneurs infectés par le HCMV avaient une

moins bonne survie à long terme surtout en cas de réinfection (dans notre mémoire de thèse, cette observation sera parfois nommée par un raccourci « effet D+ » sur la survie) et que cet effet négatif était fortement majoré en cas de mésappariement complet en HLA de classe I entre le receveur et son donneur (publication n°1 *American Journal of Transplantation* 2013). Puis nous avons tenté de mieux comprendre le rôle du rein de donneurs séropositifs dans le développement de la réponse immunitaire anti-CMV. Nous rapportons dans cette étude, actuellement soumise à publication (manuscrit n°2), que le rein greffé pilote la réponse immunitaire systémique. Nous décrivons ainsi un « effet D+ » sur la réponse immunitaire qui est dépendant de la présence d'identités HLA-I partagées entre le donneur et le receveur. Enfin nous avons été fortement impliqué dans une étude qui a mis en évidence l'implication d'un polymorphisme génétique du gène de programmed cell death 1 dans « l'effet D+ » sur la survie et la réponse immunitaire (co-premier auteur de l'article n°3 publié dans *Journal of Heart and Lung Transplantation* en 2016). Notre travail de thèse est donc construit autour de ces 3 articles cohérents qui sont inclus dans le présent manuscrit.

II. L'infection par le HCMV

A. Biologie de l'infection par le HCMV

1. Caractéristiques du virion

Comme tous les virus herpes, le HCMV est un virus à ADN double brin icosaédrique avec une enveloppe. Le groupe des herpes virus infectant l'Homme est divisé en 3 sous-familles distinguées par la structure de leurs génomes et leurs homologies de séquence (5). Le HCMV est classé comme virus herpes de type 5 et appartient aux beta-herpes virus, avec les virus HHV6 et HHV7.

Trois types de particules virales sont décrites : le virion qui est la structure extracellulaire comprenant toute la machinerie du virus, les particules enveloppées non infectantes (NIEPs

pour noninfectious enveloped particles) et les corps denses. Ces deux derniers sont dépourvus d'acide nucléique. Le diamètre du virion varie entre 200 et 300 nanomètres. Comme cela est représenté dans la figure suivante, quatre composants sont distingués du centre (core) vers la périphérie. Tout d'abord son acide nucléique qui est constitué d'un ADN double brin linéaire associé à des protéines. Il mesure environ 235kb, ce qui en fait le plus long génome des virus herpes humains. Il est disposé dans une nucléocapside icosaédrique, elle même protégée par le tégument composé d'une matrice protéique. Une enveloppe délimite finalement la périphérie du virion. Il s'agit d'une bicouche lipidique provenant de la cellule infectée dans laquelle sont enchâssées des glycoprotéines.

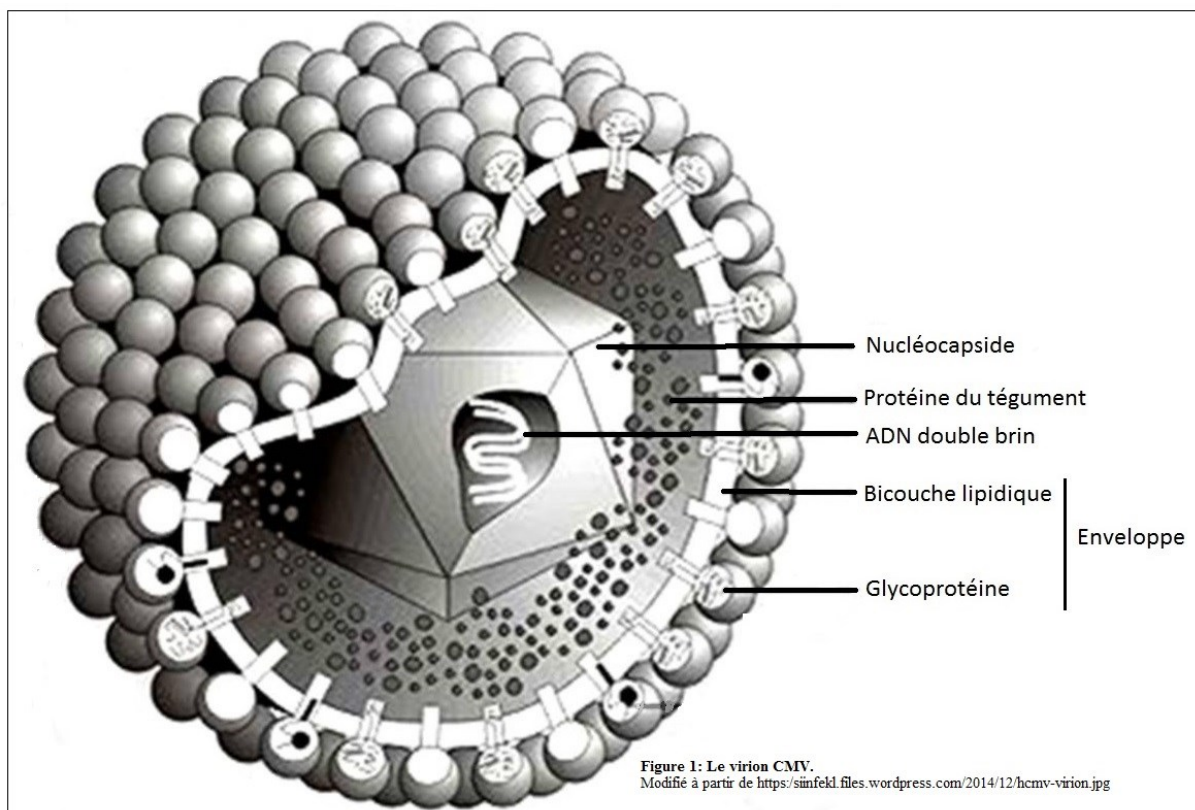


Figure 1: Le virion CMV.

Modifié à partir de <https://siinfekl.files.wordpress.com/2014/12/hcmv-virion.jpg>

Son génome, constitué d'ADN comme pour tous les virus herpes, contient entre 170 et 751 ORFs (Open Reading Frame) qui sont des séquences encadrées par deux codons stop (6). Ces

régions contiennent des séquences codantes (CDS pour CoDing Sequence ou gènes) qui commencent par un codon start, précédées par des sites de liaison aux ribosomes nommés RBS. Il est généralement considéré qu'environ 25% des ORFs codent réellement pour des protéines virales en sachant que le nombre de gènes varie en fonction des différentes souches de HCMV. En effet, des régions du génome sont parfois supprimées dans certaines souches, comme cela est parfois observé lorsqu'elles ont été cultivées *in vitro* de façon prolongée. Pour exemple, 145 gènes ont été identifiés dans la souche AD169 alors que les souches sauvages possèdent entre 164 et 167 gènes (7). De plus, l'établissement récent du transcriptome a révélé des épissages alternatifs qui affectent 58 protéines virales et la présence de séquences codantes jusqu'ici non connues (8).

La lecture séquentielle de ces gènes aboutit à une synthèse hiérarchisée des protéines virales au cours de l'infection. Ces protéines sont d'ailleurs classées en fonction de la période durant laquelle elles sont synthétisées. Ainsi sont distinguées dans l'ordre les protéines IE (pour immediate early), E (pour early) et L (pour late). Les premières régulent la transcription virale, les dernières sont des protéines de structure. Le contingent des protéines E regroupe aussi bien des protéines régulatrices que de structure. Des régions conservées entre les différents virus herpes ont été identifiées, essentielles pour une réplication virale efficace. Par exemple, des régions conservées codent pour les protéines kinases du groupe "HvUL" qui sont des kinases avec des domaines catalytiques de type serine-thréonine kinases (9). Une mutation dans les domaines conservés de ces kinases affecte profondément la réplication virale (10).

Le protéome du virion, établi en 2004 par spectrométrie de masse (11) est composé de 59 protéines qui soit forment sa structure, soit participent aux étapes de transcription et de réplication du virus. Les protéines virales de structure vont composer la nucléocapside et le tégument qui sont assemblés successivement. Cinq protéines composent la nucléocapside du

virus. Elles sont codées par les UL46, UL48-49, UL80, UL85 et UL86. Leur assemblage a lieu dans le noyau de la cellule infectée. Le tégument, qui contient une vingtaine de protéines, vient ensuite entourer la capsid dans le noyau puis dans le cytoplasme. La phosphoprotéine pp65, également appelée UL83, est la protéine la plus abondante du tégument avec l'UL85 (minor capsid protein), devant l'UL86 (major capsid protein), l'UL46 et l'UL82. L'enveloppe du virion est, quant à elle, constituée dans le transGolgi et dans des organites intracellulaires associés au Golgi. Elle contient les glycoprotéines suivantes: gpTRL10, UL33, gp48 (UL4), gB (UL55), gN (UL73), gO (UL74), gH (UL75), gM (UL100), gL (UL115). Les glycoprotéines d'enveloppe les plus abondantes sont gM et gB. En plus des protéines d'origine virale, les virions contiennent de nombreuses protéines codées par le génome des cellules infectées. Il s'agit de protéines chaperonnes et du cytosquelette, de la β 2-microglobuline, d'annexines et de protéines impliquées dans le métabolisme glucidique.

Comme certains autres virus herpes (EBV, HSV1 et 2, HHV8), le HCMV produit des microARN. Ils ont été identifiés pour la première fois en 2005 et sont dispersés tout au long du génome (12). Bien que la cinétique de leur synthèse et l'intégralité de leurs sites de liaison ne soient pas encore complètement déterminées, une dizaine de microARN du HCMV participent probablement à la régulation de certains gènes viraux et de l'hôte. Ainsi un site de liaison au miR-UL112-1 a été reconnu dans la région MIE (major immediate early) et pourrait participer à la mise en place de la latence (13), mais régulerait aussi la production de MICB (pour major histocompatibility complex class I-related chain B) qui est un ligand du récepteur activateur NKG2D présent à la surface des lymphocytes NK (14).

2. Mode d'entrée dans les cellules

Une grande quantité de virions est produite lors de la période initiale de l'infection, ce qui permet la propagation de l'infection. Le tropisme du CMV est très large, ce qui signifie que le virus peut pénétrer dans un très grand nombre de types cellulaires comme les cellules

épithéliales et endothéliales, les fibroblastes, les cellules du système immunitaire (macrophages et monocytes, cellules dendritiques), les cellules musculaires lisses, certains neurones, les hépatocytes et les cellules trophoblastiques au cours de la grossesse (15). Ces cellules sont dites permissives à l'infection. L'infection des monocytes est un élément clé dans la dissémination systémique de l'infection. Les monocytes ne sont pas permissifs pour la réplication virale mais vont le devenir au cours de leur différenciation dans les tissus en d'autres cellules du système monophagocytaire. Il a d'ailleurs été montré *in vitro* que la liaison de la protéine gB à l'EGFR (pour epidermal growth factor receptor) au moment de l'entrée du virus dans le monocyte induisait l'allongement de la durée de vie du monocyte par l'activation prolongée (jusqu'à 72 heures) et puissante de la voie anti-apoptotique AKT, secondaire à la phosphorylation dépendante de la PI3kinase et à l'engagement de la voie non canonique dépendant de SHIP1. De plus, l'engagement d'EGFR inhibait l'action d'inhibition d'AKT de la protéine PTEN (16).

L'entrée du virus dans la cellule cible nécessite en tout premier lieu la reconnaissance de cette cellule par le virus. Dans le cas du HCMV, les protéines de reconnaissance n'ont toujours pas été identifiées, même si l'EGFR et des intégrines sont probablement impliquées (17). Ensuite, deux mécanismes ont été décrits. Le premier est la fusion de la membrane du virion avec la membrane plasmique de la cellule. Comme tous les virus herpes, la fusion des membranes repose sur les protéines gB et gH/gL. Ces protéines vont rapidement interagir dans le virion pour former des complexes stables qui seront préformés pour permettre la fusion avec la cellule hôte (18). De plus, une minorité des complexes gH/gL sont stabilisées par la glycoprotéine gO (complexes gH/gL/gO). La fusion des membranes repose également sur les protéines accessoires UL128, l'UL130 et l'UL131 pour l'infection des cellules épithéliales et endothéliales, mais pas pour les fibroblastes (19). Un second moyen pour le virion d'entrer dans la cellule cible est d'être endocyté, ce qui lui permet de se retrouver dans des particules

cytoplasmiques. Cette voie d'endocytose, initialement décrite pour les fibroblastes, a également été décrite pour les cellules endothéliales (20). Quel que soit le mode d'entrée du virion dans la cellule cible, l'ADN viral se dirige vers le noyau de la cellule. L'entrée dans le noyau résultera finalement soit de la fusion de la vésicule d'endocytose contenant le virion avec la membrane nucléaire, soit de l'adhésion du virion avec cette dernière.

3. Cycle de réplication virale et propagation de l'infection (phase productive de l'infection)

Plusieurs étapes de la production des virions ont lieu dans le noyau des cellules infectées. La première est la réplication de l'ADN viral qui est dépendante en grande partie de l'activité kinase de la protéine UL97 (21). UL97 est connu notamment pour être la cible du maribavir, parfois utilisé dans des maladies à CMV lorsque des résistances aux antiviraux de première intention se sont développées. Ses substrats cellulaires sont la protéine Rb (Retinoblastoma protein) et les lamines nucléaires A et C, des protéines de la régulation du cycle cellulaire (G1→ S) qui habituellement sont phosphorylées par des kinases cellulaires de la famille des CDCs (pour cyclin-dependent kinases) et la PKC (pour protéine kinase C). UL 97 phosphoryle également l'UL69, qui a des actions synergiques à celles de Rb et des lamines nucléaires. La phosphorylation de ces protéines, cellulaires et virales, va permettre la réplication de l'ADN viral, l'entrée en cycle de la cellule infectée et la sortie du virion immature du noyau cellulaire. En même temps que l'ADN viral se réplique, les gènes viraux sont transcrits en ARNm à l'origine des protéines virales produites dans le réticulum endoplasmique. Ces protéines, régulatrices ou de structure, retournent dans le noyau de la cellule. Elles permettent entre autres l'assemblage de la capsid qui, initialement vide, va ensuite intégrer l'ADN viral. S'en suit la formation du tégument qui va progressivement entourer la capsid pendant que cette dernière se dirige vers la membrane nucléaire interne. C'est lors de la traversée de cette enveloppe nucléaire et aux dépend de cette dernière que va

se former une enveloppe primitive autour de la capsid. La sortie de l'ADN viral du noyau vers le cytoplasme se fait alors sous la forme d'un virion immature.

Les dernières étapes de la formation des virions se déroulent dans le cytoplasme avec en particulier la constitution complexe de l'enveloppe définitive en deux étapes dans la zone intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et le golgi. Cette étape précède la sortie du virion mature de la cellule (exocytose) qui va pouvoir aller infecter d'autres cellules permissives.

4. La phase de latence virale

La latence a très longtemps été définie par l'intégration du génome viral dans l'ADN des cellules de l'hôte en l'absence de synthèse de protéine virale. En effet, lorsque des cellules sont cultivées et infectées par une souche modifiée de HCMV dans laquelle un gène codant pour une protéine fluorescente a été intégrée, un état de latence est observé après une vingtaine de jours, puisque l'ADN viral est présent en l'absence de production de protéines virales. Cette description de la latence peut laisser penser à un état de quiescence totale pendant laquelle le virus resterait en sommeil, jusqu'à ce que des conditions particulières lui offrent la possibilité de se réactiver, voire stimulent sa réplication. Cette conception passive de l'entrée en latence est aujourd'hui partiellement remise en cause puisque certaines molécules pourraient activement maintenir cet état, telle que l'UL84 (22). Alors que de nombreux types cellulaires peuvent être le site de la phase aiguë productive de l'infection, un nombre restreint de cellules a la capacité d'héberger l'infection chronique latente. Il s'agit principalement des cellules souches hématopoïétiques CD34^{pos} précurseurs des cellules de la lignée myéloïde, notamment les progéniteurs médullaires, et des monocytes du sang périphérique (19, 20, 21), mais également des cellules stromales périvasculaires (8).

La restriction de la latence aux progéniteurs myéloïdes et plus particulièrement monocytaires, c'est-à-dire l'absence de latence dans les progéniteurs lymphoïdes alors même que les cellules

multipotentes sont infectées de façon latente, pose également question sur le caractère "actif" de l'entrée en latence. En effet, cette observation interroge sur les actions du virus lors de la différenciation des progéniteurs médullaires vers la différenciation myéloïde pour soit résister aux défenses cellulaires, soit promouvoir la survie de ces cellules qui s'orientent vers la lignée monocyttaire (6). Quoiqu'il en soit, il est maintenant bien établi que cette phase de l'infection est dépendante de la transcription de certains ORFs. Le mécanisme principal de la latence est la répression du promoteur des gènes IE (MIEP pour major immediate early promoter) par des facteurs de transcription qui induisent une tri-méthylation de l'histone H3, inhibent l'acétylation de l'histone H4 et recrutent la protéine HP-1 (pour hétérochromatin protein-1), ce qui finalement modifie la conformation de la chromatine et empêche l'ADN polymérase d'accéder à la séquence de MIEP (24-28). La répression de la transcription de MIEP dans certains types cellulaires, non permissifs à une infection productive, établit un état de quiescence du virus dans la cellule infectée. Finalement, il ne faut pas considérer le terme quiescence au sens où la latence serait un état passif du virus.

De plus, même s'il est vrai que la synthèse des protéines virales est considérablement réduite, rendant "invisible" l'infection pour le système immunitaire, il est établi que des gènes viraux sont transcrits dans des progéniteurs hématopoïétiques CD34^{pos} infectés de façon latente et cultivés *in vitro* en présence de cellules stromales. Il a ainsi été montré que certains éléments du transcriptome de cellules CD34^{pos} infectées de façon latente ne sont plus identifiés après l'ajout de fibroblastes dans la culture qui induisent la sortie de latence du virus (29). Il est même possible de dire que la transcription de certains gènes viraux est nécessaire à l'établissement de la latence du virus dans les progéniteurs myéloïdes puisque l'inactivation du virus par les ultraviolets ne permet pas l'établissement de la latence (30), bien que cette activité transcriptionnelle soit quantitativement très faible si on la compare à celle observée lors de l'infection de fibroblastes (50 à 100 fois moins importante). Il faut noter que les

transcrits observés au cours de l'infection latente sont le plus souvent non spécifiques de cette période du cycle viral, et également produits au cours de la phase lytique de l'infection.

Parmi les transcrits les mieux étudiés, on peut citer LUNA (pour latent undefined nuclear antigen, UL81-82ast), identifié pour la première fois en 2005 dans des monocytes des sujets sains séropositifs (31), qui code pour la protéine UL82a également identifiée dans ces cellules. L'expression de LUNA est maximum dans les progéniteurs CD34^{pos}, et diminue jusqu'à s'arrêter lors de la différenciation en cellules dendritiques immatures. Cependant LUNA n'est pas spécifique de l'infection latente puisqu'il est également identifié au cours de l'infection productive. Sa cinétique est cependant très différentes dans les 2 périodes de l'infection. Ainsi il apparaît très précocement dans les cellules CD34^{pos} (4 heures après l'infection) et beaucoup plus tardivement dans les fibroblastes (2 jours) (31-32). Le mode d'action de LUNA reste encore inconnu. En effet, bien qu'il pourrait être impliqué dans la régulation du gène UL82 codant pour la protéine pp71, qui est un activateur de la synthèse des gènes IE, il n'a pas pu être montré que la synthèse de la protéine pp71 précède celle de MIE (32).

Comme l'expression de LUNA, celle d'UL138 est observable dans les cellules CD38^{pos} infectées de façon latente. Son expression est plus stable mais diminue également lors de la différenciation en cellules dendritiques matures. Une nouvelle fois, le transcrit est également synthétisé au cours de l'infection productive, comme en témoigne sa réapparition lors de la différenciation de la cellule dendritique immature en cellule dendritique mature en présence de TNF- α (32). Dans les études *in vitro*, la quantification de l'infection latente dans des cellules CD34^{pos} et dans des monocytes est ainsi évaluée par la mesure de l'expression de MIE et la présence du transcrit UL138 (33).

La protéine vIL-10 (ou cIL-10), codée par le gène *UL111A*, est un homologue viral de l'IL-10 humaine. Elle est également impliquée dans l'établissement de la latence puisque que la

souche delta111A du HCMV, dans laquelle le gène *UL111A* est absent, est moins efficace pour infecter les cellules CD34^{pos} et des monocytes de façon latente (33). Cependant l'infection peut tout de même être obtenue, donc *UL111A* n'est pas indispensable. *UL111A* est également impliqué dans le maintien de l'état de latence (34) et plus particulièrement son isoforme LAcmvIL10. Celui-ci est également présent au cours de la phase lytique de l'infection, alors que le second isoforme, nommé cmvIL-10, n'est identifié que dans l'infection lytique. La forme recombinante de LAcmvIL-10 est capable d'augmenter la synthèse d'IL-10 et de CCL8 par les progéniteurs myéloïdes infectés, via l'inhibition de la synthèse du mRNA hsa-miR-92a (33). Son expression est régulée par le facteur de transcription AML-1 (35).

5. Sortie de latence virale : réactivation du virus

Chez un hôte, l'infection à HCMV est marquée par des périodes de réplifications virales productives alternant avec des phases de latence. Il ne s'agit donc pas à proprement parler d'une infection chronique au sens de celles caractérisées par une réplification chronique continuellement détectable, comme le sont les infections par les virus de l'hépatite C (VHC) et de l'hépatite B (VHB) ou par le VIH. L'infection par le HCMV est plutôt le résultat d'un équilibre dynamique qui dépend de la survenue de certains événements cliniques chez l'hôte qui vont être utilisés par le virus pour sortir de sa latence, et de la capacité du système immunitaire à le maintenir en latence et à limiter les phases de réplifications virales.

a) La sortie de latence : inflammation et alloréactivité

Le premier initiateur de la sortie de latence du CMV ayant été mis en évidence est l'inflammation, dont l'importance *in vivo* est certainement majeure. Ainsi de nombreuses cytokines et molécules pro-inflammatoires peuvent causer la sortie de l'état de latence : TNF- α , Prostaglandine E2, catécholamines. Parmi elles le TNF- α , qui se lie à son récepteur présent à la surface des cellules infectées de façon latente, induit la libération de l'hétérodimère

p65/p50 du facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor- κ B) qui va pouvoir entrer dans le noyau cellulaire et se lier à la région promotrice des gènes IE et initier la réplication virale (36). Le rôle du TNF- α dans la sortie de latence du MCMV (murine CMV) a été démontré dans un modèle murin de transplantation pulmonaire (4). Chez l'Homme, cette sortie de latence induite par l'inflammation est retrouvée chez les patients avec une dermatite atopique chez qui la survenue du CMV est corrélée aux concentrations de TNF- α (37). L'alloréactivité est également une source d'inflammation stérile capable d'induire la différenciation des cellules infectées de façon latente et la réactivation du virus (38). Aussi, il a été rapporté à de multiples reprises que la survenue d'une virémie CMV chez un patient transplanté d'organe ou de cellules souches hématopoïétiques, traduisant une sortie de latence du virus, pouvait accompagner des épisodes de rejets aigus et survenir en cas de maladie du greffon contre l'hôte (39,40,41).

Il est d'ailleurs important de noter que la réactivation virale au sein des tissus inflammatoires peut ne pas s'accompagner d'une virémie, c'est-à-dire de la présence du virus à des niveaux détectables en périphérie. Ainsi, il a été identifié chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin une expression de protéines virales dans les zones inflammatoires mais pas dans les échantillons prélevés dans les zones saines adjacentes, alors même que les patients n'étaient pas virémiques (42). On peut parler de "micro-infection". Il s'agit surtout de garder à l'esprit que l'absence de virémie ne définit pas de façon certaine l'absence de réplication virale.

b) La sortie de latence: rôle de la différenciation des cellules myéloïdes.

La différenciation des progéniteurs hématopoïétiques infectées de façon latente par le CMV s'accompagne d'une réactivation du virus suite à la "libération" de MIEP. Cette différenciation est en elle-même suffisante pour déclencher la réplication virale. Ainsi, Reeves *et al.* ont étudié la réactivation du HCMV lors de la différenciation *in vitro* en cellules dendritiques des

progéniteurs myéloïdes CD34^{pos} ou des monocytes de sujets sains puis de la maturation des cellules dendritiques ainsi obtenues (43). La différenciation des cellules CD34^{pos} était obtenue après 7 jours de culture en présence d'un mélange de cytokines (TGF- β , TNF- α , Stem cell factor, Flt-3L, GM-CSF) et celle des monocytes après 6 jours de culture en présence d'IL-4 et de GM-CSF. Les auteurs ont pu montrer que le génome du HCMV est présent dans les cellules CD34^{pos}, les monocytes et les cellules dendritiques quelque soit leur précurseur et leur niveau de maturation. Cependant, les gènes IE ne sont exprimés que dans les cellules dendritiques matures, en accord avec les processus de méthylation/désacétylation de MIEP décrits précédemment. Le G-CSF, un facteur de croissance de la lignée granuleuse, est également capable d'induire la sortie de latence du virus chez la souris (44).

Un travail récent a étudié *in vitro* le déroulement de l'infection par le HCMV dans des monocytes issus du sang de donneurs ou de la lignée THP-1. Il a comparé une condition favorable à la latence (contrôle) à une seconde permettant le développement d'un cycle lytique complet, basée soit sur l'utilisation du PMA qui induit la différenciation des monocytes en macrophages et la libération de MIEP, soit sur l'incubation des monocytes avant l'infection avec de la 1,25(OH)₂ vitamine D3 (45). Dans cette étude le pourcentage de monocytes exprimant les gènes précoces IE-1 puis plus tardifs (UL44 et UL83) était très significativement augmenté suite à l'incubation avec la 1,25(OH)₂ vitamine D3, alors que les monocytes n'étaient pas différenciés en macrophages. Les auteurs montraient que les monocytes acquéraient cependant un phénotype plus mature et que cette modification phénotypique conditionnait la progression du cycle de réplication virale. Ainsi cette observation, bien qu'elle n'ait pas de signification clinique établie, démontre que la différenciation du monocyte en elle-même, en l'absence de stimulus inflammatoire favorise la réplication virale.

c) Le rôle de l'immunosuppression

De nombreuses données de la littérature indiquent que l'immunosuppression n'est pas à l'origine de la réactivation au niveau cellulaire (38). De plus il a été rapporté des réactivations virales chez les patients atteints d'infections bactériennes sévères (37,(46), de syndrome de détresse respiratoire aiguë (47) et de maladies inflammatoires telles que la dermatite atopique (37) et les maladies inflammatoires de l'intestin où une réactivation du CMV est observée chez 1/3 à 1/4 des patients (48), parfois avant l'instauration de tout traitement immunosuppresseur. Cependant l'immunosuppression constitue incontestablement un facteur favorisant la diffusion de la réplication virale et le développement de complications viscérales.

6. Mécanismes d'action des médicaments antiviraux

Plusieurs molécules possédant une activité anti-CMV ont été utilisées, ou le sont actuellement, en prévention ou traitement curatif en transplantation d'organe. Le plus fréquemment utilisé actuellement est le ganciclovir, ou son ester le valganciclovir qui est une molécule de ganciclovir sur laquelle a été ajouté une valine, ce qui lui confère une biodisponibilité de 10 à 60% et permet son utilisation par voie orale. Le ganciclovir est un analogue nucléosidique qui inhibe de façon compétitive l'élongation de l'ADN viral et par conséquent la réplication du virus. Sa forme active inhibant l'ADN polymérase est obtenue suite à 3 phosphorylations successives, la première étant réalisée par une kinase d'origine virale appelée UL97, les deux suivantes par des kinases cellulaires (49). Les mutations des gènes codant pour UL54 et UL97 peuvent engendrer des résistances au ganciclovir qui sont encore aujourd'hui responsables d'une surmortalité en transplantation pulmonaire (50).

Les autres molécules anti virales sont surtout utilisées en cas de résistance. Parmi elles, deux sont, comme le ganciclovir, des inhibiteurs non compétitifs de l'ADN polymérase. La

première est le foscavir, un analogue du pyrophosphate. Son utilisation est limitée par ses toxicités rénale, neurologique et hématologique. La seconde est le cidofovir, un analogue phosphorylé de la cytidine, qui présente également des toxicités rénale et hématologique, mais également ophtalmologique. Le maribavir ne cible pas l'ADN polymérase mais l'UL97, qui est exprimée lors de la phase initiale de réplication virale mais également à un stade tardif, et l'UL27, dont les mutations peuvent également induire des résistances au maribavir (51). Son profil de tolérance est meilleur que les inhibiteurs de l'ADN polymérase. Malheureusement, son efficacité n'a été démontré ni en transplantation hépatique ni en greffe de cellules souches hématopoïétiques (52,53). Son utilisation est donc actuellement réservée à des patients en impasse thérapeutique.

Les immunoglobulines intraveineuses (IvIg), parfois enrichies en immunoglobulines anti-CMV, ont été utilisées en traitement préventif chez le patient transplanté. Les mécanismes d'action des IvIg sont nombreux et restent pour une grande part mal compris, comme cela a récemment été rapporté par Javier Carbone (54). L'effet le mieux documenté est la neutralisation des particules virales. Cependant, des effets modulateurs de l'immunité innée et adaptative sont également envisagés. Leur utilisation est aujourd'hui réservée aux patients transplantés cardiaques et surtout pulmonaires en association aux traitements antiviraux. Ainsi, malgré l'absence d'essai thérapeutique, des données issues d'études rétrospectives semblent montrer un intérêt pour prévenir les maladies en CMV en transplantation pulmonaire, mais également le développement de la coronaropathie du transplant et de la bronchiolite oblitérante (55). Ils peuvent également être utilisés dans le traitement des maladies à CMV sévères, en particulier lorsqu'elles surviennent chez des patients hypogammaglobulinémiques (56,57). Plus récemment des anticorps monoclonaux anti-CMV ont été développés dans l'objectif d'administrer de plus fortes doses d'immunoglobulines spécifiques du virus en conservant une bonne tolérance. Ainsi, l'administration pendant les

deux premiers mois de la transplantation d'une combinaison de deux anticorps monoclonaux qui reconnaissent deux protéines distinctes de la membrane du virion et inhibent l'entrée du virus dans la cellule cible a été comparée à l'administration d'un placebo chez des patients transplantés rénaux D+R- (58,59). Ces anticorps monoclonaux, bien tolérés, réduisent la survenue d'une virémie dans les 6 premiers mois de la greffe (40,8% vs 70,2%) et l'incidence des maladies à CMV (3,8% vs. 15,8%). Cependant l'efficacité des anticorps monoclonaux, tout du moins cette association, est inférieure à celle des traitement antiviraux qui réduisent l'incidence de la maladie à CMV de 58 à 80%, avec en revanche plus d'effets indésirables.

Les traitements antiviraux ne sont actifs que lors de la phase répliquative du CMV. Ils n'éliminent pas le CMV des cellules infectées de façon latente. Ils ne sont pas non plus capables d'empêcher l'infection des sujets naïfs. Ainsi les patients infectés au moment d'une transplantation recevant une prévention antivirale sont sujets à développer des LT CD4 et CD8 spécifiques du CMV, ainsi que des anticorps anti-CMV (60,61).

B. Conséquences cliniques de l'infection par le CMV

1. Conséquences cliniques de l'infection par le CMV chez l'individu immunocompétent

Comme cela a précédemment été brièvement décrit, l'infection par le CMV est le plus souvent asymptomatique ou peu symptomatique chez le sujet immunocompétent. La manifestation la plus fréquente de la primo-infection CMV est le syndrome mononuculosique, dont elle représente la seconde cause après l'infection par l'Epstein Barr Virus (EBV) (62). Les signes cliniques (fièvre, splénomégalie, polyadénopathie) associés à ce syndrome sont d'autant moins sévères et fréquents que l'âge du sujet infecté est élevé. Il a été en effet rapporté une fréquence accrue des manifestations cliniques telles que la fatigue, les rash cutanés et les troubles digestifs, mais également de la thrombopénie (70%) chez les enfants (63). Le diagnostic de la

primo-infection repose alors sur la présence d'IgM anti-CMV. Les manifestations plus sévères au cours des syndromes mononucléosiques sont exceptionnelles et le plus souvent le résultat de surinfections bactériennes. La règle est la guérison spontanée, comme c'est le cas pour les hépatites cytolytiques qui sont souvent présentes au moment du diagnostic.

Il existe cependant quelques rapports de cas cliniques témoignant de maladie à CMV chez des sujets considérés immunocompétents, c'est-à-dire n'ayant ni traitement immunosuppresseur ni infection par le VIH. Ainsi, 15 cas de colites ont été colligés dans le cas de primo-infection ou de réactivation chez des patients le plus souvent sans co-morbidités, âgés de 22 à 85 ans (64). Ces colites étaient diffuses pour la moitié d'entre elles et évoluaient vers la guérison après traitement antiviral dans seulement la moitié des cas, alors que respectivement quatre et trois patients décédaient ou évoluaient vers une maladie inflammatoire chronique de l'intestin. Des cas d'appendicite ont également été rapportés. En 2008, une revue de la littérature a identifié 184 articles décrivant 290 patients immunocompétents avec une maladie à CMV (65). Elle confirmait que les manifestations digestives, qui affectent principalement le colon mais peuvent concerner l'ensemble du tractus, étaient les plus fréquentes. Mises à part les complications hématologiques et par ordre de fréquence, les autres manifestations concernaient le système nerveux central (myélites, encéphalites, méningites), le système vasculaire (thrombose, coagulation intravasculaire disséminée), les pneumonies et les manifestations oculaires. Aucune néphrite n'était recensée. Au final, la pathogénicité du CMV chez le sujet "sain" est peu fréquente.

Des données sont en revanche plus établies sur les conséquences de l'infection CMV chez des patients atteints de pathologies inflammatoires, infectieuses ou non, atteignant les organes cibles de la maladie à CMV. Les données les mieux établies concernent les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, qui regroupent les maladies de Crohn et les rectocolites hémorragiques. Ainsi, au cours des rechutes sévères une réplication du CMV peut

être mise en évidence chez environ 1/3 des patients au sein des zones inflammatoires, alors que le virus est rarement retrouvé chez les patients en période de rémission (48,66). Cette réplication au cours des poussées est habituellement expliquée par une synthèse accrue de cytokines inflammatoires telles que le TNF- α et l'IFN- γ , qui favorisent la sortie de latence du virus. L'impact du CMV sur le devenir des patients demeurent à ce jour débattu (67). Cependant, des données récentes plaident pour un rôle délétère du CMV et justifient l'utilisation du ganciclovir chez certains patients (68). Les patients hospitalisés en service de réanimation pour des chocs septiques ou des syndromes de détresse respiratoire aiguë représentent également une population intéressante à l'égard des possibles effets du CMV en dehors d'une immunosuppression avérée. En effet, s'il est connu depuis plus de 20 ans que le CMV peut se réactiver fréquemment chez ces malades, il a récemment été établi que la survenue d'une virémie est associée à une augmentation de la mortalité, de la durée d'hospitalisation et de la fréquence des infections opportunistes, ce qui n'est pas sans rappeler les effets indirects rapportés chez les patients transplantés (46,47,69). D'ailleurs, comme pour ces derniers, la relation physiopathologique est largement incomprise et l'efficacité d'un traitement antiviral non établi.

2. Conséquences cliniques de l'infection par le CMV sur l'individu immunodéficent et/ou greffé

a) Effet directs

Chez le patient transplanté, l'association d'évènements déclenchant la réactivation du virus (réponse alloimmune et infection) et d'une immunosuppression induite par les traitements confère un risque élevé de réplication virale, dont le niveau est suffisamment important pour être détecté dans le sang avec les techniques utilisée en pratique courante (antigénémie et PCR principalement). Ce haut niveau de réplication virale peut s'accompagner de manifestations cliniques. Ces dernières sont considérées comme directement liées à l'effet

cytopathogène du CMV, et regroupées sous le terme d'effets directs, que l'on oppose aux effets indirects du virus. Elles surviennent presque exclusivement chez le sujet ayant un déficit de l'immunité cellulaire comme dans l'infection par le VIH et le patient transplanté. Classiquement les termes "syndrome CMV" et "maladie à CMV" sont utilisés pour distinguer les manifestations clinico-biologiques aspécifiques de l'infection virale des atteintes d'organe. Le syndrome CMV est ainsi défini par l'association de signes cliniques comme la fièvre et une sensation de malaise, et de signes biologiques tels que la leuconéutropénie et la thrombopénie. Les atteintes d'organes du virus sont elles beaucoup plus diverses et témoignent du large tropisme du virus. On peut ainsi lister : les pneumonies, les atteintes gastro-intestinales qui peuvent concerner tout le tractus mais sont plus souvent localisées au colon, les hépatites, les manifestations neurologiques centrales, les rétinites, les néphrites, les myocardites et les pancréatites (70,71), comme illustrées dans la figure suivante. Chez le patient transplanté rénal, les atteintes pulmonaires, gastro-intestinales et hépatiques sont les plus fréquentes.

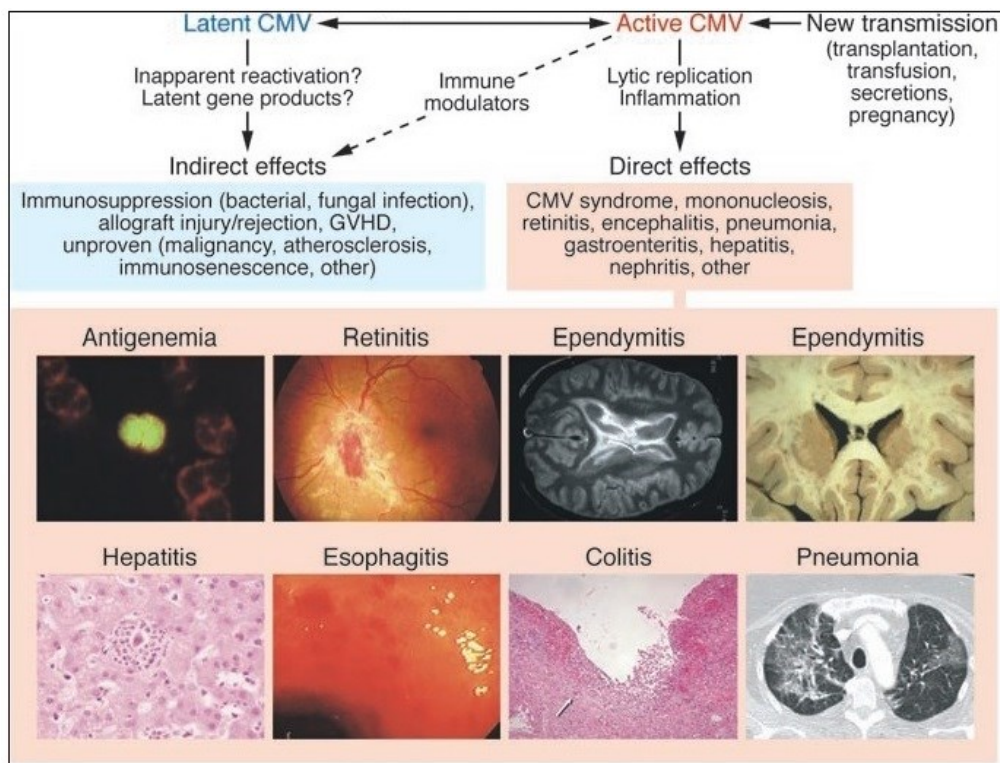


Figure 2: les effets directs et indirects du CMV (71).

L'épidémiologie de la maladie à CMV a considérablement évolué avec le développement des antiviraux et la mise en place de stratégies préventives ou préemptives dans les mois suivant la transplantation. Dans les premières années du développement de la transplantation rénale, la maladie à CMV était ainsi responsable d'une morbi-mortalité très importante. Pour exemple, dans la série de 141 patients transplantés rénaux à Baltimore à la fin des années 1970, 59 ont développé une maladie à CMV, le plus souvent sévère et entraînant le décès de 12 patients (72).

Historiquement, l'utilisation des traitements déplaçant les lymphocytes T fut reconnu comme le premier facteur de risque d'infection. Ainsi, dans une série américaine publiée en 1988 avant le développement des stratégies de prévention, l'incidence de l'infection CMV augmentait de 51 à 78% lorsque les patients recevaient de la thymoglobuline (73). Le risque viral lié à la déplétion lymphocytaire persiste dans des études plus récentes (74). Ce n'est que dans un second temps que l'importance de considérer les statuts sérologiques du donneur (D+ si séropositif, D- si séronégatif) et du receveur (R+ si séropositif, R- si séronégatif) a été mis en évidence (75). Aujourd'hui, il est maintenant clairement établi que le risque de maladie à CMV est maximum chez les patients D+R-, intermédiaire chez les patients R+ (D+R+ ou D-R+) et quasi nul chez les patients D-R-.

Les incidences de la maladie à CMV et de la virémie sont très variables en fonction des décennies, notamment en raison des modifications profondes des stratégies immunosuppressives et de l'évolution des techniques de détection du virus. Pour déterminer les incidences "naturelles" de la virémie CMV et de la maladie à CMV après la transplantation rénale, nous pouvons nous appuyer sur les études ayant évalué sur un grand nombre de patients les stratégies préemptives. Dans une étude réalisée chez 471 patients transplantés norvégiens entre 1994 et 1997, n'ayant pas reçus d'induction mais une trithérapie d'entretien par cyclosporine, azathioprine et stéroïdes, une Ag-pp65 positive était rapportée

chez 63% des patients, de façon similaire chez les patients D+R- (69%) et les patients R+ (67%). En revanche, la fréquence des maladies à CMV était beaucoup plus importante chez les patients D+R- (54%) que chez les receveurs R+ (19%), puisque la majorité des patients D+R- virémiques développaient une atteinte d'organe (76). Plus récemment, une équipe de Londres utilisant la PCR CMV a décrit l'histoire naturelle de la réplication du CMV dans les 90 premiers jours suivant la transplantation chez des patients recevant une immunosuppression plus proche des pratiques françaises actuelles, associant le basiliximab, le tacrolimus, le mycophénolate mofétil et la prédnisolone (77). Parmi les 294 patients transplants rénaux entre 2002 et 2010 exposés au CMV, 158 (54%) développaient une virémie dans les 90 jours suivant la transplantation, supérieure à 3000 copies/mL chez 79 (27%) patients, seuil retenu dans ce centre pour initier un traitement antiviral par ganciclovir ou valganciclovir. L'incidence était de 70% chez les patients D+R-, 53% chez les D+R+ et 44% chez les D-R+. Les patients D+R- et les receveurs R+ se distinguaient également par la valeur du pic de la charge virale, qui était plus élevée chez les premiers alors qu'elle restait inférieure à 4 log chez une majorité de patients R+. Il faut enfin souligner que dans de nombreuses études l'incidence de la virémie diffère chez les patients R+ en fonction de la sérologie du donneur, dans le sens où elle est plus fréquente chez les D+R+ que chez les D-R+ (78,79).

b) Effets indirects du CMV relatifs au devenir des greffons

Les effets indirects du virus regroupent un ensemble de maladies ou phénomènes épidémiologiques associés à la réplication du CMV chez le patient transplanté d'organe, dont la pathogénie demeure incertaine. Il est généralement fait l'hypothèse qu'ils pourraient être dus à une réplication virale de faible intensité et non détectable dans le sang périphérique, ou à des effets immunomodulateurs du virus. Ils sont très hétérogènes et finalement assez difficiles à classer. De plus, les résultats des études sont parfois contradictoires et le niveau de

preuve n'est pas homogène pour l'ensemble de ces effets indirects. Pour des raisons didactiques, Kotton a proposé de distinguer les effets indirects généraux tels que le diabète post-transplantation et les infections opportunistes, de ceux qui concernent l'organe transplanté (56). Il ne s'agit pas d'une classification mécanistique. Au regard de la thématique de nos travaux, nous n'aborderons dans ce manuscrit que les effets indirects ayant trait au greffon, c'est-à-dire au développement de lésions chroniques des transplants telles que la "néphropathie chronique du transplant" (CAN pour chronic allograft nephropathy) chez le transplanté rénal, la bronchiolite oblitérante (BOS pour bronchiolitis obliterans syndrome) en transplantation pulmonaire et la coronaropathie du transplant (CAV pour cardiac allograft vasculopathy) en transplantation cardiaque.

(1) CMV et néphropathie chronique du transplant.

Les premières études ayant analysé l'association entre la survenue du rejet chronique et le CMV ont présenté des résultats contradictoires. Le rejet aigu étant reconnu dans les années 80 comme le facteur de risque le plus important de développer un rejet chronique, certaines équipes ont étudié la relation entre le CMV, la survenue de rejets aigus et le développement de lésions de rejet chronique. Par exemple, une étude américaine a montré chez 1339 patients transplantés rénaux entre 1985 et 1991 que le rejet aigu histologiquement prouvé était associé à un risque plus élevé de pertes de greffons car il multipliait par 17 le risque de développer un rejet chronique, diagnostiqué sur des biopsies ou sur des greffons explantés (épaississement concentrique des artérioles, glomérulosclérose, atrophie tubulaire et fibrose interstitielle). Alors que la maladie à CMV n'était pas associée au rejet chronique (RR=1,3), le risque de développer un rejet chronique dans les suites d'un rejet aigu était plus élevé chez les patients qui avaient présenté une maladie à CMV. Dans cette étude la séquence temporelle entre le rejet aigu et la réactivation du CMV n'était pas étudiée. En effet, la virémie n'était mesurée qu'en présence de symptômes compatibles avec une infection virale et par conséquent la date

de première virémie n'était pas connue. Or la séquence temporelle peut apparaître comme un élément essentiel pour interroger la relation causale entre la réplication virale et le développement du rejet aigu. En effet, deux situations peuvent être observées. La première est qu'en cas de maladie à CMV le traitement immunosuppresseur est parfois réduit avec pour risque la survenue d'un rejet. Cette hypothèse est illustrée par les résultats d'une étude suédoise réalisée chez des patients transplantés rénaux ne recevant pas de traitement antiviral préventif ni de traitement immunosuppresseur d'induction (80). Dans cette étude, la détection d'une antigénémie pp65 (Ag-pp65) asymptomatique ne prédisposait pas au rejet aigu histologiquement prouvé, alors que la survenue d'un rejet aigu tendait à être plus fréquente dans les suites d'une infection symptomatique (RR=2,7, p=0,06). Nous pouvons raisonnablement faire l'hypothèse que l'immunosuppression a été modifiée en présence de signes cliniques et non dans le cas d'une réactivation asymptomatique, et interpréter la relation infection CMV-rejet aigu comme une conséquence de la réduction de l'immunosuppression. Cependant les particularités de cette cohorte, en particulier l'incidence très élevée des rejets (61%), rend difficilement généralisable les résultats de cette étude. Finalement, la plupart des autres études plaident plutôt pour une séquence "rejet → CMV" que "CMV → rejet". Le premier argument provient d'une étude suisse réalisée chez des patients transplantés rénaux ou rein-pancréas (81). Les auteurs reportaient un délai médian entre le rejet aigu et la survenue d'une maladie à CMV relativement court (40 jours), en comparaison avec les 441 jours séparant en moyenne les deux événements lorsque la maladie à CMV précédait le rejet. La séquence "rejet → CMV" a également été mise en avant dans une étude ayant montré pour la première fois chez des patients transplantés rénaux et hépatiques traités par ganciclovir oral pendant 3 mois que le risque de maladie à CMV à l'arrêt du traitement antiviral était multiplié par 6 lorsqu'un rejet avait été diagnostiqué au cours du premier trimestre (82). Une étude plus récente a tenté d'analyser plus finement la relation temporelle entre la réactivation virale et la

survenue du rejet (78). Elle a conforté le fait que le rejet avec une traduction clinique (ce qui correspond aux évènements analysés dans les études mentionnées ci-dessus) précède plus souvent la virémie que l'inverse - bien que cela ne soit pas exclusif - et que sur les biopsies systématiques la fréquence des lésions de rejets infracliniques n'étaient pas influencée par la survenue d'une virémie antérieure. De façon intéressante, le rejet n'apparaissait comme un facteur de risque de virémie que chez les patients qui conservaient une trithérapie immunosuppressive. L'ensemble de ces données suggère que l'alloréactivité doit surtout être considérée comme un déclencheur de la sortie de latence, alors que l'immunosuppression aurait un rôle dans l'extension de l'infection (83).

Le rôle du CMV dans le développement de lésions chroniques du greffon rénal est depuis longtemps suspecté, appuyé par des études réalisées chez le rongeur où la réplication du virus favorise une inflammation du greffon. Une des premières études réalisée chez l'Homme s'étant intéressé à cette question a reposé sur l'analyse de biopsies de surveillance réalisées 6 mois après une transplantation rénale (84). Cette étude, conduite chez 52 receveurs transplantés dans les années 90 sans prophylaxie antivirale ni traitement d'induction, les auteurs ont comparé les lésions rénales chez 41 patients avec une virémie précoce (11 D+R-, 27 D+R+, 3 D-R+) à 11 patients non virémiques (4 D+R-, 6 D+R+, 1 D-R+). La détection d'une Ag-pp65 n'était pas associée à une plus forte intensité de l'atrophie tubulaire, de la fibrose interstitielle et de la hyalinose artériolaire. En revanche, les patients présentant une réplication virale dans le greffon, évaluée par hybridation in situ de l'ADN viral ou par immunohistochimie, présentaient un épaississement intimal des petites artères. Cette étude, réalisée sur un faible effectif, a ainsi montré le possible impact délétère de la réplication du CMV dans le greffon, et suggéré que la mesure de la virémie ne reflétait pas fidèlement la réplication virale à l'intérieur du greffon. Cette même équipe a comparé dans une autre étude le devenir des greffons des patients chez qui la réplication virale dans le greffon persistait plus

malgré un traitement par ganciclovir, à ceux chez qui aucune réplication virale n'était observée (85). Le CMV était mis en évidence sur des biopsies réalisées "pour cause" entre 2 et 4 mois après la dernière virémie ou virurie détectable chez 17 (35%) patients. Cette réplication intra-greffon persistante était associée à une moins bonne fonction rénale après 1 an et 2 ans de transplantation, et finalement un risque de perte de greffon multiplié par 3,5.

Une étude récente réalisée par une autre équipe a confirmé ces résultats (86). Les auteurs ont étudiés la présence du CMV dans des biopsies de greffons rénaux réalisées "pour cause" dans les 5 premières années de greffe ou plus tardivement, mais également dans des pièces de transplantectomie de patients ayant perdu leur greffon d'une dysfonction chronique. En supplément des techniques d'hybridation *in situ* (ADN) et d'immunohistochimie (immediate-early antigen, late antigen et Ag-pp65), la sortie de latence du CMV était recherchée par RT-PCR qui étudiait la transcription du gène IE. La majorité de ces patients étaient D+R+ et seulement 7% avaient reçu une prophylaxie antivirale. Cette étude a confirmé d'une part la présence du CMV dans les greffons rénaux et d'autre part que la survie des greffons était moins bonne lorsque le CMV se répliquait de façon chronique dans les greffons. De plus, si la réplication virale était fréquente dans les premiers temps suivant la greffe puisque les protéines virales étaient détectables dans 64% des biopsies précoces, elle était encore plus fréquente et plus importante dans les biopsies tardives. En effet les antigènes viraux étaient retrouvés dans 93% des biopsies tardives et la proportion de cellules infectées dépassait 50% des cellules dans 58% des biopsies tardives positives pour le CMV, en comparaison à 31% des biopsies précoces. Cette étude insiste donc sur le rôle du CMV dans la dégradation chronique de la fonction du greffon qui apparaît comme un site de réplication important du virus même à distance de la greffe et probablement en dehors de l'épisode virémique.

(2) CMV et bronchiolite oblitérante

La transplantation pulmonaire représente une option thérapeutique pour le traitement de maladies graves telles que la mucoviscidose, l'emphysème, la bronchopneumopathie chronique obstructive, la fibrose pulmonaire et certaines formes d'hypertension artérielle pulmonaire. Si elle permet d'allonger la survie des patients, son succès à moyen et long terme est limité par le développement de lésions de rejet chronique caractérisées par une inflammation des voies aériennes supérieures de petit calibre favorisant le développement progressif d'une fibrose et une oblitération progressive de ces dernières. On parle de BOS pour "bronchiolitis obliterans syndrome".

La BOS est très fréquente. Ainsi l'analyse de plus de 10 000 patients issus du registre ISHT a révélé que la BOS était présente chez 28% et 74% des patients vivants avec un greffon fonctionnel respectivement à 30 mois et 10 ans (87). De façon intéressante, l'incidence de la BOS ne semblait pas diminuer en comparaison aux rapports précédents du registre. Enfin, il était constaté que la BOS était plus fréquente que la CAV chez les patients ayant eu une transplantation cardiopulmonaire, en sachant que l'incidence de la CAV à 5 ans dans cette étude était beaucoup plus faible que celle rapportée ailleurs (88,89).

La BOS se manifeste cliniquement par un syndrome obstructif d'aggravation progressive défini par une réduction du VEMS (volume d'expiration maximale par seconde) secondaire à l'obstruction des voies aériennes de petit calibre. Il entraîne une altération de la qualité de vie et grève le pronostic du patient avec une médiane de survie inférieure à 3 ans (90). Il s'agit d'ailleurs de la principale cause de décès après la première année de greffe (87).

Les facteurs de risque de développer un BOS sont principalement immunologiques - la survenue d'épisodes de rejets aigus cellulaires et la présence d'anticorps spécifiques du donneur (DSA pour donor specific antibodies) -, mais également le reflux gastro-œsophagien

et les infections pulmonaires (91). D'une façon plus générale les infections, notamment opportunistes et nosocomiales, sont fréquentes après transplantation pulmonaire. Les maladies à CMV sont les maladies opportunistes les plus fréquentes avec principalement des pneumonies. Le pronostic à court terme des pneumonies à CMV s'est considérablement amélioré avec l'utilisation des traitements antiviraux et aujourd'hui, les effets indirects et plus particulièrement le développement de la BOS sont des préoccupations très importantes dans la prise en charge du CMV. Cela est d'autant plus vrai que dans les études les plus récentes, menées chez des patients ayant bénéficié d'un traitement immunosuppresseur moderne et d'une prévention anti-virale, il persiste un impact de la pneumonie à CMV sur la survenue ultérieure d'une BOS et sur la survie des patients (91).

(3) CMV et coronaropathie du transplant

La transplantation cardiaque a connu des progrès importants, en particulier liés à une meilleure prévention du rejet aigu cellulaire ayant abouti à une amélioration substantielle du pronostic à 1 an (81%) (92). Finalement, un obstacle important au succès des transplantations cardiaques à moyen et long terme réside dans le développement progressif d'une occlusion des vaisseaux coronaires du transplant. En effet, la CAV est la première cause de perte de fonction des greffons cardiaques chez l'adulte après la première année (93), elle-même étant la seconde cause de décès après les cancers d'après les analyses les plus récentes des registres américains (92). Le mauvais pronostic associé à la CAV réside surtout dans le caractère tardif du diagnostic en l'absence de dépistage systématique, les signes d'insuffisance cardiaque restant finalement les seules manifestations cliniques de cette maladie chronique et insidieuse, indolore du fait de la dénervation cardiaque. Elle peut entraîner des infarctus du myocarde, des troubles du rythme et parfois une mort subite (94). Chez l'enfant, la CAV est la première cause de mortalité après la première année de greffe et explique 35% des décès et des retransplantations (95).

Le diagnostic de la CAV repose sur la coronarographie. La nomenclature la plus récente propose trois stades (léger, modéré et sévère) en fonction du degré de rétrécissement de la lumière des artères coronaires proximales ou plus distales, et de l'existence d'une dysfonction myocardique pouvant correspondre à des troubles de la relaxation ventriculaire et/ou à une altération de la fonction systolique avec une fraction d'éjection ventriculaire gauche <70% (96). En coronarographie, des lésions de CAV sont observées dans 30 à 40% des cas à 5 ans (88,89). Des techniques alternatives ont été développées pour diagnostiquer de façon plus précoce ou moins invasive les lésions de CAV. Les techniques non invasives sont le coroscanner, l'IRM cardiaque, la scintigraphie myocardique et les échographies de stress ou de contraste. Elles restent à l'heure actuelle moins performantes que la coronarographie. En revanche l'ultrasonographie intravasculaire, qui est une technique interventionnelle invasive, permet un diagnostic plus précoce de la CAV en mesurant très précisément l'épaisseur intimale. Ainsi, il est remarqué qu'un épaissement intimal est présent chez 37% des patients 1 an après la transplantation (97). De plus une augmentation de plus de 0,5 mm au cours de la première année de la greffe est associée à un risque accru de surmortalité à 5 ans par évènement cardiaque majeur (98).

La CAV est caractérisée par un épaissement concentrique (contrairement aux lésions coronaires athéromateuses sur cœur natif qui sont classiquement excentriques) et diffus des parois des artères et des veines coronaires. Trois types de lésions sont définies : une hyperplasie intimale concentrique qui est la lésion caractéristique, le développement de plaques athéromateuses qui ont la particularité de se développer sur l'ensemble du réseau coronaire notamment dans les portions intramyocardiques (et pas seulement épicaudiques) et des lésions de vascularites (99). La lésion la plus précoce est une endothélite définie par une infiltration de lymphocytes producteurs d'IFN- γ dans l'espace sous endothélial (100), accompagnés de monocytes qui se différencient en macrophages. Elle précède la prolifération

et la migration des cellules musculaires lisses de la media et des fibroblastes, qui s'accompagnent d'une accumulation de protéines de la matrice extracellulaire mais également d'un infiltrat inflammatoire polymorphe composé de macrophages et surtout de lymphocytes T. Au final, l'artère coronaire malade est le siège d'une inflammation qui peut concerner toutes les composantes de sa paroi en s'étendant de l'intima à l'adventice -les formes transmurales étant plus graves - et s'accompagner d'une rupture des limitantes élastiques interne et externe (même si l'atteinte de la limitante élastique externe est plus fréquente au cours de la maladie athéromateuse sur cœur natif) et d'une véritable myolyse. On peut alors parler de vascularite dont la complication est la thrombose endoluminale secondaire à l'exposition du sous endothélium.

Il semble que l'IFN- γ joue un rôle clé dans le développement de la CAV. En effet, deux études ont montré que cette cytokine induisait la prolifération des cellules musculaires lisses de greffons artériels humains transplantés dans des souris immunodéficientes (qui ne produisent pas d'IFN- γ), aboutissant à des lésions semblables à celles observées chez le patient atteint de CAV (101,102). De plus, l'IFN- γ restaure l'expression des molécules HLA de classe I et II à la surface des cellules endothéliales cultivées *in vitro*, et régule probablement cette expression membranaire *in vivo*, ce qui permet leur reconnaissance directe par les lymphocytes T CD4 alloréactifs (103). A noter d'ailleurs que cette expression de molécules HLA de classe I et II expose également les cellules endothéliales du greffon à la fixation d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur à leur surface, permettant le recrutement de cellules effectrices de l'immunité et l'activation de la voie classique complément qui aboutira à la formation du complexe d'attaque membranaire. Il a récemment été montré que les anticorps anti-HLA induisent aussi dans la cellule endothéliale la production et la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-6), de chimiokines (CCL5, CCL20) et de molécules d'adhésion (VCAM-1, E-sélectine) sous la dépendance de l'activation de la formation du

complexe d'attaque membranaire et de l'activation de la voie non canonique de NFκB, alors que les anaphylatoxines C3a et C5a ne sont pas impliquées dans ces mécanismes (104).

De très nombreux facteurs de risque de CAV ont été identifiés (listé par Seki *et al.* (105)) dont certains sont liés au donneur (âge et antécédents cardiovasculaires) et d'autres au receveur (âge, dyslipidémie, diabète, hypertension artérielle, tabagisme). Il faut d'ailleurs noté que la transplantation cardiaque pédiatrique présente deux particularités importantes par rapport à la situation chez l'adulte, à prendre en compte dans l'évaluation du risque d'apparition et d'évolution des lésions de CAV. Premièrement, les greffons sont plus jeunes donc avec peu ou pas de lésions athéromateuses alors que l'âge du donneur est un facteur de risque de CAV (106). Ces lésions du greffon liées au donneur justifient d'ailleurs une évaluation initiale si l'on veut évaluer précisément la progression des lésions après la transplantation. Deuxièmement ces receveurs n'ont pas de facteurs de risque cardiovasculaires.

Les évènements immunologiques sont également bien identifiés comme des facteur de risques de CAV. Ainsi les patients bénéficiant d'une seconde transplantation, développant au moins un rejet aigu cellulaire et dont le degré d'appariement HLA entre le donneur et le receveur est faible sont plus enclins à développer des lésions de CAV (104,107,108). Plus récemment le rôle des alloanticorps (DSA) et des autoanticorps dirigés contre le greffon a été mis en évidence (109,110,111,112).

La première étude qui a rapporté un lien entre l'infection à CMV et la CAV a été publiée en 1989 (113). Ces résultats ont été confortés par plusieurs études ultérieures (106,114,115,116). Dans la plus récente, les auteurs rapportent que la survenue d'une virémie CMV augmente le risque de développer des lésions de CAV par 2,3 dans une cohorte espagnole de 166 patients ayant bénéficié d'un dépistage systématique par des coronarographies itératives à 1, 5 et 10 ans (106). Les hypothèses physiopathologiques reliant le CMV et la CAV sont :

- que le virus favoriserait l'inflammation locale (117) qui est le déterminant majeur de la maladie athéromateuse, ce qui expliquerait aussi que le CMV est associé à la progression de l'athérome chez les patient non transplantés (118,119,120)

- que le virus induirait une dysfonction endothéliale (121).

(4) La physiopathologie du développement des lésions chroniques des greffons en rapport avec le CMV

Comme nous venons de le décrire, le CMV semble impliqué dans les différentes expressions du rejet chronique en transplantation cardiaque, pulmonaire et rénale. S'ils ont leurs particularités, ils ont également des mécanismes communs cellulaires et/ou cytokiniques, multiples et complexes, qui favorisent le développement de lésions vasculaires et de fibrose. L'appréhension du rôle du CMV dans l'établissement des lésions chroniques des transplants doit s'intégrer au sein de cette physiopathologie.

Le terme de rejet chronique est normalement réservé à des lésions liées à une alloréactivité. Ce rejet chronique à un stade avancé est caractérisé, quel que soit l'organe transplanté, par le développement de lésions vasculaires et d'une fibrose extensive qui est d'ailleurs le siège d'une infiltration leucocytaire, regroupées sous le terme de "vasculopathie du transplant", dont le substratum physiopathologique est la prolifération des cellules endothéliales qui abouti à l'obstruction plus ou moins complète des vaisseaux sanguins. Cette oblitération vasculaire induit d'ailleurs une hypoxie tissulaire en aval, qui est le principal stimulus de la synthèse de VEGF. De nombreux travaux ont été réalisés sur le rôle du VEGF dans le rejet d'organe. Il a ainsi été montré que sa production prolongée était associée au développement des lésions de rejet (122). Le VEGF est produit par les cellules endothéliales mais également par les cellules inflammatoires CD68^{pos} infiltrant le greffon au cours du rejet chronique (122,123). Ainsi l'hypoxie n'est pas le seul stimulus de l'angiogénèse impliqué dans le rejet d'organe mais

l'inflammation joue aussi un rôle important. Le concept "d'angiogénèse induite par les leucocytes", résultant de très nombreux modèles d'inflammation développés depuis les années 1970, a d'ailleurs été élaboré. D'autres facteurs angiogéniques que le VEGF sont produits au cours de l'inflammation, en particulier les cytokines inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF- α et l'IL-6, qui ont une action paracrine. Comme nous l'avons déjà expliqué, ces cytokines pourraient déclencher la réplication du virus à partir de ses sites de latence comme les endothéliums. Ainsi le CMV pourrait initier une boucle d'amplification des lésions liées à l'alloréactivité.

Le remplacement du tissu normal par du matériel fibreux est un autre élément clé observé dans les organes transplantés en dysfonction chronique. Le plus souvent considérée comme une dysfonction des processus de réparation tissulaire, qui nécessitent la sécrétion et l'action séquentielle de cytokines, d'enzymes et de facteurs de croissance produits par des cellules résidentes et par des cellules infiltrant les tissus lésés inflammatoires. Elle peut être décomposée en trois phases successives que sont le nettoyage du tissu lésé, la synthèse du nouveau tissu et notamment de la matrice extracellulaire, puis le remodelage. Elle doit aboutir à la restauration d'un tissu d'architecture normale et fonctionnel. Une synthèse non régulée de la matrice extracellulaire conduit au remplacement du tissu normal par des territoires fibreux non fonctionnels. Le développement chronique de la fibrose dans les organes transplantés a de nombreuses origines mais le fibroblaste, producteur de la matrice extracellulaire, reste toujours la cellule centrale dans les processus fibrosant. Le fibroblaste réside en grande quantité dans le rein, le cœur et le poumon. Dans les organes transplantés, il a également été fortement suggéré que des cellules épithéliales et endothéliales pouvaient dans certaines circonstances, notamment en présence de TGF- β et donc dans des contextes inflammatoires, être à l'origine de nouveaux fibroblastes en se différenciant puis en acquérant un phénotype fibroblastique. Cette génération de fibroblaste est appelée transition épithélio-

mésenchymateuse (TEM) ou endothélio-mésenchymateuse (TEndM). Des modifications épithélio-mésenchymateuses sont constatées dans les greffons rénaux avec des cellules épithéliales tubulaires qui n'expriment plus des marqueurs épithéliaux comme l'E-cadhérine mais produisent des molécules fibroblastiques comme la vimentine et de l'actine α (124). Concernant la TEndM la dédifférenciation des cellules endothéliales est caractérisée par la perte de l'expression de CD31 et de CD34, et l'acquisition de nombreux nouveaux marqueurs tels que FSP-1 (125,126).

L'inflammation, conséquence de toute lésion tissulaire, est un élément consubstantiel aux processus de cicatrisation. Elle repose sur l'action des cellules inflammatoires qui infiltrent le tissu lésé. Ces cellules sont principalement constituées de LT CD4 et de macrophages soit résidants, soit provenant de la différenciation de monocytes circulants qui infiltrent le tissu. Elles synthétisent des cytokines inflammatoires, des chimiokines permettant le recrutement de nouvelles cellules et l'activation de l'endothélium, ainsi que du VEGF (Vascular endothelial growth factor) qui est le facteur de croissance clé de la prolifération des cellules endothéliales en vue de former les néo-vaisseaux. L'angiogénèse est en effet un processus physiologique indissociable des phénomènes de réparation tissulaire. Il existe finalement des liens étroits entre le développement de la fibrose, la prolifération des cellules endothéliales, l'angiogénèse et l'inflammation. S'interroger sur le rôle du CMV dans le devenir des greffons amène à étudier comment le CMV peut moduler ces différents éléments et comment ces derniers pourraient influencer la biologie du virus et notamment sa réplication.

Les travaux de l'équipe de Portland ont apportées des données essentielles pour expliquer comment l'infection par le CMV pourrait interférer avec les processus d'angiogénèse et de réparation tissulaire dans le contexte de la transplantation. Ce groupe a étudié le "sécrétome" des cellules infectées par le RCMV et le HCMV dans un modèle de transplantation, tant au niveau transcriptomique (étude des ARNm) que protéique, et l'a comparé à celui de cellules

non infectées ou issues d'organes non transplantés (127,128). Suite à la primo-infection du rat receveur d'un greffon cardiaque allogénique, les auteurs ont constaté que l'expression des ARNm (micropuce étudiant plus de 20 000 transcrits) à J21 post greffe, c'est-à-dire au moment où se développent les lésions de vasculopathie du transplant, était profondément modifiée dans le tissu cardiaque pour 385 gènes. Parmi ces gènes, 134 voyaient leur régulation encore significativement modifiée 28 jours après la transplantation. Ces gènes sont impliqués dans de très nombreux systèmes mais 134 sont connus pour participer à la cicatrisation tissulaire. Les gènes dont l'expression était quantitativement la plus modifiée étaient ceux codant les protéines MMP12, l'ostéopontine et ses inducteurs, l'activateur du plasminogène urinaire (uPA, urokinase) et son récepteur (uPAR). Les auteurs ont mis également l'accent sur les gènes régulateurs de l'angiogénèse. De plus, l'expression de nombreuses cytokines inflammatoires étaient altérée par le RCMV comme le TGF- β et l'IL-12. L'analyse ciblée en RT-PCR des transcrits des gènes sélectionnés par l'analyse des puces à ARN, par RT-PCR, a confirmé les résultats antérieurs mais surtout ajouté deux éléments importants. Tout d'abord, la cinétique d'expression était très variable en fonction des molécules, ce qui rend l'analyse encore plus complexe. Ensuite, l'influence de l'infection virale sur la transcription des gènes est différente en fonction du type de la cellule infectée, alors que le CMV peut infecter tous les types cellulaires participant aux mécanismes d'angiogénèse et de réparation tissulaire. En effet le CMV peut tout aussi bien infecter les fibroblastes, les cellules endothéliales que les cellules épithéliales, sans oublier les cellules inflammatoires qui éventuellement infiltrent le greffon. Ainsi les cellules musculaires lisses sont les principales productrices d'ostéopontine, les fibroblastes d'uPAR et de cathepsine E alors que ces deux types de cellules et les cellules endothéliales produisent toute de grandes quantités d'urokinase et de MMP9. Cette constatation doit être prise en compte dans

l'interprétation des modèles *in vitro*. Par ailleurs, cela pourrait expliquer que l'impact de l'infection sur le greffon puisse varier en fonction de la nature de l'organe.

In vitro, le surnageant des fibroblastes infectés, en comparaison à celui recueilli dans les cultures de fibroblastes non infectés, favorise la formation de néo-vaisseaux ainsi que la croissance de ces derniers. Suite à une lésion de nature électrique des cellules en cultures, la reconstitution d'un tapis endothélial au fond des plaques est meilleur avec le surnageant des fibroblastes infectés. De façon intéressante, l'ajout de foscarnet à la culture fibroblastique infectée fait perdre en partie les propriétés angiogéniques de leur surnageant, ce qui laisse présager l'importance d'une réplication virale complète alors même que très peu de protéines virales sont retrouvées dans le surnageant. Bien que complexe et mettant en jeu de très nombreuses molécules, l'effet angiogénique de certains composants du surnageant a pu être mieux précisé. C'est le cas notamment de l'IL-6 qui active la survivine et prévient ainsi l'activation des caspases effectrices 3 et 7 (129). L'infection par le CMV apparaît donc comme un modulateur important de l'angiogénèse. D'autres travaux ont en plus détaillé des comment le virion était capable *in vitro* d'induire la dégranulation de certaines populations plaquettaires et ainsi la libération de facteurs angiogéniques et notamment d'une molécule proche du VEGF (130), suggérant que le CMV peut également promouvoir l'inflammation et l'angiogénèse en agissant sur les plaquettes qui sont pourtant des cellules dépourvues de noyau et donc non permissives à l'infection.

Par ailleurs, l'endothélium est une cellule cible du CMV. Au cours des premières étapes de l'infection, c'est-à-dire lors de la synthèse de gènes "immediate early" et "early", l'infection de cellules endothéliales par le CMV s'accompagnait d'une surexpression du récepteur β de l'endothéline, connu pour être exprimé dans les cellules endothéliales rénales (131). Il est connue que la régulation de la synthèse d'endothéline et la balance des récepteurs de type A et B sont impliquées dans le développement de plusieurs maladies rénales telles que la

polykystose et la néphropathie diabétique, en accord avec les modèles expérimentaux ayant montré le caractère profibrosant de l'endothéline, en particulier dans le rein et le poumon (132,133). Plus tardivement, sept à dix jours après le début de l'infection, il a récemment été montré par une équipe américaine une surexpression de l'intégrine $\alpha 5\beta 6$ (promoteur du gène : plasminogen activator 1) dans plusieurs types de cellules endothéliales d'origine ombilicale, pulmonaire ou utérine. Les auteurs ont pu montrer que cette surexpression induisait l'activation de TGF β -1 capable dans ce modèle *in vitro* d'activer la voie Smad3 via le récepteur ALK5 (pour activin like receptor 5) impliquée dans le développement de lésions de fibrose.

Il est donc possible, à partir de l'ensemble de ces données expérimentales, d'élaborer comment l'infection par le CMV de nombreux types cellulaires, en particulier dans un contexte inflammatoire, pourrait influencer les mécanismes de réparation tissulaire et d'angiogénèse en promouvant le développement de la fibrose et de lésions vasculaires.

c) Stratégies thérapeutiques anti CMV et impact des traitements antiviraux sur les effets indirects en transplantation.

(1) Données expérimentales.

Peu d'études ont étudié l'impact d'un traitement antiviral sur le développement des lésions de rejet chronique dans des modèles animaux de transplantation.

En 2001, une équipe hollandaise a étudié l'impact du ganciclovir dans un modèle de BOS qui consiste chez le rat à implanter la trachée d'un donneur allogénique sur le grand épiploon (134). Dans ce modèle, le RCMV était inoculé au receveur par voie intrapéritonéale soit 8 semaines avant la transplantation (D-R+), soit 3 heures après la transplantation, alors que le donneur n'était pas infecté. Cette dernière situation n'a pas son semblable chez l'Homme puisqu'il s'agit d'une infection aiguë du receveur au moment de la transplantation non

transmise par le greffon. Dans ce modèle particulier de BOS, le ganciclovir réduisait les lésions trachéales, aussi bien de nécrose que de prolifération épithéliale.

Les données expérimentales sont un peu plus fournies concernant la CAV. Une première étude a étudié le ganciclovir dans un modèle de transplantation cardiaque hétérotopique chez le rat, traité par cyclosporine (135). Dans ce modèle, les rats receveurs étaient infectés le lendemain de la transplantation par le RCMV inoculé par voie péritonéale, alors que le donneur n'était pas infecté. L'administration du ganciclovir pendant 30 jours permettait de prévenir l'épaississement intimal du greffon observé chez les rats infectés non traités. L'équipe de Streblow a apporté quant à elle des données plus approfondies sur l'impact du valganciclovir pour prévenir le développement du rejet chronique, dans un modèle de transplantation cardiaque allogénique chez le rat (souches différentes de la publication précédente) utilisant également la cyclosporine. Dans ce modèle le rejet chronique conduit à l'arrêt des battements cardiaques entre 55 et 120 jours après la transplantation (136). Le schéma expérimental a permis d'étudier 4 situations distinctes et deux types de comparaison. La première découle du moment de l'infection par le RCMV qui permet de distinguer l'infection latente de l'infection aiguë, la seconde provient du type d'animal infecté qui peut être le donneur ou le receveur. Ainsi les auteurs ont pu comparer les donneurs infectés 7 jours avant la transplantation (ADI) et les receveurs infectés au lendemain de la greffe (ARI), et surtout les donneurs et les receveurs infectés de façon latente 6 mois avant la transplantation (respectivement LDI ou LRI), qui représentent les transplantations D+R- et D-R+ (alors que les groupes ADI et ARI n'ont pas d'équivalent chez l'Homme). Ils ont observé que le rejet chronique survenait plus tôt chez tous les rats infectés en comparaison aux rats contrôles. Au sein des rats infectés, il survenait plus précocement chez les rats LDI que LRI, avec des lésions de vasculopathie du transplant plus sévères. Si tous les rats avaient une sérologie positive, les LDI se distinguaient des autres groupes par l'absence de virus dans les glandes

salivaires. Ainsi on peut conclure que le CMV favorise le développement des lésions vasculaires de rejet chronique, d'autant plus s'il a infecté le donneur (et donc le greffon) de façon latente, en acceptant l'idée que les lésions vasculaires se sont effectivement développées après la transplantation dans le groupe LDI. Les auteurs ont ensuite administré du ganciclovir chez des rats ARI et LDI et montré que l'efficacité du ganciclovir pour prévenir l'apparition des lésions de rejet en cas d'infection aiguë n'était pas retrouvé chez les rats LDI. Chez ces rats, l'utilisation de micropuces à ARN a montré une surexpression de nombreux gènes correspondant à des cytokines proinflammatoires, des molécules d'adhésion, de nombreux facteurs de croissance, des protéines de la matrice extracellulaire et des chimiokines dont CXCL13, CCL21 et CCL19 qui sont impliquées dans la formation des organes lymphoïdes tertiaires.

En transplantation rénale, l'étude la plus approfondie sur la prévention par le ganciclovir des effets indirects du CMV concernant le greffon a été réalisée dans un modèle murin de primo-infection (D+R-) par une souche génétiquement modifiée de MCMV capable d'infecter efficacement aussi bien les souris donneuses (BALB/c) que receveuses (C57BL/6), inoculée par voie intrapéritonéale 3 mois avant la transplantation (137,138). Dans ce modèle, le ganciclovir diminuait l'infiltrat induit par le MCMV, composé de macrophages, de cellules dendritiques myéloïdes et de lymphocytes NK. Cependant, le ganciclovir ne permettait pas une réduction de l'infiltrat jusqu'au niveau observé chez les souris non infectées. Cet effet du ganciclovir n'était pas maintenu à l'arrêt du traitement. Concernant l'infiltrat des LT CD8^{pos} CD4^{pos} et des LB, il était également majoré dans les greffons des souris D+R-. En revanche, il n'était pas affecté par l'utilisation du ganciclovir, en particulier pour les LT CD8^{pos}. Finalement, l'impact du ganciclovir sur les lésions rénales 42 jour après la transplantation est contrasté, même si l'inflammation dans le greffon (œdème interstitiel, artérite, infiltration par les monocytes et les lymphocytes NK) semble réduit.

Au final, peu d'études ont étudié chez l'animal l'impact de l'infection CMV sur le devenir des greffons. L'ensemble de ces études, conduites chez le rongeur, montrent que l'inhibition temporaire de la réplication virale (en aval de la synthèse des protéines IE) prévient l'apparition des lésions de CAV et de BOS qui sont majorées chez les animaux infectés, tout du moins si l'infection est aiguë au moment de la transplantation. La pertinence de ces modèles d'infection aiguë peut cependant être discutée puisque le virus n'est pas transmis par le greffon mais inoculé directement au receveur, ce qui n'a pas d'équivalent chez l'Homme. Par ailleurs, l'efficacité du ganciclovir semble plus limitée en cas d'infection latente du donneur. Concernant la transplantation rénale, les données sont peu nombreuses mais semblent montrer un effet sur le recrutement au sein du greffon des effecteurs de l'immunité innée alors que l'effet n'est pas retrouvé pour les lymphocytes T et B.

(2) Données cliniques.

Les essais cliniques visant à évaluer l'efficacité des traitements antiviraux ont toujours comme objectifs principaux de réduire l'incidence de la virémie et prévenir la survenue d'une maladie à CMV. Ainsi peu d'études cliniques ont étudiés l'impact de la prévention antivirale sur la survenue des effets indirects du virus.

Deux larges métaanalyses publiées en 2005 ont apportés des résultats différents (139,140). En effet, si elles montraient toutes les deux une réduction de la survenue des infections opportunistes, leurs résultats divergeaient concernant l'impact sur la survenue du rejet aigu. La métaanalyse la plus récente et la plus importante (3850 patients issus de 34 essais cliniques) a été réalisée selon la méthodologie Cochrane et publiée en 2013 (141). Elle a confirmé, comme attendu, le bénéfice de la prophylaxie pour réduire la morbidité liée au CMV quel que soit l'organe transplanté, mais aussi indépendamment du statut sérologique du receveur. Cependant elle n'a pas retrouvé d'amélioration de la survie des greffons ni de réduction du risque de rejet aigu en lien avec la prévention anti-virale. Concernant les infections

opportunistes, l'utilisation d'une prévention antivirale réduisait le risque d'infection à *herpes simplex*, de zona, d'infection bactérienne et d'infection parasitaire. La survenue d'infections fongiques n'était quant elle pas prévenue avec la prophylaxie anti-CMV. La dernière étude apportant des informations intéressantes sur la prévention des effets indirects du CMV est une analyse du registre CTS qui a analysé le devenir de 52 437 patients transplantés exposés au CMV. Parmi les 11077 receveurs D+R-, 75% avaient reçu une prophylaxie antivirale, alors qu'une stratégie préemptive avait été privilégiée chez 70% des patients R+ (142). Dans cette étude, la survie des greffons après censure des décès était meilleure lorsqu'une prophylaxie avait été privilégiée chez les receveurs de reins D+, mais pas chez les patients D-R+. Ce résultat fait écho aux publications que nous rapportons dans ce travail de thèse, qui plaident pour un impact de la séropositivité du donneur sur la survie des greffons. Elles font également échos aux résultats d'un essai thérapeutique qui avait montré une amélioration de la survie des greffons après utilisation d'une prévention antivirale par le ganciclovir oral chez les D+R+, qui n'était pas observée chez les patients D-R+ et D+R- (143).

D'autres stratégies sont actuellement en cours d'évaluation pour réduire le risque de maladie et syndrome CMV, notamment l'utilisation des inhibiteurs de mTOR. On peut citer un essai clinique prospectif randomisé publié récemment qui a montré le bénéfice d'un remplacement du tacrolimus par l'évérolimus entre 7 et 11 semaines après la transplantation cardiaque sur le développement de la CAV, alors que l'incidence des rejets aigus était plus élevée (144). Il faut noter que l'incidence de la virémie CMV était significativement plus faible chez les patients traités par l'inhibiteur de mTOR (6% vs. 27%). Ces résultats sont préliminaires et constituent peut-être une piste thérapeutique intéressante.

III. Réponse immunitaire anti-CMV

La Réponse immunitaire anti-CMV implique des acteurs à la fois de l'immunité innée et adaptative. Les rôles de chacun de ces acteurs dans les différents aspects de l'infection par le CMV restent encore débattus.

A. Immunité innée

1. Les lymphocytes NK

Les cellules de l'immunité innée jouent un rôle important dans la défense contre les infections virales, ce qui est également vrai dans l'infection à CMV. Les lymphocytes NK sont ainsi reconnus comme des cellules clés dans le contrôle de l'infection, et cela est particulièrement démontré dans les modèles murins d'infection par le MCMV (145).

Chez l'Homme, les données sont plus récentes et le rôle des lymphocytes NK semble moins important. Une sous-population de lymphocytes NK $CD3^{neg} CD56^{dim} CD57^{hi} NKG2C^{hi} CD16^{pos}$ apparaît comme surreprésentée (20% en moyenne) chez les sujets sains séropositifs (146). Il a d'ailleurs été constaté chez 6 patients transplantés d'organe que l'expression de CD57 apparaissait et se majorait progressivement dans les suites de la virémie CMV, alors qu'ils recevaient une thérapie antivirale efficace. Cette sous-population de lymphocytes NK, qui n'est pas retrouvée dans l'infection EBV, persiste dans le temps alors que le virus entre en latence (147). Finalement, il a été mis en évidence que l'expansion de ces lymphocytes NK $CD57^{pos}$, que certains appellent "mémoire" par analogie aux lymphocytes T mémoire, persistent dans l'infection à CMV grâce à l'engagement du co-récepteur activateur CD94/NKG2C par son ligand HLA-E (exprimé par les fibroblastes infectés par le HCMV) et la présence d'IL12, une cytokine inflammatoire de la réponse Th1 majoritairement produite *in vivo* par les cellules dendritiques (148,149). La dégranulation de ces lymphocytes NK, qui par ailleurs expriment faiblement les récepteurs inhibiteurs NKG2A et KIR3DL1, peut être

obtenue suite aux liaisons de NKG2C et surtout du CD16 avec leurs ligands respectifs (146). Ainsi, l'activité cytolytique *in vitro* de ces cellules est augmentée en présence d'immunoglobulines G anti-CMV qui se lient par leur fragment Fc au récepteur FcGR1IA (CD16) exprimé à la surface des lymphocytes NK (150). Elles sont également capables de sécréter de l'IFN- γ , comme montré dans une étude récente en transplantation de cellules souches hématopoïétiques (148).

2. Les lymphocytes T gamma-delta

L'autre type cellulaire appartenant à l'immunité innée et impliqué dans l'immunité anti-CMV est la population des lymphocytes T gamma-delta (LT $\gamma\delta$), et plus précisément les LT $\gamma\delta$ V δ 2neg. Ces lymphocytes "non conventionnels", qui représentent seulement 0.5 à 1% des lymphocytes T circulants chez les sujets non infectés par le CMV, s'accumulent chez les sujets séropositifs où ils représentent environ 5 à 10% des lymphocytes T circulants, et parfois beaucoup plus chez certains individus. La première description de cette prolifération a été faite chez des patients transplantés rénaux au moment de la virémie CMV (151). Ces LT $\gamma\delta$ V δ 2neg persistent au long cours et s'accumulent dans les tissus périphériques et dans le sang, ce qui explique qu'ils sont plus fréquents chez les sujets sains séropositifs et que leur nombre est corrélé à l'âge (152,153). Le phénotype dominant des LT $\gamma\delta$ V δ 2neg est de type effecteur mémoire en différenciation terminale (TEMRA pour Terminally differentiated effector memory), comme de nombreux lymphocytes T CD8 mémoire anti-CMV. Par ailleurs, environ 75% des LT $\gamma\delta$ V δ 2neg induits par le CMV ont la particularité d'exprimer le CD16, contrairement aux LT CD8 mémoires anti-CMV de phénotype TEMRA (154). Le principal acteur de l'interaction avec les cellules infectées est le TCR $\gamma\delta$ qui reconnaît par exemple la molécule constitutive EPCR (pour endothelial protein C receptor) à la surface des cellules endothéliales (155). L'expression majorée des molécules de co-stimulation telles que LFA-3 et ICAM-I par les cellules infectées par le CMV, qui lient respectivement les molécules CD2

et LFA-1 à la surface des $\text{Ly}\delta\text{V}\delta\text{2neg}$, joue également un rôle dans la cytotoxicité anti-CMV de ces cellules. Enfin le CD16 agit de façon importante dans l'activation de ces cellules qui ont des capacités cytotoxiques (expression de perforine et granzyme) et de synthèse de cytokines, notamment d'INF- γ et de TNF- α .

3. Les cellules dendritiques

Les données concernant le rôle des cellules dendritiques dans le contrôle de l'infection CMV sont nombreuses. La majorité des études se sont plutôt intéressées au rôle des cellules dendritiques myéloïdes dans la propagation de l'infection. En effet, elles sont parmi les premières cellules infectées aux différents sites d'entrée du virus lors de la primo-infection et, en permettant la réplication productive du virus au cours de leur maturation et de leur migration, elles concourent à la diffusion du virus et sa présentation aux lymphocytes spécifiques. La majorité de ces travaux se sont focalisées sur l'étude des cellules dendritiques myéloïdes dérivées de monocytes *in vitro* (145). Ce modèle semble d'ailleurs pertinent puisque ces cellules différenciées *in vitro* ont des caractéristiques communes aux cellules dendritiques sanguines des sujets séropositifs isolées différenciées *in vivo* (156). En effet, elles ont un phénotype de type interstitiel/dermique immature ($\text{HLA-I}^{\text{pos}}$ $\text{HLA-DR}^{\text{pos}}$, CD1c^{pos} , CD83^{dim} CD86^{dim} , $\text{E-cadherin}^{\text{neg}}$). De plus, elles sont permissives à l'infection *in vitro* par le HCMV et expriment les gènes IE et pp28, alors que les monocytes intègrent le génome du CMV mais ne permettent pas sa réplication. Il est également possible d'induire la réactivation du CMV présent au sein des cellules dendritiques circulantes chez une large majorité des sujets séropositifs. Il faut noter que le comportement des différents types de cellules dendritiques varie vis-à-vis de l'infection. Les résultats sur les cellules de Langerhans sont particulièrement intéressants (157). Il a été montré que des cellules de Langerhans matures, obtenues à partir de cellules de Langerhans infectées à l'état immature, sous l'effet d'une association de CD40L et du LPS, avaient la capacité de synthétiser les protéines IE. Au

contraire, la maturation de cellules de Langerhans immatures elles mêmes dérivées de cellules CD34^{pos} infectées de façon latente ne permettraient pas une entrée en cycle du virus dans les cellules de Langerhans. Ainsi, les cellules de Langerhans rencontrant le virus pour la première fois pourraient diffuser l'infection, alors que celles des individus infectés de façon latente seraient incapables de présenter efficacement les peptides viraux dans les organes lymphoïdes secondaires, facilitant ainsi les épisodes de superinfection.

Le rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes a lui été peu exploré. On peut cependant citer les travaux réalisés sur les souris Pearl, caractérisées par un déficit en Adaptor protein-3. Ces souris contrôlent normalement l'infection par le MCMV alors qu'elles présentent un défaut de production d'IFN- α par leurs cellules dendritiques plasmacytoïdes (158). Ce résultat suggère donc que ces dernières ne sont pas nécessaires au contrôle de l'infection CMV.

Comme la majorité des pathogènes, certains composants du CMV sont reconnus par des récepteurs de l'immunité innée, notamment exprimés par les cellules dendritiques qui sont à l'interface avec l'immunité adaptative. Parmi les récepteurs impliqués dans l'immunité anti-CMV, les TLRs (Toll-like receptors) occupent une place importante. Des modèles murins ont ainsi mis en évidence l'importance de la production des interférons α/β et de l'ILp70 par les cellules dendritiques et les macrophages pour activer les lymphocytes NK, dont l'action est dépendante de MyD88 et TLR9 qui reconnaît des motifs CpG non méthylés dans l'ADN (159) (160). Chez l'Homme, les protéines membranaires gB et gH du HCMV se lient au TLR2 et déclenchent la production de cytokines proinflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8) par la voie NF κ B (161,162,163). SMIP2.1 et l'acide lipoteichoïque, des agonistes de TLR2, permettent également de renforcer la réponse *in vitro* des lymphocytes T CD8 anti-pp65 stimulés par des cellules dendritiques chargées en pp65 (164,165). Il est intéressant d'observer que le HCMV produit lui même un inhibiteur de la synthèse de TLR2, le micro-ARN miR-UL112-3p, qui inhibe ainsi la réponse anti-CMV (163). L'induction de la synthèse des interférons de type I

semble être plus complexe que la synthèse des cytokines sus-citées, nécessitant l'entrée du virus dans la cellule et la mobilisation de raft lipidiques (166).

4. Le complément

Le rôle du complément dans la défense contre le CMV a peu été étudié (167). Son action semble limitée à l'activation de la voie classique en présence d'anticorps dirigés contre le virus. En effet, si l'activation de la voie alterne *in vitro* a été mise en évidence par l'intermédiaire de l'apparition de dépôts de C3 à la surface des virions en l'absence d'anticorps anti-CMV, il n'a pas pu être démontré dans ces conditions que la cascade du complément pouvait aboutir à la formation du complexe d'attaque membranaire. Cela serait dû à la présence d'inhibiteurs à la surface du virion, en particulier des protéines CD46, CD55 et CD59.

B. Immunité adaptative

Les acteurs de l'immunité adaptative sont les LT et les LB. Les deux particularités essentielles du système immunitaire adaptatif sont d'avoir un répertoire de reconnaissance des antigènes extrêmement diversifié (plusieurs millions de spécificités) et une capacité à établir une réponse mémoire. Cette caractéristique générale de la réponse immunitaire adaptative confère au système immunitaire sa capacité à prévenir ou à contrôler rapidement les infections secondaires par des virus étroitement proches génétiquement (168). Cependant le CMV constitue une exception notable à cette règle. En effet il peut établir des infections persistantes à plusieurs reprises chez des hôtes immunocompétents. Ainsi cette capacité est probablement la raison de la présence de géotypes différents de HCMV chez un même individu (169). Cette capacité à établir des infections persistantes secondaires en dépit de la persistance préexistante d'un virus CMV chez un hôte est dénommée superinfection. Ainsi il faut distinguer trois éventualités dans le cas d'une transplantation d'organe solide. En premier lieu,

le CMV du receveur peut se réactiver chez le patient séropositif infecté de façon latente. En second lieu, le virus du donneur peut également se réactiver et réinfecter le receveur séropositif (superinfection du sujet D+R+), ou infecter un receveur naïf (primoinfection des sujets D+R-). Les mécanismes immunitaires adaptatifs mobilisés pour répondre à ces différentes modalités d'infections peuvent être différents (170).

1. Lymphocytes T CD4

Classiquement, l'activation des lymphocytes T CD4 (LT CD4) dans les organes lymphoïdes secondaires par les cellules dendritiques est la première étape de la réponse immunitaire adaptative. Elle met en jeu l'interaction entre les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), en particulier les cellules dendritiques activées matures, qui présentent les antigènes sous forme de fragments peptiques présentés par les molécules HLA de classe II et expriment à leur membrane des molécules de co-stimulation telles que les molécules B7 (CD80 et CD86). Le LT CD4 naïf capable de reconnaître spécifiquement le complexe HLA-II/peptide reçoit alors un signal de co-stimulation activateur, notamment via le CD28 (ligand des molécules B7), entraînant son activation puis sa prolifération. Concomitamment, toujours sous le contrôle de la CPA professionnelle, le LT CD4 s'engage dans une voie de différenciation adaptée à l'agent infectieux. Cette différenciation repose sur l'expression et la répression de différents facteurs de transcription et oriente vers des stades effecteurs ou régulateurs de la réponse immunitaire. On distingue ainsi d'une part les LT CD4 effecteurs Th1 (T-Bet), Th2 (GATA3), Th17(ROR γ δ), et d'autre part les lymphocytes régulateurs (Treg) induits.

Au cours de la phase initiale de l'infection à CMV, des LT CD4 de type Th1 prolifèrent. Ils produisent de l'IFN- γ et du TNF- α en grandes quantités, mais seulement de faibles quantités d'IL-2 (171). Ces LT CD4 anti-CMV observés à la phase précoce de l'infection ont deux particularités qui les distinguent des LT CD4 activés dans d'autres infections virales (171).

Tout d'abord, ils ont une faible capacité de prolifération car ils produisent peu d'IL-2. D'ailleurs, l'ajout d'IL-2 exogène restaure les niveaux de prolifération observés avec des LT CD4 spécifiques d'autres virus. Cette faible capacité de synthèse d'IL-2 est caractéristique des LT CD4 CD28^{neg}, mais également des LT CD4 exprimant le CD28. La seconde particularité des LT CD4 anti-CMV est qu'ils sont particulièrement sensibles à l'apoptose, initiée par la liaison de Fas avec son ligand et favorisée par une faible expression du facteur anti-apoptotique bcl-2. Ces deux propriétés (faible prolifération et haut niveau d'apoptose) ne les distinguent pas seulement des LT DC4 spécifiques d'autres virus mais également des LT CD4 mémoire anti-CMV qui, en plus de produire de plus grandes quantités de cytokines inflammatoires, sont souvent décrits comme des cellules à fortes capacités de prolifération. Le terme d'épuisement a d'ailleurs été employé pour les LT CD4 anti-CMV activés lors de la phase précoce de l'infection, surtout pour les LT CD4 CD28^{pos} qui ont la particularité d'exprimer fortement le récepteur inhibiteur PD-1 (171).

Après la résolution de la virémie, des LT CD4 mémoires se différencient et persistent. Il est ainsi connu depuis longtemps que le nombre de lymphocytes mémoire circulants spécifiques du CMV est important, surtout ceux capables de produire de l'IFN- γ (172). Le CMV est ainsi responsable d'une augmentation importante de la proportion des LT CD4 CD27^{neg} CD28^{neg}, déjà constatée chez les sujets âgés de moins de 40 ans, mais encore plus nette chez les sujets de plus de 60 ans (173). Alors que le répertoire des LT CD4 initialement activé est très large, celui des LT CD4 mémoire est restreint, témoin de la contraction clonale. Contrairement à ce qui pourrait être attendu, les LT CD4 mémoire n'ont pas de TCR communs avec les LT CD4 initialement activés (ou tout du moins s'ils sont activés précocement, ils ne constituent qu'une très faible minorité des LT CD4 initiaux) et présentent finalement un répertoire assez spécifique (174).

Une sous-population lymphocytaire CD4 avec un phénotype effecteur mémoire ($CD27^{neg}$ $CD28^{neg}$ $CD45RO^{pos}$ $CD45RA^{neg}$ $CCR7^{neg}$) est caractérisée après résolution de la première virémie chez le patient transplanté rénal D+R- (173,175). Si leur nombre augmente considérablement dans les suites de la virémie chez ces patients, ils peuvent également émerger chez des patients non virémiques et être utilisées comme un témoin de la primo-infection, plus sensible que la séroconversion (61). La perte successive des protéines membranaires CD27 et CD28 est causée par l'IFN- α produit majoritairement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes circulantes, elles-mêmes activées par le CMV (176). Cette sous-population peut représenter une proportion importante du contingent de LT CD4 périphérique car ils persistent au long cours, ce qui explique que leur nombre dans le sang périphérique est plus important chez les sujets sains séropositifs que séronégatifs (61,173), même si la variabilité interindividuelle est extrêmement importante. Pour exemple, Libri *et al.* ont rapporté chez 40 sujets de plus de 60 ans séropositifs un ratio ($CD4^{pos}$ $CD27^{neg}$ $CD45RA^{neg}$)/ $CD4^{pos}$ à 16%, mais avec des valeurs atteignant fréquemment plus de 30% et parfois plus de 50% (173). Certains auteurs parlent d'ailleurs d'envahissement du compartiment CD4 mémoire par les LT CD4 anti-CMV chez certains sujets, puisque le nombre de lymphocytes mémoire dirigés contre d'autres virus est diminué chez les patients séropositifs pour le CMV, ce qui pourrait participer à l'altération des défenses immunitaires chez les sujets âgés (176). Cependant, contrairement à ce qui est observé pour les LT CD8, le nombre de LT CD4 total n'est pas influencé par l'infection à CMV (61,175,176).

Sur le plan fonctionnel, les LT CD4 mémoire sont considérés comme très inflammatoires en raison de leurs fortes capacités cytotoxiques et de sécrétion de cytokines proinflammatoires. Elles contiennent en effet des granules cytotoxiques de perforine et granzyme B (GrzB) qui leur confèrent des capacités de cytotoxicité immédiate (174). De plus, elles sont capables de produire de plus grandes quantités d'IFN- γ que des LT CD4 $CD28^{pos}$ en réponse à une

stimulation par un peptide issu de pp65 (174). Pour être encore plus précis dans l'analyse de la fonctionnalité de ces cellules, certaines équipes ont analysé de façon simultanée l'expression de CD40L et la production des cytokines IFN- γ , IL-2 et TNF- α comme marqueur des capacités effectrices des LT CD4 (173). Il s'est avéré que les LT CD4 CD27^{neg}, indépendamment de l'expression de CD45RA, avaient le même profil fonctionnel au regard de ces 4 "fonctions" avec environ 55% de cellules ayant au moins deux fonctions et 20% au moins 3, ce qui les distinguait clairement des lymphocytes T CD4 naïfs et des LT CD4 CD27^{pos} CD45RA^{neg}. Cette information est à prendre en compte car la réexpression de CD45RA par le LTCD4 mémoire est considérée habituellement comme un marqueur de différenciation terminale, ce qui ne semble pas correspondre à un degré de compétence différent, tout du moins lors d'une stimulation polyclonale forte avec un anticorps anti-CD3. De façon importante, il semble que ces cellules mémoires CD27^{neg} CD45RA^{pos} sont assez caractéristiques de l'infection à CMV, tout du moins elles ne répondent pas à une stimulation par des antigènes tétaniques ou du VZV (175).

Finalement, le développement de ces LT CD4 inflammatoires au cours de l'infection par le CMV pourrait expliquer que la séropositivité au CMV soit rapportée dans plusieurs études comme un facteur de progression de la polyarthrite rhumatoïde (177,178), alors que ces cellules sont présentes au sein des tissus synoviaux des malades. Des observations comparables sur le rôle délétère de ces cellules ont d'ailleurs aussi été rapportées dans d'autres maladies inflammatoires telle que la maladie de Crohn, la sclérose en plaque et la maladie de Wegener (179,180,181,182). Une étude longitudinale réalisée chez 100 patients transplantés rénaux (suivi médian=54 mois) a étudié spécifiquement le rôle des LT CD4 mémoires CD27^{neg} CD28^{neg} (183). Il a été observé une augmentation de la fraction des LT CD4 CD27^{neg} CD28^{neg} parmi les LT CD4 chez les patients séropositifs, aussi bien chez ceux ayant reçu un rein d'un donneur infecté que non infecté. Ainsi les LT CD4 CD28^{neg}

représentaient un an après la transplantation 2,7% et 3,8% de l'ensemble des LT CD4 chez les patients D-R+ et D+R+, avec des valeurs maximales atteignant 56 et 37% dans ces deux groupes. En analyse multivariée, les deux paramètres associés avec l'augmentation de la fraction LT CD4 CD28^{neg}/LTCD4 étaient le temps après la transplantation et la séropositivité du receveur, alors que ni la séropositivité du donneur, ni la survenue d'une virémie, ni le diagnostic d'un rejet n'influençaient cette fraction. En revanche, elle était corrélée à la valeur plasmatique de la CRP ultra sensible, sans que l'on puisse distinguer une relation de cause (actions proinflammatoires de ces cellules) ou d'effet (inflammation favorisant la réactivation du CMV et l'expansion de ces cellules), même si cette seconde hypothèse est privilégiée par les auteurs. Les LT CD4 CD28^{neg} des patients séropositifs avaient pour plus de 3/4 d'entre eux un phénotype effecteur mémoire ou EMRA un an après la transplantation, et proliféraient en présence de PBMC présentant des peptides CMV. Ils se distinguaient des LT CD4 CD28^{pos} par une expression plus importante de CD57 (marqueur de différenciation), de NKG2D et de perforine, mais également de récepteurs impliqués dans le homing vers les tissus inflammatoires (le CXCR1 récepteur de la fractalkine, le LFA-1 et le VLA-4). Au contraire, l'expression de CD62L, FAS et PD-1 (dont l'expression est augmentée à la phase initiale de l'infection (171)) ne distinguait pas LT CD4 CD28^{pos} des LT CD4 CD28^{neg} et concernait moins de 15% des LT CD4. Finalement, les auteurs ont essayé d'évaluer l'impact des LT CD4 CD28^{neg} sur le greffon rénal. Ils ont ainsi rapportés un déclin plus important de la fonction rénale chez les 95 patients vivant avec un greffon fonctionnel après ajustement sur le rejet et l'âge du donneur. De plus, les auteurs ont montré, une augmentation des concentrations de fractalkine et de facteur de von Willebrand dans les surnageants de cellules endothéliales glomérulaires immortalisées co-cultivées avec des LT CD4 CD28^{neg} CD27^{neg} issus de patients transplantés séropositifs, alors qu'augmentait l'activité caspase-3 impliquée dans l'apoptose des cellules endothéliales. Ces résultats n'étaient pas retrouvés lorsque la co-culture impliquait

des LT CD4 CD28^{pos} CD27^{neg}. Ces effets *in vitro* étaient inhibés par l'ajout d'un antagoniste de NKG2D.

Il faut cependant pondérer la notion de cellules très inflammatoires et noter que 45% des LT CD4 CD27^{neg} CD45RA^{neg} et 36% des LT CD4 CD27^{neg} CD45RA^{pos} ne produisaient aucune des 3 cytokines étudiées dans les travaux de Libri *et al.* (173). Il a par ailleurs été montré que la production d'IFN- γ et d'IL-2 en réponse à une stimulation par du lysat de CMV était inférieure chez les sujets "âgés" en comparaison au sujets "jeunes", et ce de façon plus importante pour l'IL-2 ce qui entraînait une diminution du ratio IL-2/IFN- γ avec l'âge (184). Le caractère fonctionnel des LT CD4 mémoire ne peut donc occulter une possible dysfonction d'une partie du répertoire anti-CMV, d'autant plus si l'infection est très ancienne. Il se pourrait en plus que ces cellules, au moins pour certaines d'entre elles, perdent progressivement leurs capacités de prolifération du fait d'un raccourcissement de leur télomère (immunosénescence), alors même que cela ne semble pas être le cas des LT CD4 mémoires spécifiques d'autres pathogènes tels que le VZV, l'EBV, HSV et la tuberculine (176).

Une seconde sous-population de LT CD4 mémoire anti-CMV a été décrite. Elle a la particularité d'exprimer KIR, un marqueur habituellement attribués aux lymphocytes NK, (185). Ainsi la proportion de LT CD4 KIR^{pos} répondeur à une stimulation pp65 est plus importante que celle des LT CD4 KIR^{neg}, même si cette dichotomie concernant l'expression de KIR apparaît moins nette que celle concernant CD28. Il semble que ces cellules ne se distinguent pas par leur capacité fonctionnelle comme la synthèse d'IFN- γ . Finalement, KIR aurait un rôle dans le contrôle de la prolifération des LT, mais ce résultat obtenu à partir d'un clone développé *in vitro* exprimant KIR2DL3, un ligand de HLA-Cw*07/*12, reste à confirmer. Le rôle et l'importance *in vivo* de ces LT CD4 KIR^{pos} ne sont pas formellement établis à ce jour.

Enfin, des LT CD4 régulateurs CD25^{pos} CD39^{pos} CD134^{pos} exprimant le facteur de transcription FoxP3 augmentent en nombre après stimulation par des PBMC présentant des peptides immunodominants du CMV ou préalablement exposées à un lysat du virus, notamment chez le sujet de plus de 60 ans (186). Cette prolifération est plus importante chez la femme que chez l'homme et est corrélée au niveau de réponse des LT CD8 anti-CMV. Leur rôle reste discuté.

2. Les lymphocytes T CD8

a) Les différents types de lymphocytes T CD8 anti-CMV

Les LT CD8 sont communément appelés lymphocytes cytotoxiques car ils sont doués de propriétés cytotoxiques qui en font des éléments essentiels de l'immunité adaptative, en particulier contre le CMV. Les LT CD8 naïfs spécifiques du CMV sont activés par les cellules dendritiques dans les organes lymphoïdes secondaires, principalement dans les ganglions lymphatiques. La prolifération de ces lymphocytes effecteur (LT_{EFF}) nécessite la présence de lymphocytes T CD4 spécifiques du CMV qui coopèrent avec les cellules dendritiques pour faire émerger une réponse CD8 efficace. Les premiers lymphocytes activés se distinguent des lymphocytes CD8 naïfs par la perte de l'expression membranaire de CD45RA et l'acquisition de CD45RO. Après la première phase de l'infection et la mort par apoptose d'une majorité des clones lymphocytaires, des LT CD8 mémoire vont persister. On distingue les LT CD8 mémoire centraux (LT_{CM}) qui expriment fortement CCR7 et CD62L ce qui leur confère la possibilité de circuler dans les organes lymphoïdes secondaires (homing), et les lymphocytes effecteurs mémoires (LT_{EM}) CCR7^{neg} CD62L^{neg}, destinés à contrôler la propagation virale dès les premiers stades de la réactivation. Les lymphocytes effecteurs mémoire sont capables de produire de grandes quantités d'IFN- γ , de TNF- α mais peu d'IL-4. Ils sont doués de fortes capacités cytotoxiques, en particulier avec la sécrétion de perforine et de granzyme (187,188). Parmi les LT_{EM}, on distingue les "classiques" LT_{EM} CD45RA^{neg} et les LT_{EM} CD45RA^{pos}. Ces

derniers sont communément appelés EMRA, ce qui est considéré comme un stade de différenciation terminale (187). Cependant les LT_{EMRA} sont d'excellents effecteurs, en particulier très riches en perforine (188). Il faut souligner une particularité concernant la circulation des LT_{EM} spécifiques du CMV. Comme tous les autres LT_{EM} , ils peuvent infiltrer les tissus périphériques dans des situations inflammatoires. Cependant certains organes, dont les reins et les poumons, peuvent recruter des LT_{EM} en conditions physiologiques, et d'autres ne permettent pas leur recrutement (189). Enfin on distingue une dernière famille de LT CD8 anti-CMV qui résident dans les tissus (T_{RM} pour tissue-resident memory T cell) et participent à l'immuno-surveillance du CMV chez les sujets infectés de façon latentes (190). Ces T_{RM} , exprimant des TCR de haute affinité et dont il est fait l'hypothèse qu'ils proviennent de T_{EM} différenciés au sein des tissus ou directement de T_{EFF} , sont particulièrement présents dans les muqueuses et dans les glandes salivaires où ils contrôlent la réactivation et la réplication virale (189,191). Il s'avère qu'ils sont également présents dans de très nombreux tissus comme les poumons, le foie et les reins. Les T_{RM} expriment fortement CD69 et CD103 (intégrine $\alpha E\beta 7$), qui est le ligand de la cadhérine-E exprimée par les cellules épithéliales. Les facteurs de transcription clé des LT_{RM} sont Hobit et Blimp1 (192). Leur survie et leur auto-renouvellement dépendent de signaux de leur environnement et non de stimulations antigéniques répétées, ce qui les distinguent des autres types de LT mémoires. En revanche, du fait même de leur localisation, ils sont beaucoup moins bien étudiés chez l'Homme.

b) Les lymphocytes T CD8 circulants

Les LT CD8 anti-CMV peuvent être quantifiés par la technique des tétramères présentant des peptides viraux. Il s'agit de structures complexes qui associent 4 molécules HLA de classe I ou II (selon qu'on s'intéresse aux LT CD8 ou aux LT CD4) porteuses d'un peptide d'intérêt à une molécule de streptavidine, elle-même marquée à un fluorochrome. Pour gagner en sensibilité, des structures plus complexes ont été générées avec la fixation d'un plus grand

nombre de molécules HLA non plus à la streptavidine mais à des protéoglycanes, appelées pentamères, octomères ou dextramères en fonction du nombre de complexes HLA-peptide présents, comme illustré dans la figure suivante.

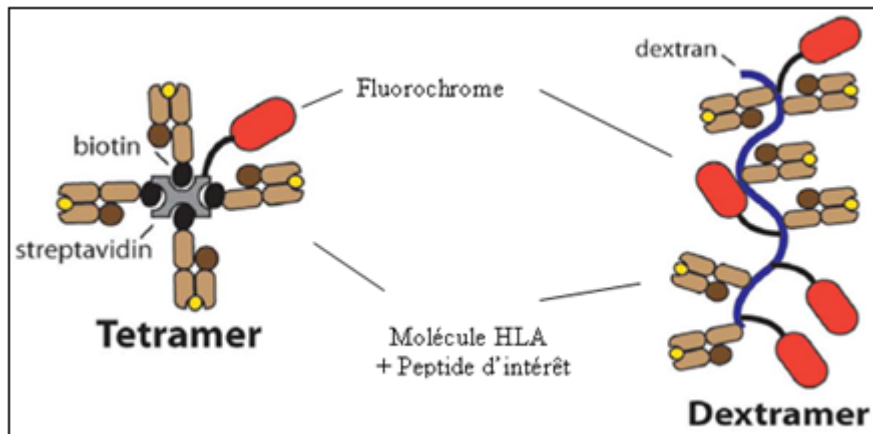


Figure 3: structure des tétramères et des dexamères HLA classe I utilisés pour étudier les LT CD8 spécifiques du CMV.

La figure suivante montre l'exemple d'un patient séropositif exprimant le HLA-A2, analysé au laboratoire avec des dexamères HLA-A2 pp65 qui fixent donc les LT CD8 anti-pp65 restreints au HLA-A2. Sur ce diagramme sont représentés les lymphocytes. Il peut être observé que les dexamères ne reconnaissent pas LT CD4. En revanche 4,9% des LT CD8 de ce patient sont spécifiques de pp65.

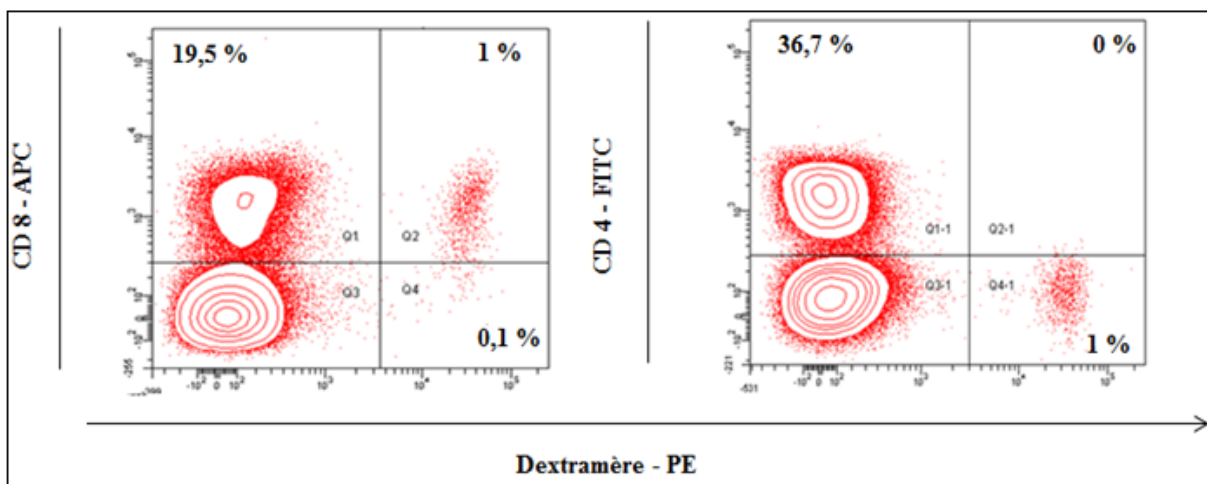


Figure 4: numération des LT CD8 anti-pp65 par la méthode des dexamères anti-pp65 (NLV)

La méthode des dextramères a permis de révéler que la réponse lymphocytaire CD8 anti-CMV est quantitativement très importante. Les différents phénotypes des LT CD8, et plus particulièrement anti-IE1 et anti-pp65 ont également été bien étudiés et présentent des particularités en comparaison à d'autres infections virales.

L'ampleur de la réponse anti-CMV sur la durée est tout à fait singulière. En effet, le nombre de lymphocytes T dirigés contre le CMV augmente tout au long de la vie chez le patient infecté (séropositif), et plus particulièrement les LT CD8 mémoire. Chez certains individus infectés de façon latente, la proportion des LT CD8 dirigés contre le CMV atteint fréquemment 5% des CD8 totaux, et parfois beaucoup plus (193,194,195). Dans une étude de population, le ratio LT CD8 anti-CMV/ LT CD8 total augmentait linéairement avec l'âge : environ 2% entre 20 à 40 ans, 3% chez des sujets âgés de 40 à 60 ans et finalement 4 à 5 % chez les sujets de plus de 60 ans (196). De façon similaire, Khan et *al.* ont montré que la proportion de LT CD8 spécifiques de pp65 était plus élevée chez les sujets âgés de plus de 60 ans en comparaison à des sujets adultes de moins de 55 ans (197). Une observation comparable a été faite par une équipe londonienne qui a rapporté que des sujets sains âgés de plus de 65 ans avaient significativement plus de LT CD8 anti-CMV que des sujets séropositifs de moins de 40 ans (195). Ces observations plaident pour une accumulation dans le temps de LT CD8 anti-CMV chez les individus seropositifs (194). Cette amplification du nombre de LT mémoire peut aboutir à une domination du répertoire de l'individu par la réponse anti-CMV, ce qui pourrait altérer les capacités de réponse contre d'autres virus chez le sujet âgé. Elle explique également que les LT CD8 sont responsables de près de 2/3 de la synthèse d'IFN- γ en réponse à pp65 et IE-1 chez les patients transplantés, ce qui signifie que les réponses lymphocytaires anti-CMV observées en ELISPOT traduisent principalement la fonction des LT CD8 anti-CMV (198).

En utilisant des dextramères, l'équipe d'Oxford (193) a également montré que le nombre de LT CD8 dirigé contre un peptide immunodominant issu de la protéine matricielle pp65 était plus important chez les sujets HLA-B7 que HLA-A2, en accord avec les résultats de Birmingham (194), et semblait peu varier chez les quatre donneurs ayant été étudiés longitudinalement. Les proportions des différents phénotypes lymphocytaires, CD45RA et/ou RO, sont également très variables en fonction des individus en ce qui concerne l'expression de molécules membranaires considérées comme des marqueurs d'activation (CD11b : 8 à 84%, CD57 : 16 à 93%, CD38 : 0 à 69%). Cela est également vrai pour les expressions des molécules CD28 et CD27, qui sont corrélées entre elles.

Une stimulation peptidique (par le même peptide que celui présenté par les molécules HLA des tétramères) induit la production de CD69, INF- γ , TNF- α et MIP-1b dans plus de 80% des LT CD8 anti-CMV. Une autre protéine capable de générer une réponse lymphocytaire CD8 puissante est la protéine IE-1 (UL183) de 72 kDa. Ainsi, parmi les peptides de 9 AA pouvant être présentés *in silico* par la molécule HLA-A02:01, seul le peptide VLEETSVLM (AA: 316-324) est capable d'induire une production d'IFN- γ par les PBMC de patients infectés après une incubation de 16 heures (197). Une telle réponse était observée chez 6 donneurs sains parmi les 18 étudiés, alors que 13 répondaient à une stimulation par le peptide immunodominant NLV (pour NLVPMVATV). Chez ces donneurs, comme pour les LT CD8 anti-pp65, la fréquence de LT CD8 anti-VLE (VLE pour VLEETSVLM) variait de 0,1 à 4,5% des LT CD8 totaux, soit 2 à 10 fois plus que celles des cellules productrices d'IFN- γ *in vitro*. Le phénotype de ces LT CD8 anti-IE-1 ne se distinguait pas de celui des lymphocytes anti-pp65 avec plus de 75% de cellules CD57^{pos} CD28^{neg} contenant de la perforine. Confirmant les résultats précédemment obtenus sur les LT CD8 anti-pp65 (193), le pourcentage de donneurs exprimant CD27 et les isoformes de CD45 était très variable, avec des cellules doubles positives pour CD45RA et CD45RO. Il doit être noté que les LT CD8 anti-pp65, dans une

autre partie de la même étude focalisée sur la réponse anti-pp65 (194), exprimaient fortement Bcl-2 et très peu Ki-67, ce qui est en faveur d'une résistance à l'apoptose avec un faible niveau de prolifération.

3. Contrôle de la réponse adaptative et échappement immunitaire du virus

Une étude publiée en 2002 dans le journal Blood a pour la première fois étudié la relation entre le nombre de LT CD8 spécifiques du CMV et leur fonctionnalité chez des patients recevant une greffe de moelle osseuse après un conditionnement myéloablatif ou non (199). Dans cette étude le nombre total de LT CD8 anti-CMV était déterminé en utilisant des tétramères anti-pp65 (peptide NLV pour les patients HLA A2 et TPRVTGGGAM pour les patients HLA B7), et leur fonctionnalité par la production de TNF- α en réponse à une stimulation par le peptide d'intérêt. Cette étude a montré pour la première fois que la détection d'une Ag-pp65 $> 1/10^5$ leucocytes était associée à une augmentation du nombre de LT CD4 et CD8 anti-CMV circulants - qui d'ailleurs étaient corrélés entre eux - mais qu'il n'existait pas de corrélation entre le nombre total de CD8 anti-CMV circulants et le pourcentage de lymphocyte CD8 anti-CMV producteurs de TNF- α . De plus, les patients avec une virémie, que cette dernière survienne au cours des 3 premiers mois suivant la transplantation ou plus tardivement, se distinguaient par leur pourcentage de LT CD8 anti-CMV producteurs de TNF- α et non par leur nombre total de lymphocytes anti-CMV (virémie précoce: 25%, virémie tardive: 28%, absence de virémie: 65%). Cette étude suggère donc une possible dysfonction de certains LT anti-CMV.

a) Concept d'épuisement clonal

La mémoire immunologique repose sur des cellules qui persistent à distance de l'infection. Elle est une propriété fondamentale de notre système immunitaire et permet, en cas de nouveau contact avec le pathogène, de mettre en place une réponse plus rapide (forte capacité

de prolifération) et plus puissante (plus fortes capacités cytotoxiques et de production de cytokines) permettant finalement un meilleur contrôle de l'infection. Cependant, pour les infections virales chroniques la situation est différente. En effet, au cours de la dernière décennie, plusieurs études réalisées aussi bien chez la souris que chez l'Homme ont mis en évidence que les lymphocytes mémoire spécifiques du virus de l'hépatite C, et du VIH pouvaient présenter un état de dysfonction et une plus grande sensibilité à l'apoptose. Cet état est appelé épuisement car il est considéré comme la conséquence de stimulations antigéniques répétées et permanentes liées à la persistance de l'antigène qui n'est pas éliminé après l'infection initiale. C'est d'ailleurs la combinaison de la persistance de l'antigène (qui se traduit par une stimulation prolongée du TCR) et de l'intensité de la co-stimulation par CD28 qui induit l'épuisement des LT CD8 dans un modèle de différenciation *in vitro* où l'épuisement est caractérisé par la perte progressive de l'expression de l'IL7R et l'acquisition d'une expression forte et prolongée de PD-1 (200).

L'épuisement est défini par la perte progressive et hiérarchisée du potentiel prolifératif, des capacités de sécrétion de l'IL-2, du TNF- α et tardivement de l'IFN- γ , mais également par une diminution des capacités cytotoxiques. Cet épuisement progressif se traduit par des modifications du phénotype membranaire des LT CD8 qui expriment des récepteurs inhibiteurs comme PD-1, TIM-3, LAG-3, 2B4, CD160 et KLRG-1. La course de l'épuisement a été schématisée par Wherry, comme reproduit ci-après (201).

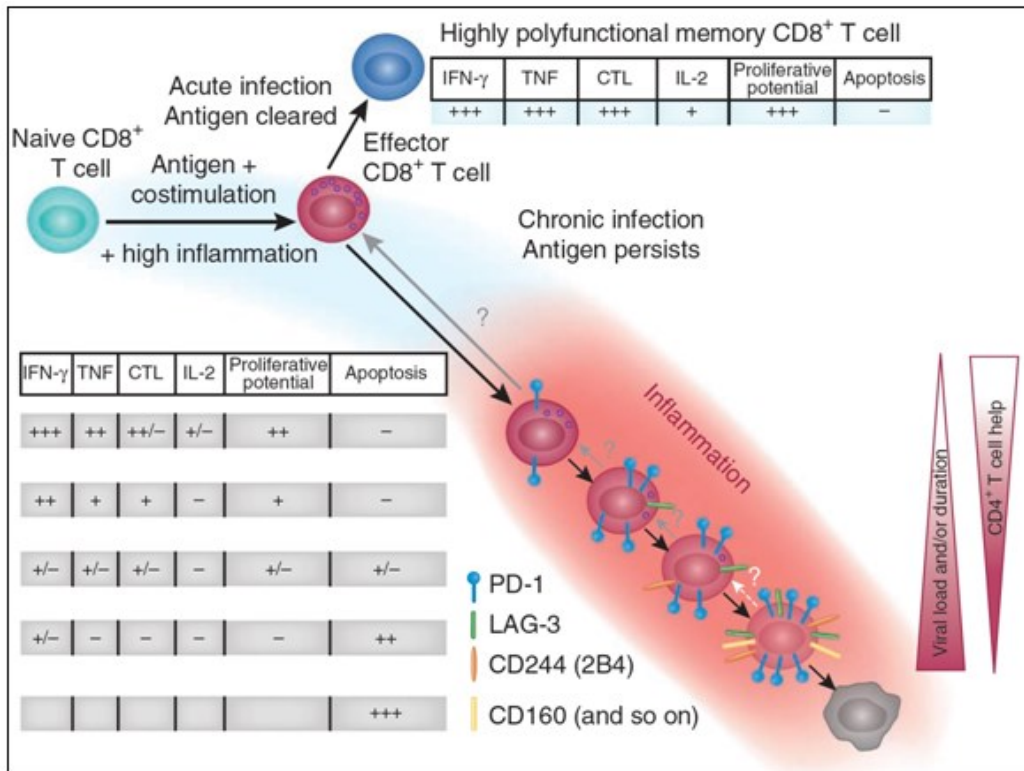


Figure 5: schématisation des modifications progressives et hiérarchisées caractérisant l'épuisement clonal (201).

PD-1, également appelé CD279, est une molécule de la famille CD28 exprimé sur un large panel de cellules immunitaires dont les lymphocytes, les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages (202). Concernant les lymphocytes, il est exprimé à la membrane après engagement du TCR sur les lymphocytes activés - il n'est pas présent sur les lymphocytes naïfs -, et persiste à un fort niveau sur les lymphocytes épuisés. Ses ligands sont PDL1, exprimé par les cellules immunitaires et des cellules non hématopoïétiques, et PDL2 dont l'expression est plus restreinte (monocytes, macrophages et cellules dendritiques). L'engagement par un de ses deux ligands régule de nombreuses voies de signalisation aboutissant à une diminution de la prolifération et de la survie cellulaire. Les effets cellulaires de la liaison de PD-1 avec PDL1 ou PDL2 ont été récemment synthétisé Chinai et al, comme montré dans la figure suivante (203).

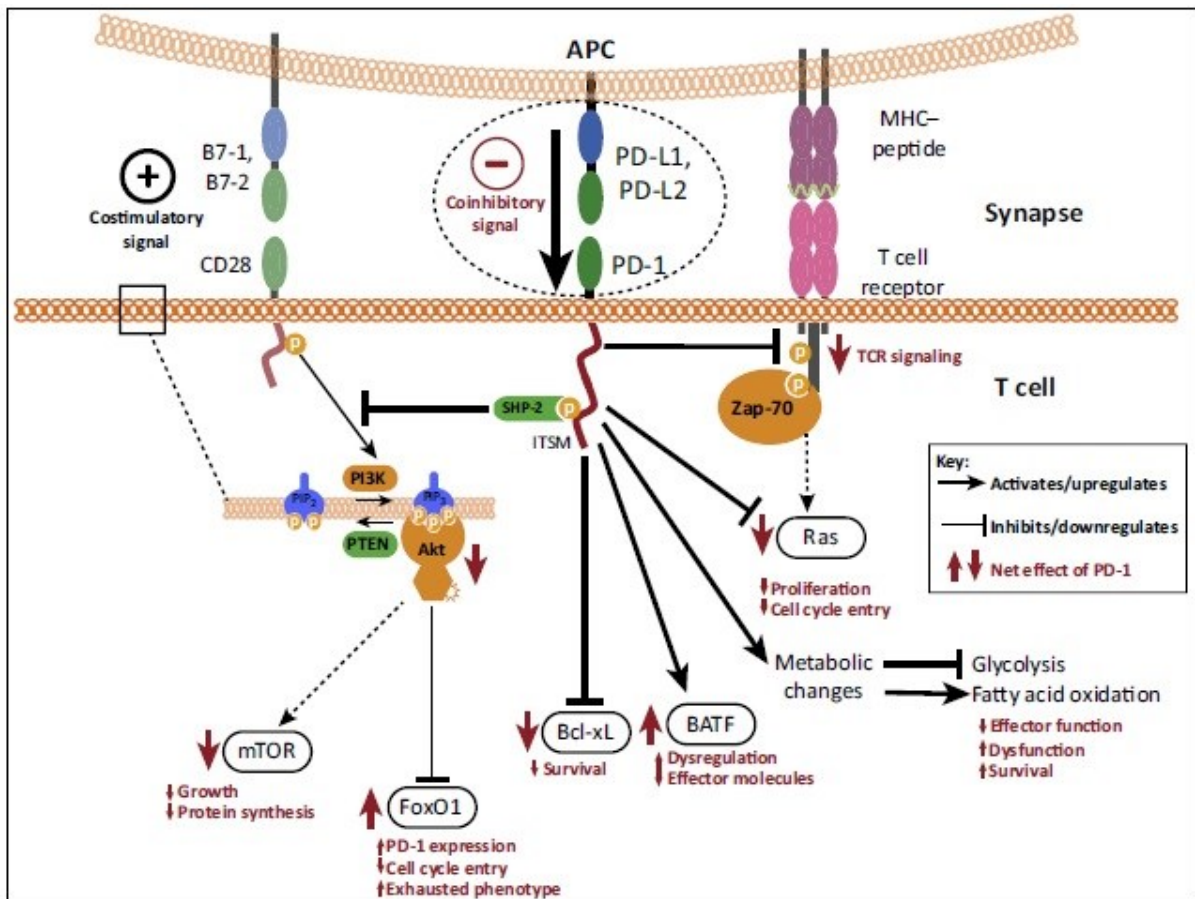


Figure 6: voies de signalisation du récepteur PD-1 (programmed cell death 1)

Trois grands modes d'action peuvent être distingués. Premièrement, la liaison de PD-1 à PDL1 entraîne le rapprochement de PD-1 du TCR, ce qui permet le recrutement de la phosphatase SHP2 (pour Serc homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2) qui déphosphoryle le récepteur T et inhibe l'activation du lymphocyte T (204), inhibe le recrutement de ZAP70 et limite ainsi l'activation Ras. Combiné à l'inhibition de Bcl-xL, l'engagement de PD-1 inhibe la prolifération et la survie cellulaire. Deuxièmement, la phosphorylation de PD-1 réprime les voies Pi3 kinase et Akt, qui sont les voies de signalisation de la co-stimulation, ce qui entraîne une inhibition de la voie mTOR et une augmentation de la demi-vie du facteur de transcription FoxO1, ce dernier étant un inducteur de la synthèse de PD-1 (boucle d'amplification). Troisièmement, le facteur de transcription BATF (pour basic leucine transcription factor, ATF like) est surexprimé. Sa liaison aux

protéines CJUN, inhibe la formation d'AP1 qui, associé à NFAT, est un acteur majeur de l'activation des lymphocytes. L'impact de BATF dans l'établissement de l'épuisement dans l'infection à VIH a d'ailleurs été documenté (205). Dans ce travail, BATF était surexprimé dans des cellules Jurkat exposées à un agoniste spécifique de PD-1 et dans des LT CD8 infectés par le HIV. De plus, la surexpression de BATF, indépendamment de l'engagement de PD-1, réduisait la prolifération des lymphocytes T alors que l'inactivation de BATF réduisait la production d'IL-2 et augmentait celle d'IFN- γ . Il est à noter que la répression du signal d'activation lymphocytaire dépendant du TCR et l'engagement de BATF sont indépendants de la co-stimulation alors que les lymphocytes mémoire, notamment dans l'infection à CMV, n'expriment pas la molécule CD28.

Il faut enfin insister sur une étude qui a mis en évidence que l'intensité de l'épuisement clonal pourrait prédominer dans certains tissus en comparaison à celle des LT CD8 circulants (206). En effet, il a été montré dans un modèle murin d'infection chronique par le LCMV (clone 13) que les LT CD8 spécifiques PD-1^{hi} prédominaient dans certains tissus comme la moelle osseuse, le foie, le cerveau et les reins, et étaient moins cytotoxiques dans les tissus périphériques (foie) que dans la moelle osseuse.

b) L'épuisement/la dysfonction lymphocytaire existe t il pour le CMV?

Il est actuellement plutôt considéré que l'épuisement est un processus spécifiquement développé dans les infections chroniques et non dans les infections latentes avec réactivations ponctuelles comme le CMV (207,208). L'explication avancée est que la stimulation antigénique ne serait pas suffisamment permanente. Certaines études ont cependant identifié une surexpression de certains récepteurs inhibiteurs à la surface des LT CD8 spécifique du CMV en comparaison des LT CD8 anti-influenzae tels que 2B4 (CD244) et CD160 (209,210). L'expression de PD-1 sur les LT CD8 spécifique du CMV semble quant à elle

surtout concernent les LT_{EFF} et est associée à une dysfonction réversible que certains ont nommé épuisement mais qui le plus souvent est considérée comme une régulation à la phase initiale de l'infection favorisant la contraction clonale (171,211,212).

Cependant des études se sont intéressées à un possible dysfonctionnement des LT_{CD8} spécifiques du CMV, voir à un épuisement dans deux situations particulières. La première est celle des sujets âgés, potentiellement infectés depuis de très nombreuses années, chez qui l'accumulation des LT_{CD8} circulants pourraient constituer un facteur de "vieillesse" du système immunitaire et a été intégré dans des scores de risque de décès (213). La seconde est celle des patients ayant reçu une transplantation d'organe solide ou de cellules hématopoïétiques, chez qui l'infection par le CMV est parfois persistante (ce qui la rapprocherait d'une infection chronique) et responsable d'une morbidité accrue.

Chez le sujet âgé, on peut tout d'abord citer une étude réalisée sur les LT_{CD8} anti-CMV du sujet sain âgé de plus de 90 ans en les comparant à des sujets âgés en moyenne de 52 ans (214). Les sujets âgés, chez qui le nombre de LT_{CD8} était plus élevé en cas de séropositivité, avaient un plus grand nombre de LT_{CD8} anti-CMV que les sujets plus jeunes. Environ 60% des LT_{CD8} anti-pp65 avaient un phénotype de surface de type T_{EMRA} ($CD45RA^{pos}$ $CCCR7^{neg}$) avec toujours une très grande variabilité interindividuelle. Ce pourcentage était stable sur deux prélèvements réalisés à deux ans d'intervalle. De façon importante, de nombreux LT_{CD8} anti-pp65 n'étaient pas capables de synthétiser d'IFN- γ en réponse à une stimulation par le peptide NLV. En effet, le rapport entre le nombre de cellules productrices d'IFN- γ en présence du peptide NLV (mesuré en ELISPOT) et le nombre de LT_{CD8} anti-NLV déterminé en cytométrie était plus faible chez les sujets âgés (17%) que chez les sujets contrôles (42%), suggérant un possible dysfonctionnement (épuisement?) de certains LT_{CD8} . La réponse globale pourrait cependant rester normale puisque le nombre de LT_{CD8} était plus élevé chez les sujets âgés. Une autre étude plaide pour une dysfonction des LT

CD8 mémoire chez les sujets âgés a récemment été publiée par l'équipe de Londres dans *Journal of Immunology*. Cette équipe s'est intéressée à l'avidité du TCR des LT CD8 anti-CMV ayant un phénotype effecteur mémoire ou de différenciation terminale (215). Elle a généré des tétramères porteurs du peptide NLV ou TPR dont le domaine $\alpha 3$ modifié n'est pas capable d'interagir avec la molécule CD8. Par conséquent, seuls les LT CD8 avec une forte avidité pour le complexe HLA-I/peptide peuvent se lier aux tétramères. Chez les sujets âgés HLA-A2 entre 65 et 95 ans, les auteurs observaient une diminution du nombre de LT_{EMRA} CD8 anti-CMV à forte avidité en comparaison aux sujets jeunes.

Chez les patients transplantés, l'existence d'un dysfonctionnement des LT CD8 et encore plus l'établissement de mécanismes d'épuisement clonal n'a pas été avéré. Les études visant à surveiller les différents paramètres de la réponse immunitaire spécifique du CMV (précédemment détaillées) ont mis en évidence une grande variabilité individuelle avec certains patients présentant une réponse profondément altérée et une susceptibilité accrue à développer une maladie à CMV. Cependant, l'établissement d'un épuisement causé par des réactivations répétées n'a pas été rapporté. On peut citer un cas de patient japonais ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétique qui présentait une virémie persistante depuis 1 an alors qu'il possédait un pourcentage conséquent de LT CD8 épuisé, c'est-à-dire ayant une très faible capacité de prolifération et une forte expression de PD-1(216).

c) Echappement à la réponse immunitaire adaptative.

Les virus CMV ont développés au cours de leur co-évolution avec leurs hôtes de nombreux mécanismes d'échappement aux effecteurs de la réponse immunitaire. Ils impliquent de nombreuses protéines virales et ainsi occupent une partie importante du génome. Pour exemple, la figure suivante symbolise les fonctions des différents gènes du HCMV (71). On peut y dénombrer une majorité de gènes dédiés à l'échappement viral.

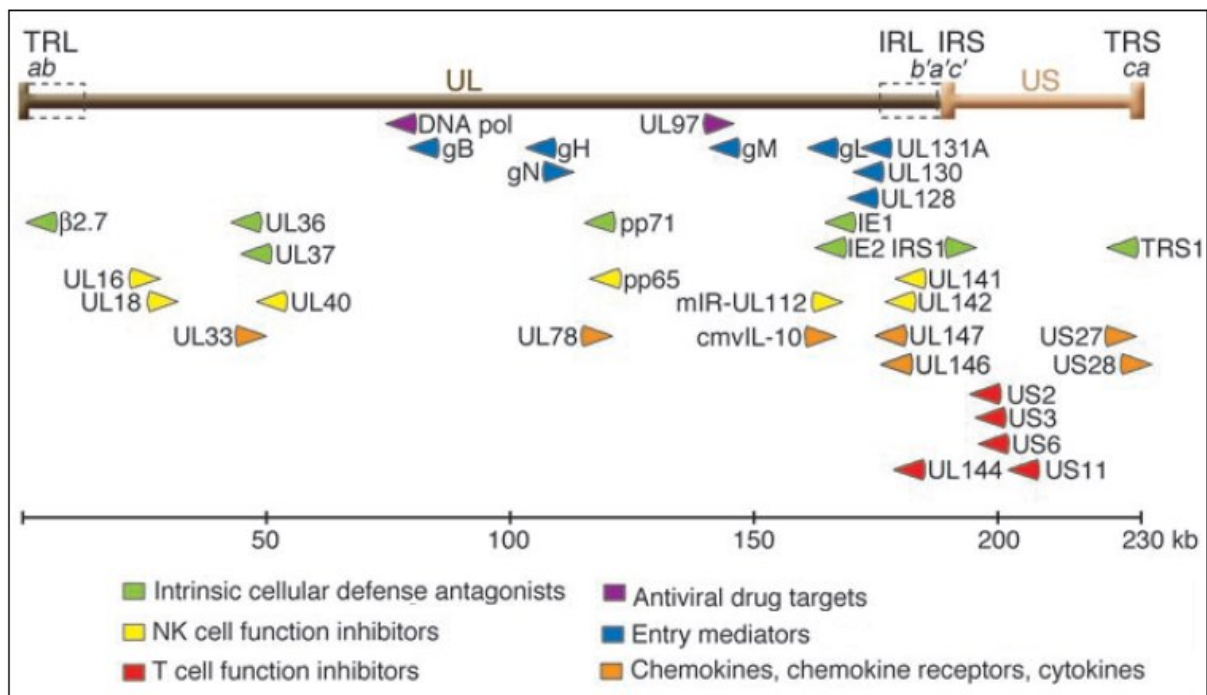


Figure 7: fonctions des différents gènes du HCMV, une majorité est dédiée à l'échappement immunitaire ■■■

Les mécanismes d'échappement mis en place par le HCMV, comme pour tous les sous-types de CMV, agissent à de très nombreux points clés de l'activation du système immunitaire, intéressant aussi bien l'immunité innée qu'adaptative. Le principal mécanisme d'échappement aux LT est la régulation négative des molécules HLA-I et HLA-II qui entraîne une diminution de la présentation antigénique aux LT CD8 et CD4. Les protéines US2 et US11 dégradent des molécules HLA-I nouvellement synthétisées. US6 inhibe le transfert des peptides dans le réticulum endoplasmique et S3 empêche la translocation des molécules HLA-I du réticulum endoplasmique. Ces mécanismes font écho aux travaux de cette thèse. En effet, nous avons spécifiquement étudié la réponse immunitaire spécifique anti-CMV ainsi que l'impact de l'infection du donneur sur la survie des greffons en fonction qu'il existe ou non des identités HLA-I communes au donneur et au receveur, un greffon infecté issu d'un donneur entièrement non apparié pouvant être considéré comme un organe non visible pour les LT spécifiques du CMV.

L'autre cible principale du HCMV est le lymphocyte NK. En effet, de nombreux mécanismes ont été décrits pour expliquer l'échappement du virus aux lymphocytes NK. Ils reposent tout d'abord sur l'utilisation des récepteurs inhibiteurs. En effet, le CMV module l'équilibre de l'interaction entre le HLA-E, une molécule HLA de classe I non classique, et les récepteurs inhibiteurs NKG2/CD94, qui sont des hétérodimères de la famille des lectines de type C, en particulier NKG2A/CD94. Ainsi, le HCMV produit la protéine UL40 qui stabilise HLA-E à la surface de la cellule hôte et inhibe l'activation des lymphocytes NK (217,218). Il a récemment été montré que la surexpression de HLA-E dépend du type cellulaire infecté. Dans un modèle d'infection par la souche VHL/E de cultures primaires de cellules endothéliales prélevées sur des aortes de donneurs d'organe, de fibroblastes et de cellules dendritiques myéloïdes dérivées de monocytes, le niveau d'expression de HLA-E était maintenu 48 heures après l'infection dans les cellules endothéliales et les fibroblastes et diminuait dans les cellules dendritiques (219). Une expansion de lymphocytes NK NKG2C^{pos} (et NKG2A^{neg} dans la grande majorité des cas), un récepteur activateur qui est également un ligand de HLA-E, est observée au cours de l'infection par le CMV. L'activation de cette sous-population est elle aussi inhibée par le HCMV, non plus par la surexpression de HLA-E, mais par la protéine UL18 qui se lie au récepteur inhibiteur ILT2 (LIR-1) avec une plus grande affinité que les molécules HLA de classe I qui sont des inhibiteurs naturels des lymphocytes NK (217). Le CMV inhibe également l'activation des lymphocytes NK en modulant l'activité des récepteurs activateurs tels que CD96, CD226, et des récepteurs inhibiteurs NKG2D, MICA et MICB (217).

4. L'immunité adaptative anti CMV après transplantation d'organe/ Rôle des traitements IS.

Le traitement immunosuppresseur initial, parfois appelé induction, peut comporter l'utilisation d'anticorps cytotoxiques dits déplétants, c'est-à-dire qu'ils vont entraîner la destruction des

lymphocytes circulants mais aussi dans les tissus. Aujourd'hui, seule la préparation d'anticorps de lapin anti-thymocytes appelée rATG (pour rabbit antithymocyte globulin), commercialisée sous le nom de Thymoglobulin®), est disponible en France. D'autres préparations d'anticorps d'origine animale ont été largement prescrites par le passé et sont encore parfois utilisées comme l'ATG Fresenius produite chez le lapin, ou des préparations d'origine équine comme la Lymphoglobulin®. Enfin l'alemtuzumab, un anticorps monoclonal recombinant humanisé dirigé contre le CD20 exprimé à la surface de nombreux types de cellules immunitaires, développé dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique, peut être utilisé comme traitement d'induction (220).

La reconstitution immunitaire, et plus particulièrement lymphocytaire T, est la période durant laquelle les LT vont réapparaître chez le receveur. Elle est basée sur la génération de nouveaux LT au sein du thymus (thymopoïèse) ou sur l'expansion périphérique homéostatique (221). Elle est évaluée dans le sang périphérique alors que la reconstitution au sein des organes lymphoïdes primaires et secondaires - au même titre que la déplétion initiale - ne peut pas être quantifiée chez l'Homme. Elle est estimée par une numération des LT CD3^{pos} ou de certaines sous-populations. La reconstitution des LT CD4 est la plus étudiée car elle est considérée comme un facteur de risque de survenue d'infection opportunistes. Au sein de notre équipe nous avons ainsi montré chez 589 patients transplantés entre 1986 et 2009 que la reconstitution des LT CD4 totaux était un phénomène lent avant une phase de plateau débutant environ 5 ans après la transplantation, alors que près de 50 % des patients avaient une lymphopénie sévère (LT CD4 < 200/mm³) un an après la transplantation, et presque 10% et 7% respectivement à 3 et 5 ans de la transplantation (222). Cette reconstitution n'était influencée ni par la sérologie CMV du receveur, ni par celle du donneur. Une étude américaine a étudié plus précisément la reconstitution des LT CD4 sur un plus faible effectif et a montré que la déplétion/reconstitution n'atteignait pas de façon homogène toutes les sous-

populations de LT CD4. Ainsi la rATG détruit efficacement les LT CD4 naïfs CD45RA^{pos} CD27^{pos} et les LT CD4 centraux mémoire CD45RO^{pos} CD31^{neg}, alors que les LT CD4 effecteurs mémoire CD45RA^{pos} CD27^{neg} résistent plus à la mort cellulaire (221).

La reconstitution des LT CD8 n'a pas le même profil que celle des LT CD4. Elle apparaît surtout beaucoup plus rapide puisque dès la fin de la deuxième semaine l'importance de la déplétion exprimée en pourcentage de la numération pré-transplantation apparaît beaucoup moins sévère que celle des LT CD4 (-85% pour les LT CD4 et -22% pour les LT CD8) (221). D'ailleurs, une large proportion des patients récupèrent un nombre de LT CD8 égal à celui d'avant la transplantation 6 mois après la transplantation (221). Dans cette étude, l'impact du CMV n'a pas été évalué alors qu'il est connu que le virus est un facteur déterminant dans la reconstitution lymphocytaire CD8 après greffe rénale.

La première étude s'étant intéressé au phénotype et à la fonctionnalité des lymphocytes chez le patient transplanté en comparaison aux sujets sains a été publié en 2001 (223). Dans ce travail il est montré que les patients transplantés, malgré la prise d'un traitement immunosuppresseur, ont plus de LT CD8 anti-CMV que les sujets sains. Les auteurs rapportent aussi que, comme chez les sujets sains, les LT CD8 sont CD27^{neg} CCR7^{neg} granzyme^{pos} et perforine^{pos}, mais avec une fraction importante de cellules réexprimant CD45RA. Les auteurs font l'hypothèse, sur la base de données alors non publiées chez le sujet âgé sain faisant état d'une expansion de lymphocytes mémoires CD45RA^{pos} (mais confirmées plus tard), que l'immunosuppression pourrait modifier l'équilibre entre le virus et l'hôte et faire ressembler le patient transplanté au sujet âgé.

Plusieurs travaux peuvent nous aider à comprendre l'impact de l'ATG sur la réponse immunitaire adaptative après transplantation. Une méta-analyse suivant la méthodologie Cochrane incluant 1647 patients inclus dans 13 études a montré que l'ATG, en comparaison aux antagonistes des récepteurs de l'IL-2, augmentait le risque de virémie/maladie à CMV de

32% chez les patients transplantés rénaux (224), confirmant les données d'une étude rétrospective espagnole multicentrique qui analysait le risque de survenue d'une maladie à CMV chez 1470 patients ayant reçu une transplantation rénale entre 2003 et 2005 (quelques patients avec une greffe combinée rein-pancréas). Dans cette dernière étude, l'utilisation de l'ATG apparaissait également comme un facteur de risque indépendant de maladie à CMV, en plus de l'âge du donneur, de l'utilisation de la ciclosporine et de la mauvaise fonction du greffon (225). L'impact de l'ATG sur la survenue de virémie tardive, c'est-à-dire survenant après l'arrêt d'une prophylaxie anti-CMV de 3 ou 6 mois après la transplantation, est plus discuté. En effet, dans une cohorte de 641 patients canadiens transplantés entre 2003 et 2010, l'ATG n'était pas un facteur de risque de virémie tardive, définie comme une Ag-pp65 > 5 noyaux/10⁶ leucocytes ou une charge virale > 3000 copies/mL. En effet, la virémie tardive, qui survenait chez 30%, 7,7% et 3.7% des patients D+R-, D+R+ et D-R+, de les facteurs identifiés de virémie tardive à CMV étaient favorisées seulement par le statut D+R- et l'altération de la fonction rénale (DFG<45ml/min) (226). En revanche, deux études plus récentes établissent un lien entre l'utilisation de l'ATG et le risque de virémie tardive (227,228). Dans la seconde, portant sur un plus faible effectif de transplantés rénaux D+R- visant à comparer les virémies/maladies précoces et tardives (survenant après 3 mois), l'utilisation de l'ATG était même le seul facteur de risque indépendant associé à la survenue d'une maladie à CMV tardive (228).

L'hypothèse admise pour relier le risque de virémie CMV et l'utilisation de l'ATG est que la durée et la profondeur de la déplétion lymphocytaire et/ou que la qualité de la reconstitution affecterait la réponse immunitaire anti-CMV. Cependant, des études récentes ont apportées des informations inattendues. Ainsi, une étude récente s'est intéressée à l'apparition des LT CD4 et CD8 anti CMV (stimulation par les peptides IE-1 et pp65) chez 95 receveurs D+R- de foies, cœurs ou reins (229). Cette étude a montré que le nombre de LT CD4 et CD8 anti-CMV

producteurs d'IFN- γ n'était pas différent entre les patients ayant reçu une induction par ATG 120 jours et 200 jours après la transplantation. Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux rapportés par Abate *et al.* en 2010 qui n'avaient pas mis en évidence d'influence de l'ATG sur le nombre de LT anti-CMV producteurs d'IFN- γ chez 70 transplantés rénaux R+ à 1, 2, 3, 6 et 12 mois après la transplantation (230). De plus, l'expansion des LT $\gamma\delta$ V δ 2neg chez les patients ayant fait une maladie à CMV tardive, par ailleurs associée au contrôle de l'infection, n'était pas affectée par l'utilisation de l'ATG (228). Finalement, bien que le CMV semble être le moteur de la reconstitution lymphocytaire CD8 (231), les mécanismes explicatifs du risque accru de virémie CMV chez des patients traités par ATG restent assez largement inexpliqués. Une seconde classe médicamenteuse immunosuppressive présente un intérêt particulier au regard du contrôle de l'infection CMV au décours de la transplantation. Il s'agit des inhibiteurs de mTOR. Les inhibiteurs de mTOR sont utilisés soit immédiatement après la transplantation, soit en relais des anticalcineurines, avec de bons résultats à court et long terme dans des populations sélectionnées (232,233). Si leur principal intérêt est aujourd'hui la réduction du risque carcinologique (234), des essais cliniques récents suggèrent que leur utilisation pourrait prévenir le risque de réplication virale (235,236), confirmant les données des premiers essais cliniques (237), et que l'association anticalcineurine - inhibiteurs de mTOR chez des patients D+R- pourrait éviter le recours à la prophylaxie anti-virale (238).

Deux mécanismes distincts ont été envisagés pour expliquer le fait que les inhibiteurs de mTOR limitent la réplication virale. Le premier réside dans le fait que le virus utilise le complexe mTORC1 au cours de son cycle de réplication et que la rapamycine inhibe la réplication virale dans les macrophages (239). Cependant cette inhibition n'a pas été confirmée dans des cultures *in vitro* de fibroblastes et cellules dendritiques, même si une inhibition faible pouvant limiter la production des protéines IE1 reste possible dans les premières heures (240–242). Bien que séduisante, il semble donc qu'un mécanisme indirect

prédomine dans l'effet bénéfique des inhibiteurs de mTOR sur la réplication du CMV. Ainsi une augmentation significative du nombre de LT CD8 anti-CMV producteurs d'IFN- γ a été constatée chez les patients transplantés traités avec l'évérolimus (243).

C. Monitoring de la réponse immunitaire anti-CMV en transplantation d'organe

1. Monitoring de la réponse immunitaire spécifique

La mesure de la réponse immunitaire spécifique anti-CMV chez le patient transplanté immunodéprimé a plusieurs objectifs. Avant la transplantation, chez le patient R+, elle pourrait permettre d'identifier les patients à haut risque de maladie à CMV qui bénéficieraient d'une prophylaxie. En miroir, cela constituerait un intérêt pour limiter le recours, chez des patients à plus faible risque, à un traitement préventif exposant à d'éventuels effets secondaires et au risque d'acquisition de résistances. Dans les premiers mois, au cours de la prophylaxie, elle pourrait être utilisée pour prédire le risque de maladie CMV tardive et déterminer individuellement la durée de la prophylaxie. Enfin, la surveillance de la réponse immunitaire anti-CMV pourrait présenter un intérêt pour guider la durée du traitement chez un patient ayant fait une maladie.

Plusieurs études pionnières ont établi que la réponse spécifique anti-CMV, aussi bien CD4 que CD8, était mesurable chez le patient immunodéprimé (même avec l'utilisation de traitements lymphopéniants), avec en outre des premiers résultats plaidant pour un lien entre le niveau de cette réponse et le risque de développer une maladie CMV. Ainsi, Zeevi *et al.* ont étudié dans les années 90 chez des patients transplantés pulmonaires la prolifération lymphocytaire en réponse à une stimulation par des protéines du CMV (244). Ils ont montré pour la première fois que le niveau de la réponse anti-CMV était plus altéré chez les patients qui développaient une maladie chronique à CMV. Par la suite, Sester *et al.* ont analysés les

LT CD4 et CD8 producteurs d'IFN- γ en cytométrie en flux des patients transplantés rénaux séropositifs et ont montré que les patients qui ont une diminution du nombre de LT CD4 anti-CMV dans le premier mois suivant la transplantation ont un risque plus élevé de maladie à CMV (245). Enfin, plusieurs études ont ensuite affiner ses connaissances en étudiant le nombre de LT CD8 spécifiques du CMV par la technique des tétramères. A notre connaissance, le travail publié en 2001 par l'équipe de Londres est le premier à s'être appuyé sur cette technique (246). Les auteurs ont étudié le nombre de LT CD8 anti-pp65 de 93 transplantés hépatiques HLA-A*0201, HLA-B*0702, HLA-B*0801 ou HLA-B*0702 qui, pour une majorité (88%), n'étaient pas virémiques au moment des prélèvements. Ce travail a permis de montrer que le nombre de LT CD8 anti-pp65 diminuait au cours des 6 premiers mois de greffe, puis réaugmentait sans atteindre les valeurs décelées avant la transplantation, alors que ces patients n'avaient pas reçu de traitement d'induction. De plus, les auteurs ont étudié la fonctionnalité de la réponse anti-pp65CMV par ELISPOT-IFN- γ et montré que le nombre de cellules répondeuses était bien inférieur au nombre de LT spécifiques au cours des 6 premiers mois (environ 3,5 fois moins), et encore plus après 6 mois car le nombre de cellules productrices d'IFN- γ n'augmentait pas à distance de la transplantation (21 fois moins). Finalement, ces premières études ont montré la faisabilité de la surveillance anti-CMV, une grande variabilité interindividuelle et une fluctuation au cours de la première année post-greffe. Elles ont donc posé les bases pour les études ultérieures.

L'équipe de Berlin est la première à avoir montré que l'évaluation de la réponse cellulaire spécifique du CMV pouvait présenter un intérêt pour évaluer le risque individuel avant la transplantation de développer une virémie et une maladie à CMV près la greffe (247). Les auteurs ont mesuré la proportion de LT CD4 et CD8 circulants producteurs d' IFN- γ en réponse à une stimulation *ex vivo* par les peptides immunodominant IE-1 et pp65, par cytométrie en flux, chez des sujets transplantés séropositif. En premier lieu, comme dans la

majorité des études ultérieures, les auteurs ont rapporté que la réponse anti-pp65 était plus forte que la réponse anti-IE, aussi bien concernant la fréquence des patients répondeurs (tous les patients avait une réponse CD8 et 85% une réponse CD4 anti-pp65 alors qu'une réponse anti-IE1 n'était observée que chez 71% des mêmes patients concernant les LT CD8 et 41% pour les LT CD4), que pour le caractère immunodominant de pp65 chez un patient en comparaison à la réponse anti-IE1 (dominant pour les CD4 chez tous les patients et pour CD8 chez 65% des patients). Cependant, seule la fréquence des LT CD8 anti-IE1, aussi bien avant la transplantation que deux semaines et un mois après cette dernière, distinguait sur cet effectif réduit les patients qui développaient ultérieurement une maladie à CMV de ceux qui n'en faisait pas.

Gerna *et al.* se sont également intéressés aux patients séropositifs en étudiant 20 patients transplantés cardiaques, 9 transplantés pulmonaires et 9 transplantés rénaux ne recevant pas de prophylaxie antivirale (248). Ils ont étudiés longitudinalement le nombre de LT CD4 et CD8 spécifiques du CMV producteurs d'IFN- γ au cours des 6 premiers mois de la transplantation et identifié 45% de patients "late responders", c'est-à-dire ne récupérant pas un nombre de LT anti-CMV comparable à celui d'avant la greffe. Ils ont constaté qu'un traitement antiviral était requis chez 76% de ces patients, alors que 86% des patients considérés "early responders" présentaient une négativation spontanée de leur virémie. Dans cette étude la stratification des patient restait mal décrite. De plus, la sérologie des donneurs n'était pas précisée. Egli *et al.* ont également tenté de stratifier le risque de développer une maladie à CMV chez des patients R+ (249). Ils ont ainsi étudié chez 48 patients transplantés rénaux R+ et 25 patients D+R- le nombre de LT CD4 et CD8 anti-CMV producteurs d'IFN- γ . Cette équipe a utilisé un marquage IFN- γ en cytométrie en flux suite à des stimulation par du lysat de CMV, du peptide pp65 ou du peptide pp72. Ces patients n'avaient reçu une induction par ATG que dans 19% des cas et le prélèvement était cette fois-ci réalisé à des moments très

variables au cours de la première année de greffe. En accord avec les études précédentes, les auteurs ont montré que les patients présentant une virémie avaient significativement moins de LT CD4 et CD8 anti-CMV au moment de la virémie mais sans pouvoir déterminer un seuil prédictif. Malheureusement, en raison de l'absence de suivi longitudinal, aucune données sur l'évolution de la réponse n'était disponible. De plus, les prélèvements étaient réalisés à des temps variables, ce qui complique l'interprétation de cette étude. Finalement, de nombreuses études (recensées dans une revue (250)) ont étudiés des patients séropositifs et la très grande majorité confirme que le niveau de réponse CD4 et CD8 spécifique est différent chez les patients virémiques et non virémiques. Cependant, l'utilisation de techniques diverses, à des moments différents et avec des méthodes d'analyse variées, sur des effectifs réduits, ne permet pas à l'heure actuelle d'évaluer sérieusement l'intérêt du monitoring de la réponse anti-CMV comme un outil prédictif utilisable en pratique clinique.

Deux techniques ont été développées avec des objectifs de standardisation, de reproductibilité, de réduction des coûts et de faisabilité dans des laboratoires "de routine", ayant toutes pour principe d'évaluer la synthèse d'IFN- γ par le LT spécifiques du CMV. La première est l'ELISPOT- IFN- γ qui mesure le nombre de lymphocytes producteurs d'IFN- γ , la seconde est Quantiferon-CMV qui correspond à un ELISA réalisé en tube (et non en plaques) avec comme stimulateur un pool de peptides CMV. L'utilisation du Quantiferon en pratique clinique a déjà été démontrée dans d'autres infections comme la tuberculose. Concernant l'ELISPOT, son utilisation reste actuellement limité au domaine de la recherche et nécessite un volume sanguin plus abondant. Les performances de ces 2 techniques, malgré un taux de discordance proche de 20%, étaient proches en terme de sensibilité et de spécificité pour la prédiction du risque de virémie dans une étude réalisée chez 120 patients transplantés rénaux, incluant 100 patient R+ bénéficiant d'une stratégie préemptive et 20 patients D+R- ayant reçu une prévention par valganciclovir pendant 6 mois (251). Bien que les auteurs confirmaient

une nouvelle fois que la réponse lymphocytaire anti-CMV était significativement plus faible chez les patients développant une virémie, les analyses ROC restait décevantes tant pour l'ELISPOT (AUC 0.62) que le QUANTIFERON (AUC 0,66), sans amélioration lorsque les test étaient combinés. Finalement, les résultats de cette étude ont être confirmées plus récemment par les travaux barcelonais qui ont étudié l'intérêt de la réalisation d'un ELISPOT-IFN- γ chez des patients D+R- à la fin d'une prophylaxie de 3 à 6 mois (252). En effet, l'incidence des maladies tardives après l'arrêt de la prophylaxie était significativement plus élevée chez les patients avec un QUANTIFERON-CMV négatif. La sensibilité et la valeur prédictive positive était bonne, mais la sensibilité était seulement de 14% et la valeur prédictive négative n'atteignait que 24%, alors que le seuil de positivité avait été diminué dans cette population. De plus, le test n'était pas interprétable chez 10 à 15% des patients, en particulier chez ceux qui avaient reçu une induction par ATG qui avaient fréquemment un témoin positif inadéquate. Ces patients, particulièrement immunodéprimés, avaient le risque le plus élevé de maladie à CMV.

Pour compléter ce paragraphe sur l'intérêt de la mesure de réponse lymphocytaire chez le patient transplanté, nous souhaitons référencer une étude récente qui a apporté des résultats inattendus (253). En effet, les auteurs ont pu mettre en évidence une réponse cellulaire anti-CMV chez environ 30% des patients séronégatifs avant la transplantation rénale, ce qui n'avait pas été rapporté antérieurement. Cette réponse était environ 5 fois moins forte que celle des patients séropositifs lorsque la stimulation était réalisée avec du lysat CMV ou du pp65 et 1,6 moins élevée lorsque le peptide IE1 était utilisé. Comme chez les patients séropositifs, la présence de LT CD8 anti-IE1 producteurs d'IFN- γ conférait une protection contre la virémie et la maladie à CMV, mais chez ces patients la présence de LT CD8 anti-pp65 producteurs d'IFN- γ était également protectrice. Ce résultat suggère que des patients infectés peuvent être séronégatifs au moment de la transplantation, soit car ils n'ont jamais

développé d'anticorps soit suite à une séroreversion, et expliquer au moins en partie que des patients séronégatifs transplantés avec un organe d'un donneur séropositif ne développent pas toujours une virémie CMV en l'absence de traitement antiviral. La présence d'une réponse CD8 anti-CMV était d'ailleurs corrélée à la présence de LB mémoires périphériques capables après une culture cellulaire de 7 jours en présence d'IL-2 et d'agonistes de TLR7/8 de devenir des cellules productrices d'anticorps détectables également en ELISPOT (253).

Il est également important de discuter les efforts actuels pour étudier plus finement la fonctionnalité des LT anti CMV et de ne plus se limiter à une étude de l'IFN- γ . Les travaux de Snyder *et al.* réalisés chez des patients transplantés pulmonaires sont intéressants à cet égard (254). Les auteurs ont ainsi décrits la réponse lymphocytaire CD4 et CD8 à l'association de peptides CMV (pool de peptides IE-1 et pp65) et d'un anticorps anti-CD28 chez 14 patients transplantés pulmonaires. Le pourcentage de LT CD8 répondeurs mesuré en cytométrie en flux était plus élevé que le pourcentage de LT CD4 (2 à 3% vs. < 0,5%), aussi bien après une stimulation IE-1 que pp65. La majorité des LT CD8 ne produisaient pas d'IL-2. En revanche ils produisaient du TNF- α et de l'IFN- γ . Dans plus de 80% des cas les LT CD8 étaient positifs pour ces deux cytokines, et ce pourcentage était semblable chez les patients prélevés au cours de la première année de greffe (traités par valganciclovir) et chez ceux analysés plus à distance (chez qui le traitement anti-viral avait été suspendu). Le seul élément qui semblait distinguer la réponse vis-à-vis de ces peptides était la diminution du pourcentage de lymphocytes anti-IE-1 à deux ans de la transplantation, qui n'était pas observée pour les LT anti-pp65. S'appuyant sur des travaux montrant l'importance des LT polyfonctionnels dans le contrôle du VIH, cette même équipe a étudié l'intérêt de surveiller les LT anti-CMV capables de synthétiser du TNF- α , de l'IFN- γ et de l'IL-2, mais également exprimant CD107a qui est marqueur de dégranulation (255). Les LT polyfonctionnels anti-CMV, définis par l'association d'au moins 3 des 4 marquages réalisés, représentaient une minorité des LT CD4

CD8 dans une première cohorte de 43 patients transplantés pulmonaires. La distribution des LT CD4 et CD8 anti-CMV chez un patient ayant développé une virémie et un second n'en ayant pas fait est représentée ci-dessous.

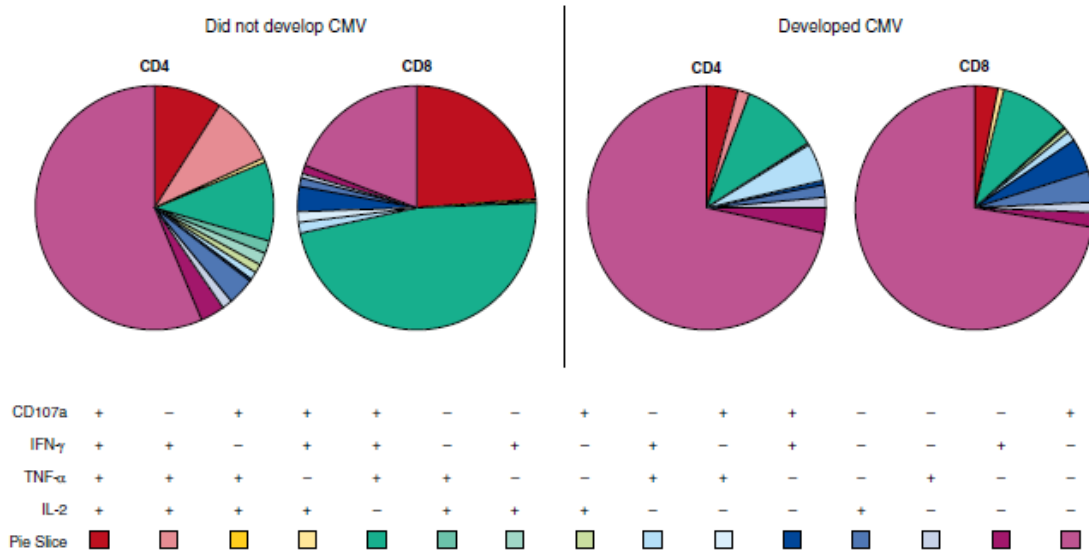


Figure 8: distribution des LT CD4 et des LT CD8 en fonction de leurs capacités de dégranulation et de synthèse d'IL-2, d'IFN- γ et de TNF- α (255).

L'analyse a ensuite montré qu'une faible proportion de LT CD4 et CD8 polyfonctionnels sécrétant les 3 cytokines (mais n'exprimant pas le CD107) était associée à un risque accru de développer une virémie, alors que la présence de LT CD8 "bifonctionnels" CD107a^{pos} IFN- γ ^{pos} IL-2^{neg} TNF- α ^{neg} était plus élevée chez les patients virémiques. Le score de risque de virémie tardive intégrant les LT polyfonctionnels était beaucoup plus performant que celui établi uniquement sur la proportion de LT producteurs d'IFN- γ , et a été validé dans une seconde cohorte de 27 patients. Cette étude laisse entrevoir une amélioration de la prédiction de la maladie à CMV tardive sur la base d'une analyse plus complète de la fonctionnalité des LT anti-CMV. Aucune étude sur de larges effectifs en transplantation rénale et hépatiques n'ont été publiées à ce jour.

2. Monitoring des LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg}

En transplantation rénale, les études publiées en 2016 concernant les LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} semblent également intéressantes (228,256). Elles ont pour avantages, en comparaison à celles s'intéressant aux LT $\alpha\beta$, d'apparaître plus simples (seulement un double marquage) et moins onéreuses. Elles visent cependant à déterminer l'évolution d'un patient virémique et non à prédire cette dernière. En effet, l'expansion de ces cellules apparaît dans les jours suivant la première virémie mais ne la précède pas. Ainsi la vitesse d'expansion LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} est inversement corrélée à la durée de la virémie chez les patients D+R- et chez les patients R+ ayant reçus de l'ATG. Surtout, une expansion des LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} durant le traitement antiviral survenait chez 94% des patients ne présentant pas de récurrence de virémie, mais seulement chez 14% et 7% des patients développant une récurrence de virémie asymptomatique ou de maladie à CMV. Des études ultérieures restent nécessaires pour déterminer si la durée du traitement et la surveillance de la virémie peuvent être adaptées individuellement au regard de l'évolution des LT $\gamma\delta$ V δ 2^{neg} du patient.

3. Monitoring de la réponse anti-CMV et survenue d'effets indirects

L'ensemble des études rapportées dans ce chapitre se consacrent à identifier des marqueurs prédictifs de virémie et de maladie CMV. A l'heure actuelle, très peu de travaux ont été menés pour évaluer l'intérêt de l'étude de la réponse immunitaire spécifique du CMV pour prédire la survenue d'effets indirects du virus, probablement car leurs mécanismes sont peu clairs mais également car leur survenue, en particulier pour ceux concernant spécifiquement les greffons, sont plus difficiles à juger et plus tardifs. Ainsi, une étude réalisée sur 19 patients a suggéré que la présence de LT CD4 anti-CMV dans le premier mois suivant une transplantation cardiaque pourrait réduire le risque CAV (257). Une seconde réalisée à Berlin chez 36 patients transplantés rénaux a montré une corrélation inverse entre la réponse lymphocytaire

anti-IE-1 et le débit de filtration glomérulaire à 6 et 12 mois (258). Finalement, en raison des faibles effectifs et d'analyses statistiques limitées, ces résultats doivent être interprétés avec réserve et le lien entre le niveau de réponse anti-CMV et l'apparition de lésion dans le greffon demeure inconnu.

IV. Articles originaux

A. Premier article : "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;13:1219-2019)

Nous avons, dans ce premier travail, cherché à mesurer l'impact sur le devenir du greffon rénal de l'infection à CMV du donneur au sein de la cohorte de patients transplantés à Tours entre 1985 et 2008. En effet, bien que certains travaux aient préalablement rapporté une association entre la réplication du CMV dans les suites d'une transplantation rénale et le développement de la néphropathie chronique d'allogreffe avec notamment de la fibrose interstitielle et de l'atrophie tubulaire (76,86,259), l'impact sur la perte de fonction demeure controversé. Notre hypothèse était que la réplication virale au sein du greffon induisait le développement de lésions chroniques participant à terme à la perte de fonction de l'organe.

La difficulté principale est que l'information "infection du greffon" ou "réplication virale dans le greffon" n'est pas disponible sur de grande série de patients. Le seul moyen d'affirmer cela est en effet de mettre en évidence la présence du virus au sein du tissu qui doit donc être échantillonné par un geste invasif (biopsie de greffon). Au delà des problèmes de sensibilité des techniques utilisées (RT-PCR, hybridation *in situ*, immunohistochimie), une recherche négative prêterait toujours à caution puisque la réplication virale est transitoire et possiblement localisée (erreur d'échantillonnage) alors que la réalisation de biopsies itératives n'est pas réalisable pour des raisons éthiques. Nous avons donc pris le parti d'étudier l'impact de la sérologie du donneur qui prouve l'infection de celui-ci et non l'impact de la réplication virale. En effet une sérologie positive, même si elle ne traduit pas avec certitude l'infection du greffon, est un biomarqueur probablement beaucoup plus fidèle. Ainsi, il a récemment été montré qu'entre 60 et 100% des greffons étaient infectés au moment de la transplantation chez

les patients D+ (85,260). De plus la sérologie CMV est disponible pour la quasi totalité des receveurs et des donneurs.

Nous avons ainsi montré que les greffons de donneurs séropositifs pour le CMV avaient une moins bonne survie, indépendamment des facteurs confondants éventuels que sont la qualité du greffon (représentés par la créatininémie et la protéinurie à 3 mois), la survenue d'un rejet, le traitement immunosuppresseur, l'âge du donneur et la période de transplantation.

Plusieurs déterminants de cet impact de la séropositivité du donneur sur la survie des greffons rénaux ont été recherchés. A notre connaissance, l'hypothèse que des caractéristiques propres à la souche du virus puissent influencer sur sa pathogénicité n'est pas supportée par les données de la littérature, d'autant plus que les patients peuvent être infectés par plusieurs souches de HCMV. Quoiqu'il en soit, cette information n'est pas disponible pour les patients. A l'échelle d'une cohorte, analysée de façon rétrospective, seuls des paramètres recensés en routine clinique peuvent être analysés. Nous avons ainsi exploré si les facteurs suivants influaient l'effet délétère de la séropositivité du donneur:

- **le matching HLA classe I** : un greffon présente la particularité de présenter les peptides par des molécules HLA de classe I (aux LT CD8) et de classe II (aux LT CD4) qui peuvent être différentes de celles du receveur. Ainsi, un mésappariement complet en HLA de classe I, défini comme l'absence chez le donneur de spécificités HLA-A et HLA-B (le HLA Cw n'étant pas disponible) présentes chez le receveur, peut rendre moins accessible les cellules infectées du greffon aux LT CD8 anti-CMV du receveur, dont le répertoire est restreint aux peptides CMV présentés par le HLA du receveur. De façon similaire, un mésappariement complet en HLA de classe II pourrait conférer une incapacité des LT CD4 anti-CMV du receveur à reconnaître les peptides CMV présentés par les molécules HLA de classe II du donneur. Cependant seul le typage DR a été réalisé jusqu'en 2005, ce qui

représente une information très partielle (pas de prise en charge du niveau d'appariement DQ, ni DP) et la ségrégation des patients en "fullmismatch-II" ou avec au moins une identité partagée n'est pas possible sur l'ensemble de la cohorte.

- **la sérologie du receveur** : la séropositivité du receveur traduit l'infection certaine de ce dernier avant la transplantation, et donc l'existence d'un répertoire de lymphocytes anti-CMV constitué en dehors de toute immunosuppression. L'antériorité de l'infection n'est pas connue mais le plus souvent ancienne, notamment lorsque le sujet est âgé.

- **la survenue d'une virémie** : témoigne d'une infection systémique détectable (les techniques ont évoluées au cours du temps et l'Ag-pp65 a été utilisée à partir de 1995) sans préjuger d'une répllication dans le greffon. On peut imaginer qu'un patient D-R+Ag+ a un risque plus élevé d'infection du greffon par le CMV qu'un patient D-R+Ag-. On peut aussi supposer que la survenue d'une virémie chez un patient D+ traduit un niveau de répllication plus élevé dans le greffon et stratifie le risque de perte de greffon chez les patients D+.

- **une lymphopénie CD8**: comme expliquée dans l'introduction de la thèse, les LT CD8 ont un rôle majeur dans le contrôle de l'infection CMV. Une surveillance longitudinale de la numération des sous populations lymphocytaires est réalisée dans notre centre depuis le début des années 1990. Nous avons donc pu étudier l'évolution du nombre de lymphocytes T CD8 en fonction de la sérologie du donneur, et l'impact d'une lymphopénie CD8 sur le devenir du greffon en fonction du statut CMV du donneur.

L'ensemble des résultats sont détaillés dans l'article ci-après intitulé "CMV Infection in the Donor and Increased Kidney Graft Loss: Impact of Full HLA-I Mismatch and Posttransplantation CD8⁺ Cell Reduction" publié dans l'American Journal of Transplantation en 2013.

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

P. Gatault^{1,2,3,*}, J.-M. Halimi^{1,2}, C. Forconi¹,
G. Thibault^{3,4}, C. Barbet², E. Mérieau²,
C. Gaudy-Graffin^{5,6}, J.-F. Marlière²,
A. Goudeau^{5,6}, F. Bruyère⁷, Y. Lebranchu^{1,2},
M. Büchler^{1,2} and C. Baron^{1,2}

¹EA4245 Cellules Dendritiques et Greffes, Université François-Rabelais, Tours, France

²Service de néphrologie et Immunologie Clinique, CHRU de Tours, Tours, France

³Laboratoire d'immunologie, CHRU de Tours, Tours, France

⁴CNRS UMR 7292, Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer, Tours, France

⁵Laboratoire de bactériologie et virologie, CHRU de Tours, Tours, France

⁶Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U966, Tours, France

⁷Service 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⁺ 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⁺). 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⁺ cells. In R⁺ patients with positive CMV antigenemia during the first year, CD8⁺ cell count did not increase at 2 years posttransplantation, in contrast to R⁻ recipients. In addition, marked CD8⁺-cell decrease was a risk factor of graft failure in these patients. This study identifies HLA-I full mismatch and a decrease of CD8⁺ 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⁺, CMV seropositive donor; D⁻, CMV seronegative donor; R⁺, CMV seropositive recipient; R⁻, 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 γ -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_® or lymphoglobuline_®, Imtix-Sangsat, Lyon, France) or basiliximab (Simulect_®, 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⁺/R⁻] 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⁺]) 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 10⁶ 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-poly-nuclear cells per 2 × 10⁵ leucocytes was recorded. Weekly CMV-antigenemia monitoring was performed during 4 and 6 months following transplantation in R⁺ and D⁺R⁻, 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⁺, CD8⁺ 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 retransplantation). 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

American Journal of Transplantation 2013; 13: 2119–2129

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

	All (n = 1279)	D ⁺ R ⁻ (n = 277)	D ⁺ R ⁺ (n = 284)	D ⁻ R ⁺ (n = 360)	D ⁻ R ⁻ (n = 358)
Donor characteristics					
Age (years)	43.2 ± 15.3	43.6 ± 17.6 ^f	46.4 ± 16.8	43.9 ± 15.5	39.7 ± 17.5 ^g
Male sex (%)	63.5	61.4	61.7	61.9	67.3
Living donor (%)	1.5	1.4	0.7	0.8	2.8
Recipient characteristics					
Age (years)	45.6 ± 15.3	44.5 ± 15.9 [*]	48.7 ± 13.7	47.6 ± 13.8	42.1 ± 16.4 [*]
Male sex (%)	61.5	64.3 [†]	55.3	57.5	68.4 [†]
Diabetes mellitus (%)	9.0	6.0 [†]	12.0	12.5	7.9
Body mass index (kg/m ²)	24.1 ± 4.3	23.8 ± 4.1	23.6 ± 4.2	24. ± 4.4	24.2 ± 4.4
Graft characteristics					
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
Initial immunosuppressive regimen					
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 ^g
Tacrolimus (%)	24.2	25.6	27.1	26.4	18.4 [†]
Mycophenolate mofetyl (%)	65.9	65.0	69.7	69.2	60.3 [†]
Azathioprine (%)	33.4	33.2	29.2	30.8	39.4 [*]
Sirolimus (%)	2.3	1.8	3.5	1.7	2.5
Clinical and biochemical variables at 3 months					
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 ²)	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⁺, CMV-positive donor; D⁻, 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⁻ R⁺.

[†]p < 0.05 for comparison with D⁺ R⁺.

^gp < 0.05 for comparison with all other groups.

^fp < 0.05 for comparison with D⁺ R⁺ and D⁻ R⁺.

(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 m². BPAR occurred in 28.3% during the first year. Patients were then analyzed separately according to donor and recipient CMV serology (Table 1). D⁻ R⁻ patients were younger than D⁺ R⁺ and D⁻ R⁺ patients and received a kidney from younger donor than all other groups. Of note, cyclosporine was more often used in D⁻ R⁻ patients than in other patients.

CMV Infection in the donor is an independent risk factor of graft loss, especially in R⁺ 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⁺ and D⁻ 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⁻ R⁻ were excluded), as shown in Figure 1C (p = 0.023). Interestingly, by year 1 and 2, D⁺ patients had a lower GFR as compared to D⁻ 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

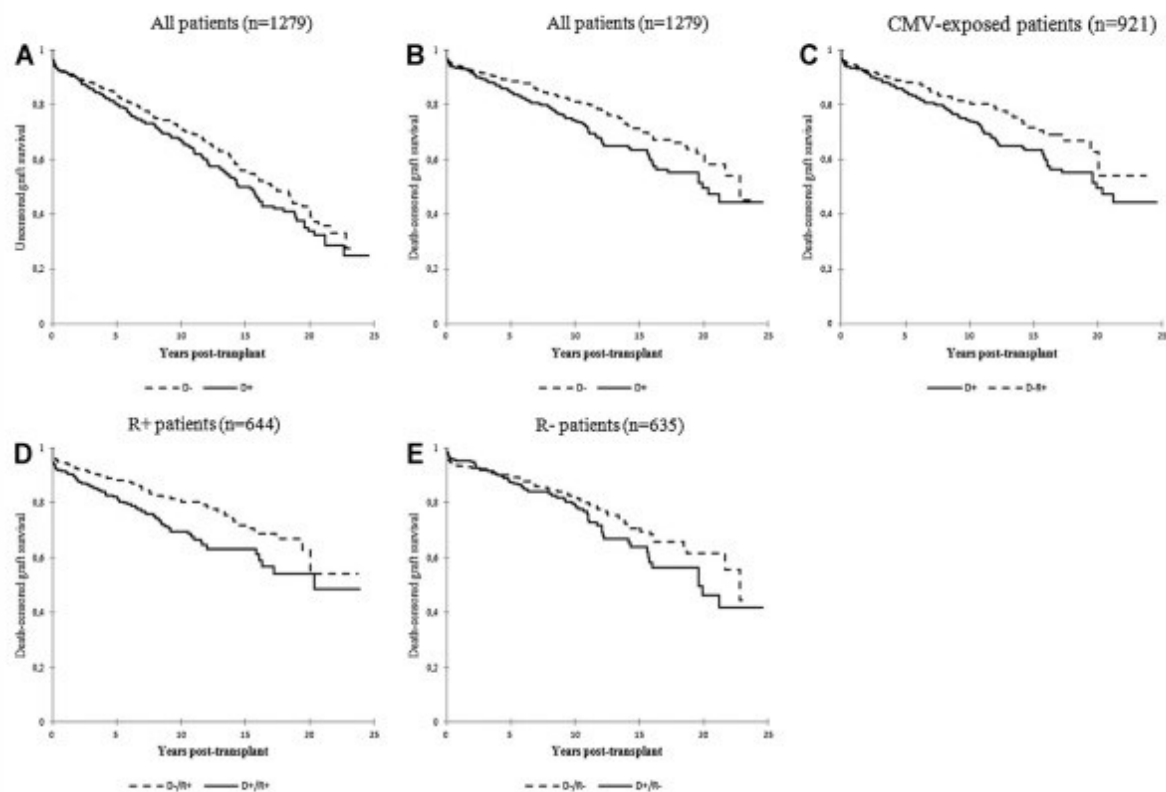


Figure 1: Kidneys from CMV-infected donors show lower survival, especially in R⁺ recipients. Estimated uncensored graft survival by donor CMV serostatus in 1279 consecutive patients with transplantation between 1985 and 2008 are represented (A) ($p = 0.053$). Death-censored graft survival in the same 1279 patients and in 921 CMV-exposed recipients (i.e. D⁻R⁻ 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⁺ 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⁻R⁻ 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⁺ recipients (Figure 1D, $p = 0.008$) but not in R⁻ recipients (Figure 1E, $p = 0.21$). Moreover in R⁺ 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⁺ recipients before engraftment (R⁺).

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⁺ recipients without any viral prophylaxis ($n = 429$). Receiving a graft from a CMV-positive donor significantly increased the risk of CMV-Ag in R⁺ recipients (D⁺/R⁺: 68.5% vs. D⁻/R⁺: 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⁺ 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 ⁻ R ⁻ 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 ⁺ 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⁺, CMV-positive donor, R⁺, 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⁻/R⁻ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺: HR 3.051 [1.012–7.254], p = 0.012). In contrast, D⁺ and D⁻ 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

	Univariate analysis				Multivariate analysis		
	HR	95% CI	p		HR	95% CI	p
CMV-Ag free patients							
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 ⁻ R ⁻ 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 ⁺ (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⁺, CMV-positive donor, R⁺, 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.

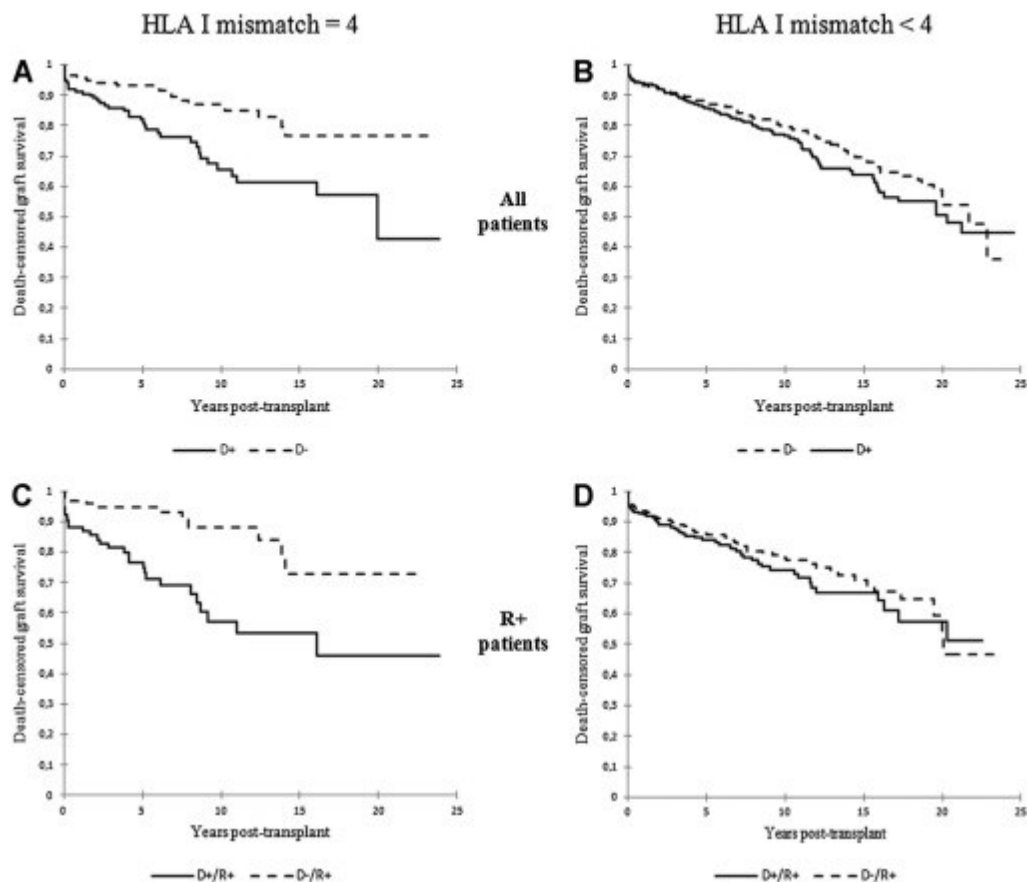


Figure 2: Partial human leukocyte antigen (HLA) class I matching protects against the detrimental effect of receive a kidney from CMV-infected donor. Death-censored graft survival in patients with full HLA class I AB mismatch (A and C) or partial HLA class I mismatch (B and D) by donor CMV serology.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

At 2 years, the D⁺R⁺ recipients do not expand their CD8⁺ cell count in response to CMV as efficiently as did the D⁻R⁻ recipients

The aforementioned data suggest that the CD8⁺ 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⁺ cell compartment would correlate with the anti-CMV response.

For the purpose of the present study, we analyzed the circulating CD8⁺ cell count at D0 and year-2 after transplantation by donor and recipient CMV serology (i.e. D⁻R⁻, D⁺R⁻, D⁻R⁺, D⁺R⁺) and CMV-Ag. The CD8⁺ cell counts, recorded for 663 at D0, was greater in R⁺ patients than in R⁻ patients (520 ± 270 vs. 407 ± 206/mm³, respectively; p < 0.0001). Two-year CD8⁺ cell counts

were recorded for 164 D⁻R⁻ (3 Ag⁺), 128 D⁺R⁻ (51 Ag⁺), 169 D⁻R⁺ (69 Ag⁺) and 130 D⁺R⁺ (71 Ag⁺). At year 2, ANOVA analysis showed that CD8⁺ cell counts were different between groups presented in each panel of Figure 3. Paired-wise analyses indicated that CD8⁺ cell count was lowest for D⁻R⁻ patients (vs. all other groups at year 2, p < 0.0001; Figure 3, upper panel). These data indicate that the size of the CD8⁺ cell compartment is driven by CMV. Interestingly, the 2-year CD8⁺ cell count was much lower in D⁺R⁺ than in D⁺R⁻ patients (599 ± 410 vs. 811 ± 647/mm³, p < 0.0001), but not different of that in D⁻R⁺ (490 ± 397/mm³, p = 0.745). CMV-Ag was associated with increased number of CD8⁺-cells in D⁺R⁻ patients (1112 ± 678/mm³ vs. 530 ± 432/mm³, p < 0.0001), but not in D⁺R⁺ (605 ± 296/mm³ vs. 510 ± 224/mm³, p = 0.221) and D⁻R⁺ (567 ± 318/mm³ vs. 558 ± 350/mm³, p = 0.902). In addition, the difference between D⁺R⁺Ag⁺ and D⁺R⁻Ag⁺ was dramatic (p < 0.0001), while no difference was observed between D⁺R⁺Ag⁺ and

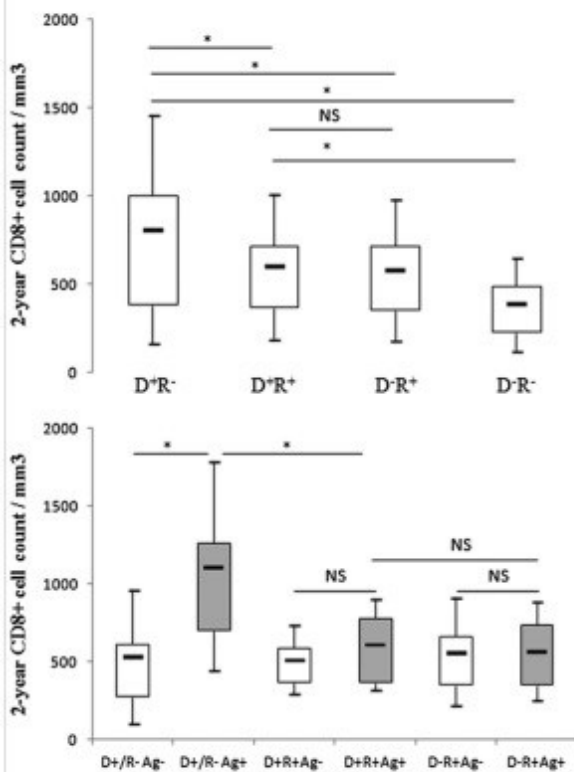


Figure 3: At 2 years, CMV drives a much weaker expansion in D+R+ patients as compared to D-R-. Each graph represents number of CD8+ cells/mm³ at 2 year after transplantation by donor (D^{+/+}) and recipient (R^{+/+}) CMV serostatus. In upper panel, patients are presented by CMV serology group. In lower 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⁻R⁺Ag⁺ patients (p = 0.574). In addition, we found that NK and CD4⁺ 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⁻R⁻ recipients kept a higher number of CD8⁺ cells as compared to D⁺R⁺ recipients, for whom renal allograft outcome was poorer.

We next analyzed individual variations in CD8⁺ 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⁺ cell compartment was similar in D⁺R⁺ and D⁻R⁺ patients, we grouped them together for analysis of the individual evolution of the CD8⁺ cell subpopulation. We focused on patients who unambiguously reactivated CMV (i.e. 106 R⁺Ag⁺ and 43 D⁺R⁻Ag⁺). Spearman correlation tests showed that pretransplant CD8⁺ cell number was

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

Posttransplantation contraction of the CD8+ cell compartment increases the risk of graft loss in patients exposed to CMV

First, we evaluated the individual evolution of the CD8⁺ cell count ((Year 2 – D0)/D0) × 100 in CMV-exposed patients. Then, we compared graft survival in patients with severe reduction in CD8⁺ cell count (≤10th percentile or reduction ≥40%) to others. R⁺ 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⁺ cell count reduction remained associate with increased risk of graft loss in 113 R⁺ patients who had received ALG (p = 0.014). In contrast, >40% reduction in CD8⁺ cell count had no impact on graft survival among D⁻R⁻ 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⁺ 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⁺R⁺ rather than D⁺R⁻ 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⁺ 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

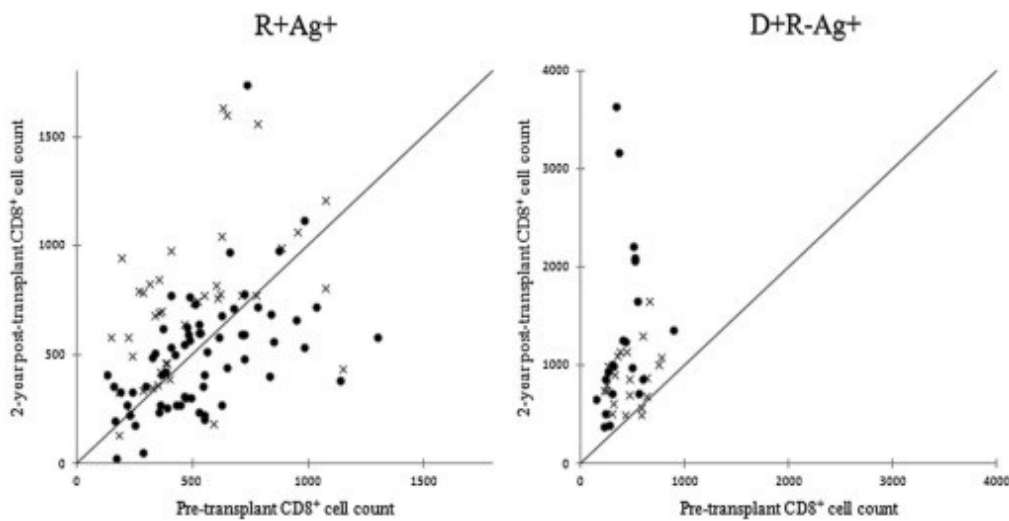


Figure 4: Early CMV viremia drives a long lasting expansion of the CD8⁺ cell compartment in all R⁺ patients, in contrast to R⁻ recipients in which the CD8⁺ response is highly heterogeneous. Distribution of patients by CD8⁺ cell count at day 0 (D0; x-axis) and year 2 (y-axis) for patients who had an episode of viremia during the first year posttransplantation (Ag⁺). R⁺ patients (n = 106) and D⁺R⁻ combinations (n = 43) are represented on the left and right panel, respectively. Black circle represents patients who received antilymphocyte globulins, and cross, patients who never received treatment. Black line is the bisector ((Year 2 - D0)/D0 × 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⁺ rather than R⁻ recipients are more susceptible to the adverse consequences of transplanting kidneys from CMV-infected donors. Therefore, we focused on this group of R⁺ 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⁺ 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⁺ recipients transplanted with kidneys from CMV-

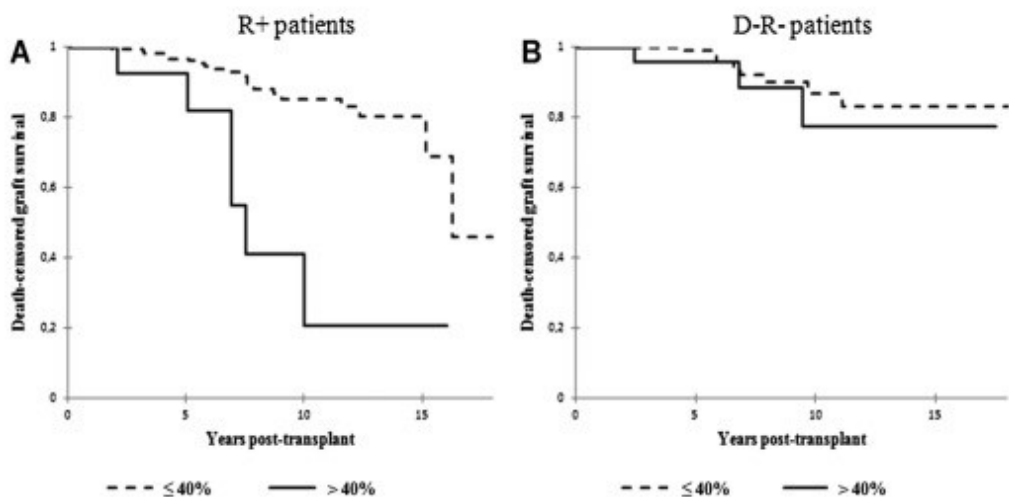


Figure 5: Severe reduction of CD8⁺ cell count after transplantation increases the risk of graft loss in R⁺ recipients. Graphs represent risk of death-censored graft survival by reduction in CD8⁺ cell count at year 2 in R⁺ recipients (left graph, n = 204) or D⁻R⁻ patients (right graph, n = 121). Bold black lines indicate recipients with >40% reduction in CD8⁺ cell count (R⁺, n = 26; D⁻R⁻, n = 36); dashed lines, recipients without >40% reduction (R⁺, n = 178; D⁻R⁻, n = 85). CD8⁺ cell count reduction was associated with graft loss in R⁺ recipients (p = 0.003) but not D⁻R⁻ 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⁺ T cells (13,37), which have a crucial role in control of CMV replication (6), we analyzed the circulating CD8⁺ 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⁺ but not CD4⁺ or NK cells in D⁺R⁻ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ cell exhaustion in long term graft survival. The fact that we did not assess intra-graft 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 intra-graft 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⁻) than R⁺ 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⁺ T cells from R⁺ 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⁺ T cells able to recognize CMV peptides presented by fully allogeneic class I. So, poor ability of T cells to control intra-graft 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⁺ 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⁺ recipients with full HLA class I mismatch, even in antigenemia-free patients. Moreover, R⁺ recipients with marked posttransplantation reduction of the CD8⁺ 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.
- Sylvester 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, Olislagers 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.
- Strebblow 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* 1969; 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 IM, 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⁺ and NK cells at 2 years after transplantation by donor and recipient CMV serostatus.

Table S1: Risk of graft loss in 1279 patients

	Model 1			Model 2			Model 3		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
CMV donor serostatus (D+ vs D-)	2.452	1.424-4.221	0.001	2.337	1.354-4.036	0.002	2.321	1.344-4.008	0.003
Creatinine at 3 months (per $\mu\text{mol/L}$)	1.007	1.005-1.009	<0.0001	1.007	1.005-1.009	<0.0001	1.007	1.005-1.010	<0.0001
Proteinuria at 3 months (per g/day)	1.269	1.180-1.364	<0.0001	1.266	1.176-1.363	<0.0001	1.262	1.169-1.363	<0.0001
Acute rejection during the first year	2.114	1.598-2.797	<0.0001	2.220	1.674-2.945	<0.0001	2.216	1.670-2.941	<0.0001
Year of transplantation	0.961	0.936-0.987	0.004	0.932	0.889-0.978	0.038	0.934	0.890-0.980	0.006
Systolic BP at 3 months (per mmHg)	1.006	0.998-1.015	0.128	1.006	0.998-1.014	0.149	1.006	0.998-1.015	0.139
Mycophenolate mofetil	.	.	.	1.319	0.866-2.009	0.196	1.313	0.862-2.001	0.205
Cyclosporine	.	.	.	1.640	0.962-2.796	0.069	1.642	0.963-2.798	0.068
Anti-lymphocyte globulins	.	.	.	0.732	0.688-1.098	0.131	0.731	0.487-1.096	0.130
Donor age (per year)	0.983	0.887-1.090	0.745

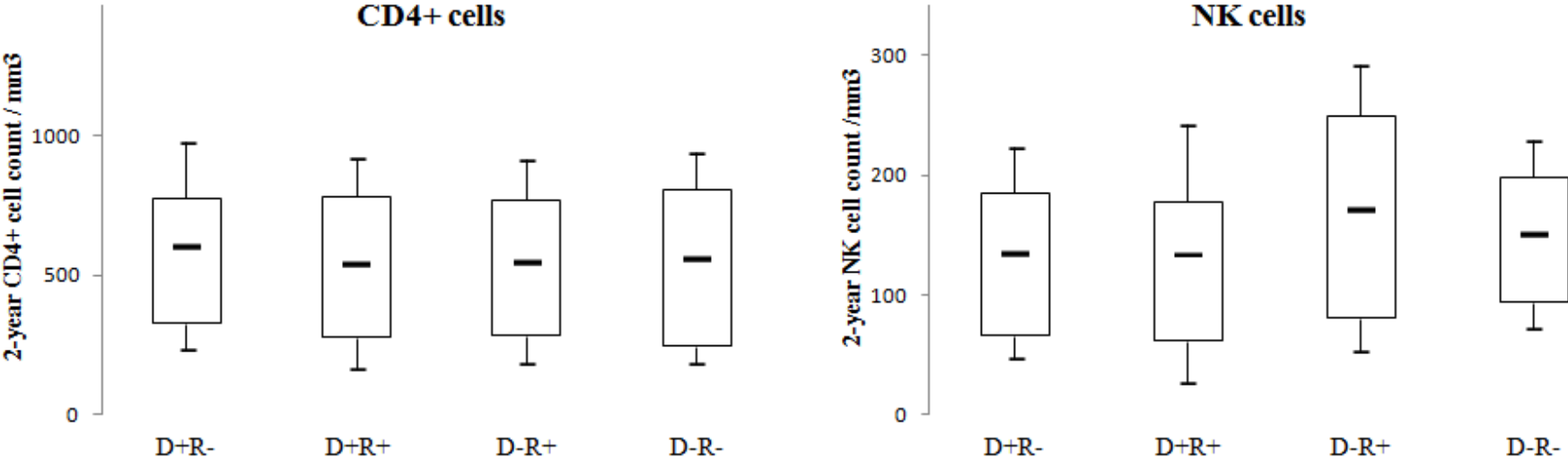
Abbreviations: HR, Hazard Ratio; 95% CI, 95% Confidence Interval; D+, CMV-positive donor; D-, CMV-negative donor; BP, Blood Pressure

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 S1: Number of CD8+ cells and NK cells at 2 year after transplantation by donor and recipient CMV serostatus.



B. Second article " CMV-infected kidney grafts drive the expansion of blood-born CMV-specific T-cells restricted by shared HLA molecules through presentation on donor's cells." (soumis à publication)

Les résultats de l'article précédent renforcent l'hypothèse que l'intensité de la réponse lymphocytaire CD8 anti-CMV puisse refléter le contrôle de l'infection dans le greffon et le développement d'éventuelles lésions liées à cette dernière chez les patients transplantés infectés avant la transplantation et recevant un greffon d'un donneur à haut risque d'être infecté (D+R+). Nous avons par ailleurs montré que le nombre de LT CD8 sanguins était plus élevé chez les patients recevant un rein D+. Les déterminants de la réponse immunitaire spécifique du CMV sont actuellement peu compris et l'effet de l'infection du donneur non déterminé. Nous avons par conséquent étudié cette question chez 115 patients transplantés rénaux suivis à Tours.

Nous avons tout d'abord étudié l'effet de la superinfection sur le nombre de lymphocytes anti-pp65 producteurs d'IFN- γ , de TNF- α et de granzyme B. Nous montrons que les patients D+R+, comparés aux receveurs D-R+, ont un nombre très supérieur de lymphocytes T répondeurs, en particulier d'IFN- γ . Nous avons ensuite analysé séparément les receveurs partageant au moins une compatibilité HLA de classe I avec leur receveurs et ceux présentant un mésappariement complet pour les molécules HLA-A et HLA-B. Nous avons observé que l'effet amplificateur de la réponse anti-CMV observé chez les patients D+R+ nécessitait un appariement au moins partiel avec le greffon, suggérant que la stimulation des LT CD8 anti-CMV par les cellules du donneur était un élément indispensable à cet effet. Nous avons alors étudié le nombre de LT CD8 anti-pp65 apparus après la transplantation chez des patients non infectés avant la greffe (D+R-). Nous rapportons que ces LT CD8 anti-pp65 restreint par le HLA-A2 étaient beaucoup plus nombreux lorsque le donneur était HLA-A2, c'est-à-dire lorsque les LT CD8 étaient stimulés par les cellules du donneur. Il est ainsi raisonnable de

penser qu'il s'agit des cellules du greffon plus que de cellules présentatrices d'antigènes du donneur ayant migré dans les organes lymphoïdes secondaires. Ce travail plaide donc pour un rôle important de la présentation des peptides viraux au sein du greffon par les cellules infectées dans l'élaboration de la réponse lymphocytaire CD8 mémoire.

L'ensemble des résultats sont présentés dans l'article ci-après intitulé "CMV-infected kidney grafts drive the expansion of blood-borne CMV-specific T-cells restricted by shared HLA molecules through presentation on donor's cells.", actuellement soumis à publication.

Title: CMV-infected kidney grafts drive the expansion of blood-born CMV-specific T-cells restricted by shared HLA molecules through presentation on donor's cells.

Authors: Philippe Gatault, Sally Al-Hajj, Johan Noble, Eloi Chevallier, Marie Piollet, Catherine Forconi, Catherine Gaudy-Graffin, Gilles Thibault, Elodie Miquelestorena-Standley, Roxane Lemoine, Jean Michel Halimi, Matthias Büchler, Christophe Baron

Corresponding author:

Philippe Gatault, MD

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: philippe.gatault@univ-tours.fr

Keywords: Cytomegalovirus, Kidney Transplantation, Allocation, HLA matching, T-cell

Abstract

Background. Cytomegalovirus specific immune response is crucial to control CMV infection in kidney transplant recipients (KTR), in whom recipient CMV can be reactivated (R+) and donor CMV superinfected (D+R+) or primary infected recipients (D+R-). Effect of CMV-superinfection by kidney graft on CMV-specific T cell response is not yet well defined and role of CMV infected donor cells in the development of CMV specific immune response remains poorly understood. **Patient and methods.** We assessed specific immune response using IFN- γ ELISOPT and pp65 dextramers in 115 KTR (D+R- 31, D+R+ 44, D-R+ 40). **Results** We observed that number of IFN- γ -producing cells was higher in D+R+ as compared to D-R+ recipients (3224 [850-9311] vs. 1983 [101-8785] spots/ 10^6 CD3+ cells, $p=0.004$). Effect of superinfection remained in patients sharing at least one HLA-I identity (D+R+ 3245 [824-12999] vs. D-R+ 1791 [111-8614] spots/ 10^6 CD3+ cells, $p=0.003$) but disappeared in full HLA-I mismatched KTR (D+R+ 2505 [1055-6818] vs. D-R+ 3651 [143-5961] spots/ 10^6 of CD3+ cells, $p=0.430$). This result suggested that presentation of CMV peptides by donor cells was crucial to stimulate the expansion of pp65-specific memory CD8 T cells. Then, we compared in D+R- recipient number of anti CMVpp65 CD8+ T cells restricted by HLA-A2 depending on whether the donor expressed or not HLA-A2, to determine role of shared HLA-I and kidney allograft in CMV-specific CD8 T cell expansion. Patients who received non-HLA-A2 kidneys developed very few anti-CMVpp65 T-cells restricted by HLA-A2 as compared to those who received an HLA-A2 expressing kidney (300 [0-14638] vs 17,972 [222-85594] anti CMVpp65 CD8T-cells/ 10^6 of CD8 cells, $p=0.001$). **Conclusion.** We bring for the first time valuable evidence that CMV-infected donor cells drive inflation of memory CMV specific CD8 T cells in kidney transplant recipients.

Introduction

Human cytomegalovirus (CMV) is an ubiquitous herpes virus which infects 50 to 90% of subjects in United states and Europe, usually during their childhood (1,2). Following primary infection, a large and powerful anti-CMV immune response, involving both innate and adaptive components, leads to the resolution of acute primary infection and confines it in a restricted number of cells in a latent state (3). Thus, CMV is not eliminated and persists life long in its host in whom a dynamic subtle equilibrium establishes between the virus which need to multiply to be shed in the secretions and disseminate to new host and the anti-CMV immune response.

CMV specific HLA-I restricted CD8 T cells are an important component of post-transplantation anti-CMV response. The vast majority of blood-borne CMV-specific CD8 T cells is made up of terminally differentiated effector T cells also called inflationary T cells (Teff, TEMRA) and of a minority of T central memory (Tcm) and T effector memory (TEM). Teff are endowed with immediate effector function but have a short life span. They are continuously replenished by HCMV-specific TCM or TEM subsets which divide and differentiate after occasional antigen stimulation by non-haematopoietic cells. These cells along with T resident memory (Trm) participate to the immune surveillance in latently infected organs.

In transplant patients, use of immunosuppressive drugs and highly frequent events promoting exit of latency such as ischemia-reperfusion, sepsis, alloreactivity deeply affect course of CMV infection. In addition, different settings can be encountered accordingly donor and recipient CMV status. Thus, latent recipient CMV can be reactivated in R+ recipient, irrespective of donor CMV status and donor CMV reactivation can lead to superinfection in D+R+ recipients or primary infection in D+R- recipients. We have previously reported that donor

CMV positivity was a risk factor of graft loss, especially in CMV infected recipient (D+R+) (4), while CMV is commonly detected within transplanted kidneys from CMV positive donors (5,6) and replication of CMV within kidney grafts is associated with a poor clinical outcome (5,7). In addition, we showed that the deleterious effect of donor CMV positivity on kidney graft outcome was mainly observed in full-HLA-I mismatched kidney recipients and when a strong reduction of the CD8⁺ T-cell number occurred (4). More recently, we reported that a polymorphism in the programmed cell death one gene influenced the specific CMV immune response and the survival of CMV-infected grafts (8). Altogether, these data suggests that anti-CMV CD8 T cells have an important role to control CMV replication within kidney graft.

Effect of CMV-superinfection by kidney graft on CMV-specific T cell response is not yet well defined. In addition the role of CMV infected donor cells in the development of CMV immune response remains poorly understood. In this retrospective cross-section study performed in kidney transplant patients, we report that superinfection by CMV-infected grafts deeply affects the CMV-specific immune response. This effect required HLA I matching between donor and recipient. Finally, we bring some evidence that donor shared HLA-I is crucial to develop CMV-specific CD8 T cells.

Patients and methods

Patients

One hundred and fifteen kidney transplant recipients were enrolled among adults exposed to CMV (D⁺ and or R⁺) and remained at follow-up at the Tours University Hospital. Samples were obtained when CMV disease was not suspected, at least one year after transplantation.

Initial immunosuppression involved methylprednisolone, polyclonal antilymphocyte globulins (Thymoglobuline®) or basiliximab. The maintenance immunosuppressive regimen

was mycophenolate mofetil or enteric-coated mycophenolate sodium, cyclosporine, tacrolimus, mTOR inhibitors (sirolimus or everolimus) and prednisone as previously described (9).

The patients with the highest risk of CMV disease (D+R-) received prophylaxis with aciclovir or valaciclovir (1995–2003) or valganciclovir (2004–2015) for 3 or 6 months in absence of contraindication and severe adverse events. Patients with a lower risk of CMV disease (R+) received preemptive therapy until 2008. After 2009, all R+ recipients received prophylaxis with valganciclovir for 3 months, except to D-R+ receiving basiliximab. From 1995 to 2012, diagnosis of systemic CMV infection relied on pp65 CMV antigenemia, and thereafter was based on PCR in whole blood (Abbott® RealTime) with results calibrated according to WHO standards and expressed in log IU/ml. The threshold of detection of the assay was 1.79 log IU/mL. Antiviral drugs were used for asymptomatic patients with pp65 CMV antigenemia >50 stained neutrophils per milliliter or CMV load >4 log IU/mL, and when CMV viremia was associated with attributable symptoms (CMV syndrome or tissue-invasive disease) according to the American Society of Transplantation (10), irrespective of the level of CMV viremia.

Cell preparation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from whole blood by Ficoll Hypaque density-gradient centrifugation (Lymphoprep; AbCys) after obtaining informed signed consent. After two washes in RPMI-1640 medium, PBMCs were suspended in an equal volume of freezing medium containing inactivated 10% fetal calf serum (FCS) and 10% dimethyl sulfoxide. Duration of storage before thawing did not exceed two months. For thawing, cryotubes were placed in a 37°C water bath and then were washed twice in complete RPMI-1640 medium (93% RPMI-1640, 10% inactivated FCS, 1% L-glutamine and 1% Penicillin–Streptomycin) at room temperature. The cell were incubated overnight to check

recovery and viability (determined by acridine orange and ethidium bromide) before staining and functional assays.

Measurement of cytokine production after pp65 stimulation (ELISPOT)

Plates were coated with interferon- γ (IFN- γ ; Mabtech 3420-2APW-Human-IFN- γ ELISpot PRO kit), TNF- α (TNF- α ; Mabtech 3510-2AW-Plus-Human- TNF- α ELISpot PRO kit) or both IFN- γ and granzym B (Grz-B; Mabtech 3485-2AW-Plus-Human-Grz-B ELISpot Plus kit) for detecting anti-CMV plurifunctional T-cell, in order to test each response in duplicate. After one wash with phosphatebuffered saline (PBS; ref. 20452335), freshly or freeze-thawing isolated PBMCs from patients were incubated for 24h at 37°C with human-CMV pp65 peptide mix (15 μ mol/L, Peptivator CMV-pp65 130-093-438; Miltenyi Biotech) in 96-well plates (1.5.10⁵ PBMCs per well). We used an anti-CD3 antibody and medium alone as positive and negative control, respectively. Next, plates were washed twice with PBS and twice with PBS-0.05% Tween. Then, we added 80 μ L of biotinylated anti-IFN- γ , anti-TNF- α and anti-Grz-B at a 1:500, 1:250 and 1:1000 dilution, respectively. After a 30 minutes incubation at room temperature, plates were washed three times with PBS-0.05% Tween before an incubation with streptavidine-FITC solution at 1:1000 dilution for 30 minutes at room temperature. Finally, we washed plates twice with PBS-0.05% and twice with distilled water after last incubation with adequate substrate solutions (15 minutes for Grz-B and TNF- α and 5 minutes for IFN- γ). Analysis was by use of ImmunoSpot Counter (CTL-ImmunoSpot S6 FluoroSpot line, Cleveland, OH, USA). The numbers of spots was expressed per million PBMC or million of lymphocytes. Negative control wells were subtracted from the wells containing the stimulated responder cells.

Measurement of anti-pp65 CD8 T-cells (dextramer)

Number of CMV specific CD8 T-cells was determined in HLA-A2 KTR using PE-labeled dextramers (Immudex, Denmark) loaded with HLA-A*0201 immunogenic CMV pp65-derived peptide (amino acids 465-503, NLVPMVATV). A total of 150 000 PBMCs in 50 μ L of PBS were incubated with 10 μ L of dextramer for 10 minutes at room temperature into 96-well plates, according to manufacturer protocol. A dextramer loaded with an irrelevant peptide was used as negative control. A minimum of 150 000 cells were acquired with use of an FACSCanto (BD Biosciences) and proportion of positive cells was determined by use of Diva software (BD Biosciences). Number of cells staining with a dextramer loaded with an irrelevant peptide was subtracted.

Statistical analysis

Results are expressed as percentage or mean \pm SD for normally distributed variables and median and range (5th and 95th centiles) for non-normally distributed variables. Qualitative data were compared using chi-square. Quantitative data were compared using Mann–Whitney. We calculated the number of IFN- γ spots-number of CD8 T-cells slopes in D+R-, D+R+ and D-R+ using linear regressions. Statistical analyses were performed using XLSTAT 2016.4 (Addinsoft). A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Patients' characteristics

The characteristics of donors and recipients at the time of transplantation and at the 3-month visit are shown in Table 1 for all patients (n=115), D+R- (n=31), D+R+ (n=44) and D-R+ patients (n=40). The occurrence of CMV viremia tended to be more frequent in D+R- recipients, while it was very similar in D+R+ and D-R+ recipients. All D+R- recipients received prophylaxis (in comparison to D+R+ and D-R+, $p < 0.0001$). Otherwise, a prophylaxis was more often given in D+R+ than in D-R+ recipients (57% vs. 33%, $p = 0.025$). No other significant difference was observed (Table 1)

Table 1. Baseline characteristics

	All (n=115)	D+R- (n=31)	D+R+ (n=44)	D-R+ (n=40)	D+R- vs D+R+	D+R+ vs D-R+	D+R- vs D-R+
Donor characteristics							
Age (years)	57.3±15.7	54.2±17.3	59.6±15.3	57.1±14.7	0.218	0.262	0.536
Male sex (%)	57.5	54.8	51.1	60.0	0.749	0.411	0.909
Living (%)	95.8	0.0	6.7	5.0	0.266	1.000	0.501
Recipient characteristics							
Age (years)	53.9±14.7	50.4±15.6	55.8±13.9	54.4±14.4	0.140	0.333	0.311
Male sex (%)	59.2	67.7	62.2	52.5	0.621	0.365	0.195
Sensitized (%)	31.7	35.4	26.7	40.0	0.411	0.556	0.792
Graft characteristics at the time of transplantation							
First graft (%)	81.7	83.9	88.9	80.0	0.525	0.256	0.676
Preemptive transplantation (%)	13.3	9.7	11.1	20.0	1.000	0.256	0.327
HLA class AB mismatch	2.5±1.1	2.4±1.2	2.7±0.1	2.4±1.0	0.305	0.035	0.346
HLA class DR mismatch	1.0±0.7	1.0±0.8	1.0±0.7	1.0±0.6	0.674	0.380	0.870
DGF (%)	8.3	6.4	4.4	12.5	1.000	0.246	0.457
Cold ischemia (hours)	16.9±6.7	19.9±6.6	16.1±7.3	17.1±6.1	0.440	0.794	0.813
Initial immunosuppressive regimen							
Antihymocyte globulins (%)	45.0	35.5	55.6	37.5	0.085	0.096	0.861
Interleukine 2 receptor antagonists (%)	51.7	54.8	48.9	57.5	0.610	0.427	0.823
Cyclosporin (%)	22.5	25.8	28.9	15.0	0.768	0.125	0.256
Tacrolimus (%)	74.2	74.2	64.4	82.5	0.639	0.061	0.291
MMF or EC-MPS (%)	100.0	100.0	100.0	100.0	1.000	1.000	0.395
mTOR inhibitors (%)	5.0	3.2	8.9	2.5	0.643	0.364	1.000
Clinical and biochemical variables at 3 months							
Systolic arterial pressure (mmHg)	140±14	137±13	141±13	140±15	0.232	0.329	0.595
Diastolic arterial pressure (mmHg)	78±10	81±9	79±9	76±11	0.291	0.315	0.111
Serum creatinine level (µmol/L)	139±44	131±47	146±46	139±38	0.112	0.282	0.187
Proteinuria (g/day)	0.4±0.5	0.3±0.3	0.4±0.4	0.4±0.8	0.170	0.229	0.679
Events after transplantation							
BPAR (%)	24.2	19.4	28.9	22.5	1.000	0.502	0.747
CMV viremia	49.2	58.0	46.7	45.0	0.346	0.878	0.275
Interval transplantation-blood sampling (months)	59±42	70±53	57±36	50±32	0.329	0.199	0.282

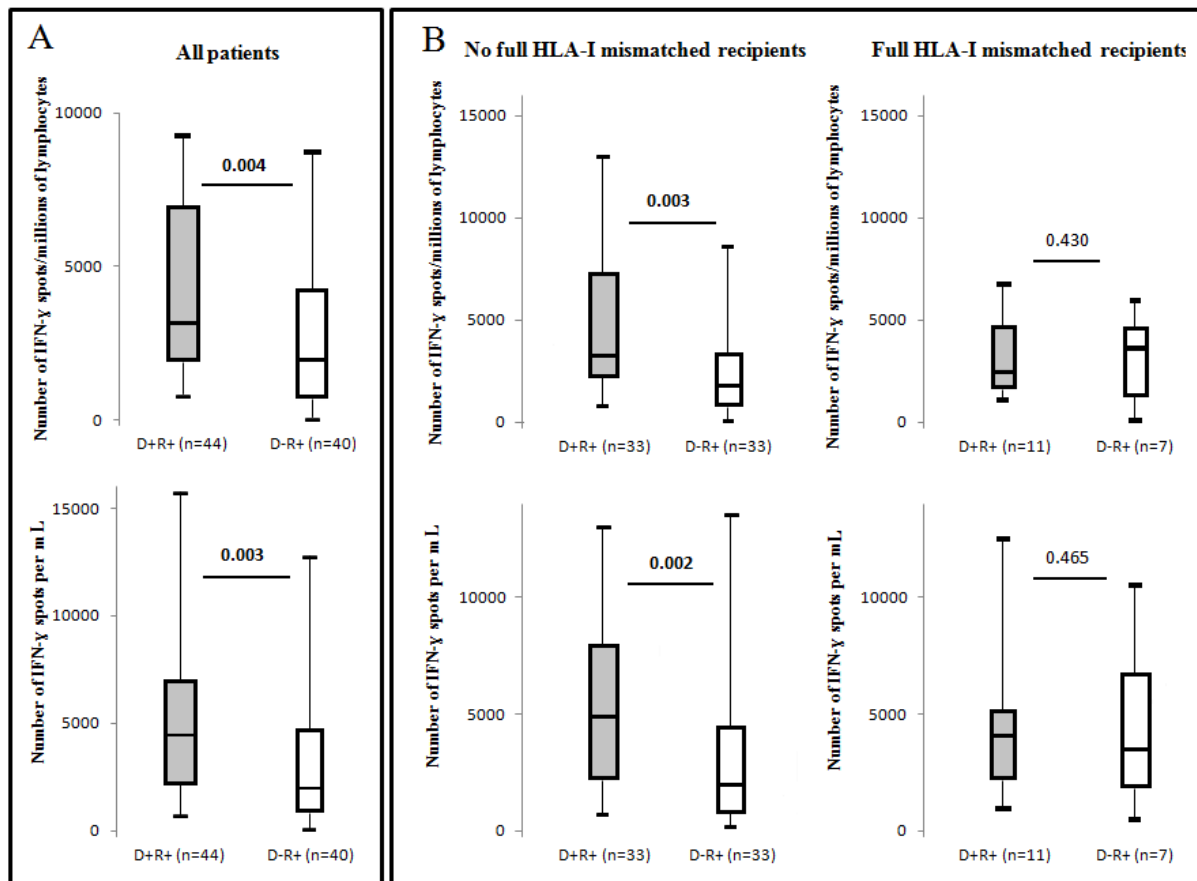
D+, CMV-positive donor; D- CMV-negative donor; R+, CMV-positive recipient; R-, CMV-negative recipient; HLA, human leukocyte antigen; DGF, Delayed graft function; BPAR, Biopsy-proven acute rejection; eGFR, estimated glomerular filtration rate

Superinfection by CMV-infected graft drives the expansion of pp65-responsive blood-borne T-cells.

We analyzed T-cell response to pp65 stimulation according to donor CMV serology in CMV-positive recipients (44 D+R+ and 40 D-R+ recipients). We observed that number of IFN- γ -producing cells was higher in D+R+ as compared to D-R+ recipients whether expressed per millions of T cells (3224 [850-9311] vs. 1983 [101-8785] spots/ 10^6 CD3+ cells, $p=0.004$) or per blood volume unit (4508 [743-15744] vs. 2069 [75-12782] spots/mL, $p=0.003$) (Figure 1, panel A). In a subgroup of 35 R+ recipients (20 D+R+ and 15 D-R+ recipients), we could also assessed the number of cells producing TNF- α , IFN- γ , Grz-B or both IFN- γ and GzB (the later being considered as polyfunctional T cells). Results were similar to those mentioned above with a higher number of cells producing IFN- γ in case of CMV-positive as compared to CMV-negative donors (4508 [0-15912] vs. 1025 [0-9320] spots/mL, $p=0.011$). Numbers of cells producing TNF- α , GzB or both IFN- γ and GzB were higher in D+R+ than in D-R+ recipients, although the difference did not reach statistical significance (5334 [0-16483] vs. 2896 [0-15370] spots/mL, $p=0.069$ for TNF- α ; 1376 [0-5297] vs. 579 [0-11468] spots/mL, $p=0.094$ for Grz-B; 705 [0-3385] vs. 101 [0-7216] spots/mL, $p=0.069$ for polyfunctional T cells). Results were similar if expressed per millions of T lymphocytes.

These results indicated that kidneys from CMV-infected as compared to non-CMV-infected donors triggered an expansion of pp65-responsive blood-borne memory CD8 T cells in CMV-seropositive recipients, suggesting that superinfection shaped specific immune CMV response.

Figure 1. Donor CMV positivity is associated with a stronger anti-CMV response in CMV positive recipients when at least one HLA-I identity is shared between donor and recipient



Panel A represents IFN- γ production in response to pp65 stimulation in 44 D+R+ and 40 D+R- recipients. Donor CMV positivity is associated with a stronger response. In panel B we have separated 66 recipients sharing at least one HLA-A or HLA-B identity with their donors ("No-Full HLA-I mismatched recipients") and 18 recipients full HLA-I mismatched with their donors. We observed that association between donor CMV positivity and IFN- γ production disappeared in Full HLA-I mismatched recipients and remained highly significant in no-Full HLA-I mismatched recipients.

Results are expressed as the number of spots per million of CD3^{pos} cells and per mL of whole blood. Horizontal bars represent the median value, the rectangular box connects the upper and lower quartiles and whiskers connect the 5th and 95th percentiles.

Expansion of pp65-responsive blood-borne T cells by CMV-infected graft requires HLA class I matching.

The above results raised the issue of how viral antigens brought by CMV-infected kidneys were presented to recipient memory CD8 T cells to drive their expansion in CMV-superinfected patients. Indeed, viral peptides issued from the CMV-infected transplants can be presented by either donor or recipient cells or possibly both. We decided to assess to which extent donor cells participated to this expansion of pp65-responsive blood T cells.

We should keep in mind that only recipient-derived antigen-presenting cells (APC) were present in our *in vitro* stimulation. Therefore this experimental design does not allow the detection of pp65-responsive T cells uniquely restricted by donor-specific HLA molecules. If expansion of blood borne pp65-specific CD8 T cells by CMV-infected graft was mainly driven through presentation by donor HLA molecules we should not be able to detect this expansion in case of fully HLA-AB mismatched combinations. Whereas in case of HLA-AB matched combinations we should be able to observe the expansion since shared HLA-AB expressed by recipient APCs should efficiently present and activate pp65-specific T cells. On the opposite hypothesis, i.e., if donor cells had not any role, the expansion of blood borne pp65-specific CD8⁺ T cells by CMV-infected graft should be observed even in fully HLA-AB mismatched combinations.

Several hypotheses can be raised to account for this expansion of circulating pp65-specific CD8 T cells induced by CMV superinfection. Firstly, frequent CMV reactivations within the graft may feed the recipient APCs with CMV peptides from infected kidneys in secondary lymphoid organs (SLOs) allowing presentation to memory CD8⁺ cells that will thereafter emigrate through the blood towards peripheral tissues, especially the graft. This will result in an increase in the number of circulating self HLA-restricted T cells specific for pp65 whatever the HLA-AB matching between recipient and donor (even in patients with fully

HLA-AB mismatched combinations). Alternatively, during CMV reactivations episodes, CMV-infected donor cells may directly present CMV antigens and drive CD8⁺ T cell proliferation. Then, a part of these cells may re-circulate into the blood and account for the higher number of blood pp65-specific T cells. According to this second hypothesis and in case of fully HLA-AB mismatched combinations, we should not expect any increase in the number of circulating pp65-specific CD8 T cells since cell cultures would be devoided of donor type HLA AB to insure an efficient presentation.

Therefore, we assessed the impact of donor CMV-positivity on anti-pp65 responses in fully HLA-I mismatched R⁺ recipients and in those sharing at least one HLA-I compatibility with their donors (Figure 1, panel B). We found that donor CMV positivity did not influence anti-CMV response in full HLA-I mismatched CMV positive recipients (2505 [1055-6818] vs. 3651 [143-5961] spots/10⁶ of CD3⁺ cells, p=0.430 and 4090 [962-12581] vs. 3468 [495-10621] spots/mL, p=0.465). In contrast, in HLA-I (partially) matched recipients, D+R⁺ recipients had a stronger anti-CMV response than D-R⁺ with regard to the number of IFN- γ -producing cells (3245 [824-12999] vs. 1791 [111-8614] spots/10⁶ CD3⁺ cells, p=0.003 and 4939 [710-12998] vs. 1987 [165-13550] spots/mL, p=0.002) (Figure 1, panel B).

This result was obtained in patients who already had CMVpp65-specific memory T cells before the transplantation, suggesting that presentation of CMV peptides by donor APCs was crucial to stimulate the expansion of pp65-specific memory CD8 T cells.

Donor-type HLA shaped CMV-specific immune response in CMV-naïve recipients.

Up to now, it is not known whether kidney allograft is capable of selectively expanding naive anti CMV CD8 T cells. In order to ensure that the CMV-specific T-cells we were analyzing have been developed from naïve cells, we studied patients who were primary infected through the transplant (D+R-). Then we counted pp65-specific T-cells restricted to HLA-A2 in

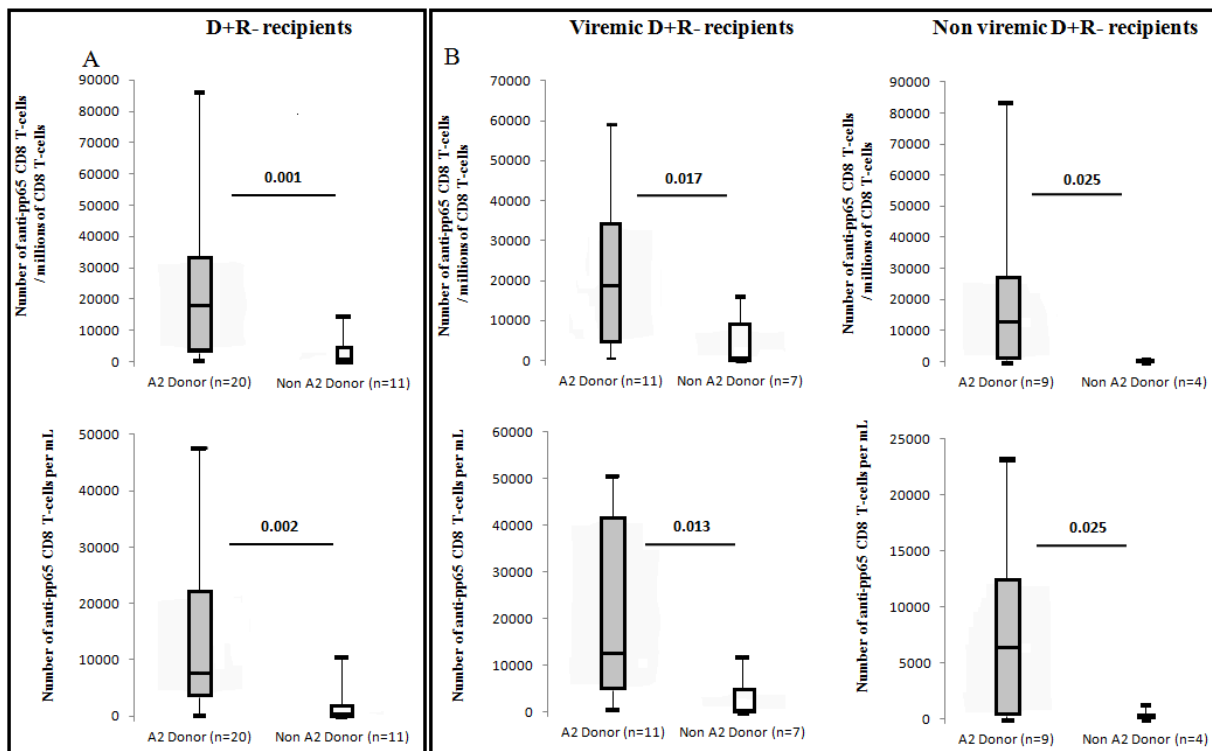
recipients expressing HLA-A2 in their SLOs but not in their graft epithelial cells (non-HLA-A2 expressing donors). In these patients, HLA-A2-restricted CD8 T cells generation relied only on presentation on self APC and not on donor cells. We then compared to recipients expressing HLA-A2 both in their SLOs and graft epithelial cells.

Thus, we compared the frequency of anti CMVpp65 CD8⁺-T cells restricted by HLA-A2 depending on whether the donor expressed or not HLA-A2 (Figure 2, panel A). We analyzed 31 D+R- recipients of HLA-A2 genotype, among which 11 had a donor who did not express HLA-A2 and 20 for which both donor and recipient expressed HLA-A2. Results showed that patients who received non-HLA-A2 expressing kidneys developed very few anti-CMVpp65 T-cells restricted by HLA-A2 as compared to those who received an HLA-A2 expressing kidney (300 [0-14638] vs 17,972 [222-85594] anti CMVpp65 CD8T-cells per millions of CD8 T-cells, p=0.001 and 213 [0-10688] vs. 7694 [84-47879] anti CMVpp65 CD8⁺ T-cells per mL, p=0.002). This indicates that presentation of CMV antigens to CD8 T-cells by HLA-A2-expressing recipient's APC either did not take place or was not efficient to drive the development of CMV-specific memory CD8⁺T cells if the kidney does not express HLA-A2 itself.

We next assessed the impact of donor HLA on the development of anti-CMV T-cell in viremic and non viremic patients. Indeed, we may hypothesize that in viremic patients, CMV antigens may disseminate and easily gain access to recipient APC within SLO and therefore these patients may more likely develop clones restricted by recipient-type HLA I. On the other hand CMV antigens may stay localized within the kidney in non-viremic patients and therefore CMV response would become highly dependent on *the presentation by* donor-type HLA. First, we observed that effect of donor HLA I on the development of CMV-specific CD8 T cells remained strong in viremic recipients (18785 [1019-59224] vs. 742 [1-16237] anti CMVpp65 CD8T-cells per millions of CD8 T-cells, p=0.017 and 12680 [599-50728] vs.

539 [1-12013] anti CMVpp65 CD8T-cells per mL, $p=0.013$). Of note, non-viremic recipients had a much higher number of anti CMVpp65 CD8+-T cells if donor expressed A2 (13000 [213-83653] vs. 30 [0-1369] anti CMVpp65 CD8T-cells per millions of CD8 T-cells, $p=0.025$ and 6405 [54-23336] vs. 8 [213-1186] anti CMVpp65 CD8T-cells per mL, $p=0.025$). This suggests that CMV-peptide presentation on donor cells was crucial to generate anti CMV CD8 T cell response in both viremic and non-viremic patients.

Figure 2. Donor HLA I within the graft plays an important role to shape CMV-specific immune response



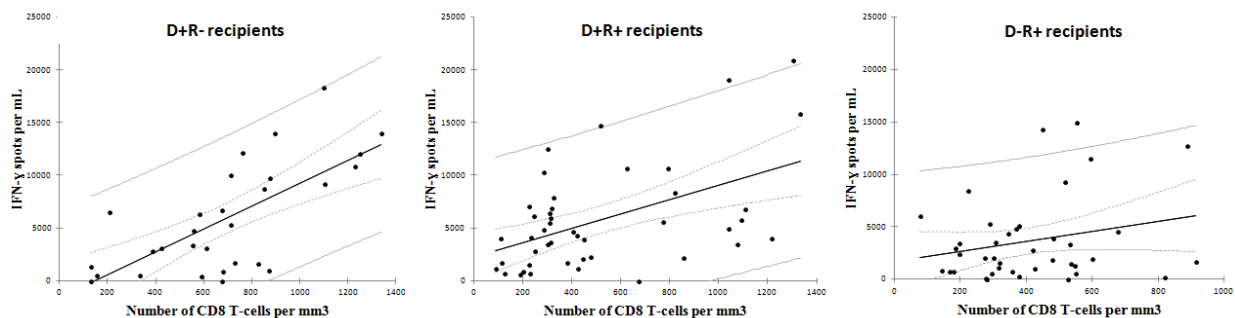
Panel A represents number of anti-CMVpp65 CD8 T cells restricted to HLA A2 in 31 D+R- recipients according to HLA A2 expression in donor. Donor A2 positivity is associated with a stronger increase of number of anti-CMVpp65 CD8 T cells antipp65 as compared to donor who did not expressed HLA A2. In panel B we have separated according to occurrence of CMV viremia during the first year post transplantation. We observed that influence of donor HLA remained irrespective of history of CMV viremia.

Results are expressed as the number of anti-CMVpp65 CD8 T cells restricted to HLA A2 per million of CD8 T cells and per mL of whole blood. Horizontal bars represent the median value, the rectangular box connects the upper and lower quartiles and whiskers connect the 5th and 95th percentiles.

Close correlation between CMV-specific immune response and size of blood-borne CD8 T cell pool in recipients of CMV-infected grafts.

Because a large proportion of CD8 T-cell repertoire is devoted to struggle against CMV (10,11), we assessed whether CMV-infected grafts could expand the size of **blood-borne CD8 T cell** compartment. For this purpose, we assessed the relationship between the number of circulating CD8+ T-cell and the CMV-specific immune response in recipients having received a D+ kidney (D+R- and D+R+) as compared to D-R+ recipients. We observed a positive correlation in 29 D+R- recipients ($R=0.697$, $p<0.0001$) and in 44 D+R+ recipients ($R=0.502$, $p=0.001$), while no significant correlation was observed in 40 D-R+ recipients ($R=0.237$, $R=0.141$). CMV response is a major determinant of the size of the blood-borne CD8 T cell compartment in D+ recipients and not in D-R+ suggesting that CMV-infected grafts drove the size of circulating CD8 T-cell pool as a whole.

Figure 3. CMV drives the size of the CD8 circulating T cells in D+ but D- recipients.



Relationship between number of CD8 T-cells and number of cells-producing IFN γ in response to pp65 stimulation in 29 D+R- recipients (left), 44 D+R+ recipients (middle) and 40 D-R+ recipients (right). We observed a positive correlation in D+R- ($R=0.697$, $p<0.0001$) and in D+R+ recipients ($R=0.502$, $p=0.001$) but not in D-R+ ($R=0.237$, $R=0.141$).

Discussion

Impact of donor CMV infection on posttransplant specific immune response CMV, especially on anti-CMV CD8 T cells, and even involvement of CMV replication, have seldom been studied. Based on D+R+ kidney transplantation experiments, it has initially suggested that a large proportion of CMV infections originated from recipient (13,14). However, it has later been discovered a dominant MCMV resistance trait expressed by the C57BL/6 using as recipient in these studies and therefore limiting scope of these results (15). In contrast, it has been reported in human kidney transplant recipients that seropositive recipients can be reinfected by a new CMV strain from the donor after transplantation (16). Our result indicate that donor CMV infection drive specific CMV immune response and therefore suggest that donor CMV reactivates after transplantation and subsequently stimulate anti-CMV lymphocyte in recipient. Moreover, because size of viral inoculum is correlated with amplitude of T cell response, effect of donor CMV infection on CMV specific response bodes that CMV reactivations in donor cells are frequent and significant (17).

The relative weight of donor and recipient CMV presentation on the magnitude of CMV immune response after transplantation is unknown. A study has shown that CMV specific CD8 T cells response is prominent as compared to CD4 T cell. Shabir *et al.* has reported that specific donor HLA-I has not any role in generation of CMV specific CD8 T cells after kidney transplantation (6). Indeed, only CMV CD8 T cells restricted to recipient HLA-I were identified and no recipients mounted responses to CMV presented by donor specific HLA. This result could underlining importance of recipient APC to generate However, role of HLA-I identities shared between donor and recipient has not been assessed and therefore it cannot be excluded that presentation of CMV peptide by donor cells activate specific CD8 T cell. Measuring involvement of shared HLA-I is a hard task. Here we report that expansion of blood-borne cytokines producing pp65-specific T cells following transplantation with a

kidney from a CMV-infected donor required the presence of shared HLA-I between donor and recipient. However, shared HLA-I are expressed in both recipient SLOs and organ donor cells. Based on results obtained in HLA-A2 expressing D+R- recipients, in whom anti-CMV CD8 T cells were much more developing while graft (donor) also expressed HLA-A2. For the first time it can be assure that shared HLA-I on donor cells is the main contributor of CMV specific CD8 T cell response and that kidney graft should be considered as a CMV presenting organ.

It would be interesting to know more accurately what kinds of donor cells are implied to activate circulating CMV specific CD8 T cells. Indeed donor presenting cells could be either kidney cells, such as endothelial cells, fibroblast and tubular cells, or donor passenger leucocytes. As detailed in a recent extensive review, it is currently considered that non-haematopoietic cells memory CD8 support T cell inflation, in a HLA-I dependent manner (18). This assumption relied on experimental data collected in mice infected by MCMV, which induced a large and sustained expansion of virus-specific CD8 in the blood. Indeed, it has been reported that infected non-haematopoietic cells in lymph nodes restimulate central memory CD8 T cells, which supplies blood-borne effector memory CD8 cells pool (19). Because unlike presence of long life donor non-haematopoietic cells in SLOs, we can sensibly hypothesize that donor non-professional APCs promoting CD8 T cell inflation in kidney transplant recipient are inside kidney. In mouse, infected endothelial cells could also participate to inflation of MCMV-specific memory CD8 T cell pool because this latter was not fully prevent after inhibition of T cell egress from SLOs (20). Since memory effector and resident memory CD8 T cell are not thought to be a source of inflated CD8 T cell population, it may be suppose that infected graft vasculature expressing shared HLA-I directly stimulates effector memory T-cells.

How the blood-borne CMV-specific CD8 T cells participate to control of CMV replication inside graft remains disputed. It is an important point because we and others have reported that donor CMV infection has been associated with a poor graft outcome (4,21,22), while few studies have shown that CMV replication within kidney graft would promote chronic allograft dysfunction (5,7). Lin *et al* have recently classified organs accordingly to their accessibility to CD8 T cell (23). They considered kidney as permissive organ, meaning that it can recruit CD8 T cells even in absence of inflammatory conditions in order to quickly and efficiently control CMV reactivation along tissue-resident memory T cells. Interestingly, we have reported that kidney transplant recipients carrying genetic variant in PDCD1 gene had a higher number of IFN- γ producing CMV-specific T cells than wild-type homozygous and a better kidney graft survival. This report, replicated in lung transplant recipients, might indirectly suggest that CMV specific T cell response is a reflect of ability to control graft damages associated with donor CMV infection.

In conclusion, we bring for the first time valuable evidences that CMV-infected donor cells directly drives inflation of memory CMV specific CD8 T cells in kidney transplant recipients.

References.

1. Staras SAS, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2006 Nov 1;43(9):1143–51.
2. Lopo S, Vinagre E, Palminha P, Paixao MT, Nogueira P, Freitas MG. Seroprevalence to cytomegalovirus in the Portuguese population, 2002-2003. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2011;16(25).
3. Crough T, Khanna R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Jan 1;22(1):76–98.
4. Gatault P, Halimi J-M, Forconi C, Thibault G, Barbet C, Mérieau 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 Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2013 Aug;13(8):2119–29.
5. Helanterä I, Koskinen P, Finne P, Loginov R, Kyllönen L, Salmela K, et al. Persistent cytomegalovirus infection in kidney allografts is associated with inferior graft function and survival. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2006 Nov;19(11):893–900.
6. 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 Oct 1;24(10):1698–708.
7. Dzabic M, Rahbar A, Yaiw K-C, Naghibi M, Religa P, Fellstrom B, et al. Intragraft Cytomegalovirus Protein Expression Is Associated With Reduced Renal Allograft Survival. *Clin Infect Dis*. 2011 Nov 15;53(10):969–76.
8. Forconi C, Gatault P, Miquelestorena-Standley E, Noble J, Al-Hajj S, Guillemain R, et al. Polymorphism in programmed cell death 1 gene is strongly associated with lung and kidney allograft survival in recipients from CMV-positive donors. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2016 Aug 26;
9. Roland M, Gatault P, Al-Najjar A, Doute C, Barbet C, Chatelet V, 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 Aug;8(8):1719–28.
10. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Åsberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-Organ Transplantation: *Transplant J*. 2013 Aug;96(4):333–60.
11. Khan N, Hislop A, Gudgeon N, Cobbold M, Khanna R, Nayak L, et al. Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Dec 15;173(12):7481–9.
12. 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 Sep 5;202(5):673–85.

13. Klotman ME, Starnes D, Hamilton JD. The source of murine cytomegalovirus in mice receiving kidney allografts. *J Infect Dis.* 1985 Dec;152(6):1192–6.
14. Klotman ME, Henry SC, Hamilton JD. Determinants of the source of cytomegalovirus in murine renal allograft recipients. *Transplantation.* 1987 Nov;44(5):636–9.
15. Scalzo AA, Fitzgerald NA, Simmons A, La Vista AB, Shellam GR. Cmv-1, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J Exp Med.* 1990 May 1;171(5):1469–83.
16. Chou S. Acquisition of Donor Strains of Cytomegalovirus by Renal-Transplant Recipients. *N Engl J Med.* 1986 May 29;314(22):1418–23.
17. Redeker A, Welten SPM, Arens R. Viral inoculum dose impacts memory T-cell inflation: Cellular immune response. *Eur J Immunol.* 2014 Apr;44(4):1046–57.
18. Klenerman P, Oxenius A. T cell responses to cytomegalovirus. *Nat Rev Immunol.* 2016 Apr 25;16(6):367–77.
19. Torti N, Walton SM, Brocker T, Rüllicke T, Oxenius A. Non-Hematopoietic Cells in Lymph Nodes Drive Memory CD8 T Cell Inflation during Murine Cytomegalovirus Infection. Hill AB, editor. *PLoS Pathog.* 2011 Oct 27;7(10):e1002313.
20. Smith CJ, Turula H, Snyder CM. Systemic Hematogenous Maintenance of Memory Inflation by MCMV Infection. Benedict CA, editor. *PLoS Pathog.* 2014 Jul 3;10(7):e1004233.
21. 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 Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2003 Apr;3(4):445–51.
22. Van Ree RM, de Vries APJ, Zelle DM, de Vries LV, Oterdoom LH, Gans ROB, et al. Latent cytomegalovirus infection is an independent risk factor for late graft failure in renal transplant recipients. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2011 Nov;17(11):CR609–617.
23. Shin H, Iwasaki A. Tissue-resident memory T cells. *Immunol Rev.* 2013 Sep;255(1):165–81.

C. Troisième article: "Polymorphism in programmed cell death 1 gene is strongly associated with lung and kidney allograft survival in recipients from CMV-positive donors." (J Heart Lung Transplant 2016, published on line, in press)

Dans les deux premiers articles de cette thèse nous décrivons respectivement des "effet D+" sur la survie des greffons et la réponse immunitaire spécifique anti-CMV. Ces effets D+ sont influencés par l'appariement HLA de classe I entre le donneur et le receveur, qui conditionne la présentation des peptides viraux par les cellules du donneur aux LT CD8 spécifiques du CMV. Ces résultats justifient de rechercher d'autres paramètres de la réponse immunitaire anti-CMV, en particulier CD8, qui pourraient influencer la survie des greffons D+.

Dans le troisième article de cette thèse, nous rapportons l'impact d'un polymorphisme génétique de type SNP (pour Single Nucleotide Polymorphism) localisé dans le gène *PDCDI* codant pour PD-1, qui comme nous l'avons précédemment détaillé, est un des récepteurs inhibiteurs surexprimé sur les LT CD8 épuisés dans les infections virales chroniques. Ce polymorphisme a été sélectionné car il a précédemment été rapporté qu'il était fonctionnel et qu'il était associé à la survenue de pathologies auto-immunes. Nous montrons que dans une première cohorte de patients transplantés rénaux recevant un rein d'un donneur séropositif pour le CMV, la présence de l'allèle variant A, associée dans la littérature à une plus forte activité lymphocytaire, était associée à une meilleure survie des greffons. Une seconde étude, réalisée chez des patients ayant reçu une transplantation pulmonaire dans plusieurs centres français a retrouvé un résultat similaire, avec des arguments spirométriques en faveur d'un effet protecteur vis à vis du risque de développer une bronchiolite oblitérante. De plus, nous avons montré que les patients transplantés rénaux AA avaient un plus grand nombre de lymphocytes anti-CMV producteurs d'IFN- γ que les receveurs GG.

L'ensemble des résultats sont détaillés dans l'article ci-après intitulé "Polymorphism in programmed cell death 1 gene is strongly associated with lung and kidney allograft survival in recipients from CMV-positive donors."

ORIGINAL CLINICAL SCIENCE

Polymorphism in programmed cell death 1 gene is strongly associated with lung and kidney allograft survival in recipients from CMV-positive donors

Catherine Forconi, PhD,^{a,1} Philippe Gatault, MD,^{a,b,c,1}
Elodie Miquelestorena-Standley,^a Johan Noble, MD,^{a,b} Sally Al-Hajj,^a
Romain Guillemain, MD, PhD,^d Marc Stern, MD, PhD,^e Thomas Hoffmann, PhD,^a
Louis Prat, MD,^{a,b} Caroline Suberbielle, MD, PhD,^f Emeline Masson, MD, PhD,^f
Anne Cesbron-Gautier, MD, PhD,^g Catherine Gaudy-Graffin, MD, PhD,^{h,i}
Alain Goudeau, MD, PhD,^{h,i} Gilles Thibault, MD, PhD,^{c,j} Fabrice Ivanès, MD, PhD,^a
Roseline Guibon,^a Ihab Kzama, PhD,^a Yvon Lebranchu, MD, PhD,^{a,b}
Matthias Büchler, MD, PhD,^{a,b} Antoine Magnan, MD, PhD,^k
Jean-Michel Halimi, MD, PhD,^{a,b} and Christophe Baron, MD, PhD^a

From the ^aEA4245 Cellules Dendritiques, Immunomodulation et Greffes, Université François-Rabelais, Tours; ^bService de Néphrologie et Immunologie Clinique, CHRU Tours, Tours; ^cLaboratory of Immunology, CHRU Tours, Tours; ^dDepartment of Thoracic Surgery and Lung Transplant, HEGP Hospital, Paris; ^ePneumology and Lung Transplant Unit, FOCH Hospital, Suresnes; ^fLaboratory of Immunology and Histocompatibility, Saint-Louis Hospital, APHP, Paris; ^gLaboratory of Histocompatibility, National Blood Bank, Nantes; ^hLaboratory of Bacteriology and Virology, CHRU de Tours, Tours; ⁱINSERM U966, Tours University, Tours; ^jCNRS UMR 7292, Genetics, Immunotherapy, Chemistry and Cancer, Tours University, Tours; and the ^kINSERM UMR 915, Institut du Thorax, IRT-UN, Nantes, France.

KEYWORDS:

cytomegalovirus;
kidney transplantation;
lung transplantation;
programmed cell
death 1;
polymorphism;
graft survival;
clonal exhaustion

BACKGROUND: Cytomegalovirus (CMV) has a role in chronic rejection and graft loss in kidney transplant (KTx) and lung transplant (LTx) recipients. In addition, donor CMV seropositivity is an independent risk factor for renal graft loss. The anti-CMV response might modulate this risk. Expression of programmed cell death 1 (PD-1), a receptor involved in viral-specific T-cell exhaustion, is influenced by a single nucleotide polymorphism called PD-1.3 (wild-type allele G, variant allele A).

METHODS: We performed a retrospective study to assess the impact of PD-1.3 on graft outcome in donor CMV seropositive (D+) and donor CMV seronegative (D-) KTx and LTx. We also performed a case-control study to evaluate the anti-CMVpp65 response according to genotype.

RESULTS: PD-1.3 was determined in 1,119 KTx and 181 LTx. In 481 D+ KTx, A allele carriers (24%) experienced significantly less graft failure compared with GG carriers ($p = 0.001$). Multivariate analysis showed that this association was independent of donor and recipient age, acute rejection episodes, and number of human leukocyte antigen mismatches (hazard ratio, 0.381; 95% confidence interval, 0.209–0.696; $p = 0.002$). Analysis in 85 D+ LTx showed similar results: A allele carriers had better

¹These authors have contributed equally to this work.

Reprint requests: Philippe Gatault, MD, EA-4245 Dendritic Cells, Immunomodulation and Grafts, Université François-Rabelais, 10 Boulevard Tonnelle, Tours 37032, France. Telephone: +33 (0) 2 47 36 61 22. Fax: +33 (0) 2 47 47 89 01.

E-mail address: philippe.gatault@univ-tours.fr

Cytomegalovirus (CMV), a herpesvirus, infects 50%–90% of adults in the United States and Europe.^{1,2} The virus establishes lifelong infection characterized by phases of latency punctuated by periodic reactivations.^{3,4} In animal models, the alloimmune response triggers productive replication of the virus within transplanted organs, which induces local inflammation, prevents graft acceptance, and eventually promotes chronic rejection.^{5–7} Moreover, several human studies have suggested that CMV infection may also prime kidney and lung allografts for rejection^{8–10} and favor development of chronic damage, such as vascular lesions and interstitial fibrosis/tubular atrophy in kidney grafts.^{11–13}

The role of CMV in lung transplantation (LTx) has been highlighted by several authors who reported that CMV viremia and CMV pneumonitis increased the risk of bronchiolitis obliterans syndrome.^{14–17} These long-term effects of CMV are of concern, as bronchiolitis obliterans syndrome is the leading cause of death after the first post-transplant year, and the incidence has been stable in recent decades.¹⁸ In kidney transplantation (KTx), it is now well established that active CMV replication is frequently present in grafts,^{11,19} especially in donor CMV seropositive (D+) KTx.²⁰ Although persistent active intragraft CMV replication has been associated with decreased graft survival,^{21,22} we and others have reported that CMV seropositivity of the donor is an independent risk factor for kidney graft failure.^{23,24} We showed that the deleterious impact of D+ KTx was strongest in the case of full human leukocyte antigen (HLA) class I mismatch,²³ possibly because the donor's kidney epithelial cells were poorly accessible to the recipient's CMV-specific CD8⁺ T cells, as suggested by another group,²⁰ emphasizing the role of the anti-CMV cytotoxic T-cell response. Progressive dysfunction of the T-cell response is known to be a key element in the course of chronic viral infections such as human immunodeficiency virus and hepatitis C virus.²⁵ Similarly, the persistence of CMV increases the number of dysfunctional CMV-specific T cells over time^{26–29} that are continuously driven to exhaustion,^{28,30} eventually causing their elimination by apoptosis.³⁰ Programmed cell death 1 (PD-1) has been revealed to be a crucial player in the dysfunction of human immunodeficiency virus-specific T cells^{31–33} and possibly of human CMV-specific CD8⁺ T cells.³⁰ Moreover, PD-1 has been found to be involved in the clinical control of CMV infections after KTx and LTx.^{34,35}

An intronic single nucleotide polymorphism (SNP) termed “PD-1.3 SNP” (G to A substitution; rs1568821) in *PDCDI* (minor allele frequency in European populations,

approximately 13%³⁶) disrupts the binding of transcription factor Runx1 and is associated with reduced transcriptional activity of the gene and decreased inhibition of T cells.^{37–39} This SNP has been reported to be associated with several autoimmune diseases.^{38–41} Therefore, we investigated whether this SNP had an impact on graft survival of KTx and LTx in recipients of D+ organs. In addition, we performed an in vitro pilot study to assess the effects of PD1.3 SNP on the anti-CMV T-cell response.

Methods

Patients and study design

DNA samples from patients undergoing KTx and LTx were obtained after receiving informed signed consent. Ethics committee approval was granted for collection of DNA samples and the study by the Comité de Protection des Personnes Tours-Région Centre Ouest 1 (DC 2013-1780).

The study included patients who underwent KTx between 1985 and 2008 in Tours, France. The following variables were recorded for KTx recipients: type of donor (living or deceased), CMV serology, age and sex of recipient and donor, cause of renal disease, graft rank, number of HLA class I (HLA-A, HLA-B) and class II (HLA-DR) mismatches, immunosuppressive treatments, cold ischemia time, delayed graft function (dialysis during the first week after transplantation), CMV antigenemia, and acute rejection.

Among the 1,280 transplantations performed during the study period, there were 561 D+ and 719 donor CMV seronegative (D–) recipients. DNA samples were available for 486 D+ patients (D+R+, *n* = 253; D+R–, *n* = 233) and for 633 D– patients (D–R+, *n* = 328; D–R–, *n* = 305). Data for patients at high risk for post-transplantation CMV (i.e., patients who received a KTx from a CMV-infected donor [D+]) and patients at low risk (i.e., patients who received a KTx from a CMV-negative donor [D–]) were analyzed separately. All D+R– KTx recipients were given prophylaxis in the form of a weekly infusion of immunoglobulin therapy for 1 month (period 1985–1994) and aciclovir or valganciclovir (period 1995–2003) or valganciclovir (period 2004–2008) for 3 months. Patients with a lower risk of CMV disease (pre-transplantation CMV-positive recipients [R+]) received pre-emptive therapy. Diagnosis of CMV infection was based on CMV culture from 1984 to 1994 and subsequently on antigenemia tests (number of stained polynuclear cells/2.10⁵ leukocytes), as previously described.²⁰ Weekly CMV antigenemia tests were performed for 6 months after transplantation. During the period 1996–1997, pp65 antigenemia was introduced, and mycophenolate mofetil and ganciclovir were introduced. Therefore, we analyzed data from 1985 to 1995 (*n* = 116 D+, *n* = 176 D–) and from 1996 to 2008 (*n* = 370 D+, *n* = 457 D–) separately.

We then assessed the impact of PD1.3 SNP in patients who underwent LTx, in whom it is known that CMV has a more significant impact on survival compared with patients who undergo KTx.^{17,42} Moreover, we expected a greater number of graft losses than in KTx recipients. Given the strength of the association found in D+ KTx recipients, and assuming a similar hazard ratio (HR), we calculated that we would achieve sufficient power with analysis of 90 LTx from D+ recipients (power of 80%, type 1 error of 5%). Therefore, we established a multicenter study of 181 patients ($n = 85$ D+ and $n = 96$ D-) who underwent LTx during the period 2000–2009 at 3 different centers in France (HEGP, Paris; FOCH Hospital, Suresnes; and Nantes Hospital). CMV prophylaxis strategies were less heterogeneous than in KTx recipients; all patients with a risk of CMV infection (D+ and/or R+) received intravenous ganciclovir within a few days after transplantation and were switched to valganciclovir adjusted to renal function as soon as oral medication was tolerated. The following variables were recorded for LTx: CMV serology, age and sex of recipient, graft rank, cause of lung disease, types of organs transplanted, immunosuppressive treatments, and forced expiratory volume (FEV).

PD-1.3 genotyping

Patients underwent genotyping for the PD-1.3 SNP (rs11568821) by oligonucleotide ligation assay⁴³ blind to clinical data. Polymerase chain reaction was performed with the following specific primers: forward (5'CCAGGCAGCAACCTCAATC3') and reverse (5'GTCCCCCTCTGAAATGTCC3'). The polymerase chain reaction product was then split into 2 ligation solutions containing a "trap probe" specific for the wild-type allele (5'CGGTCGACGA GCTGCCGCGCAAGATGCACCCCGAGACC3') or the variant allele (5'CGGTCGACGAGCTGCC-GCGCAAGATGCAC CCCCAGACT3') and a fluorescein isothiocyanate -labeled reporting probe (5'GCAGGTGGGCTG3'). The trap probe was captured on fluorescent beads for analysis by flow cytometry (BD FACSCanto; BD Biosciences).

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

We included only patients with homozygous alleles (AA or GG) with a functioning graft at the time of analysis who were infected with CMV before transplantation (R+ recipients). Each patient with the variant allele (AA, case group) was matched with 2 GG allele carriers (control group). The matching criteria were serologic CMV status of donor, anti-globulin at time of transplantation, recipient age at transplantation (± 8 years), year of transplantation (± 5 years), treatment with calcineurin inhibitor at the time of blood sampling or no treatment with calcineurin inhibitor. Freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (10^5) from patients were incubated for 24 hours at 37°C with human CMV peptides (PepTivator CMV pp65; Miltenyi Biotech) in 96-well plates pre-coated with anti-interferon- γ antibody (3420-2APW-10 Human-IFN- γ ELISpot PRO kit; Mabtech). Analysis was done with an ImmunoSpot counter (CTL-ImmunoSpot S6 FluoroSpot Line; CTL, Shaker Heights, OH). The numbers of spots (per 1 million PBMCs) were compared for patients with AA and GG genotypes.

Statistical analysis

Qualitative data were compared using chi-square test, and quantitative data were compared using Mann-Whitney test. In

KTx recipients, the Kaplan-Meier method was used to estimate the uncensored graft survival (death or graft failure defined as end-stage renal disease requiring dialysis or transplantation), patient survival (end-stage renal disease was censored), and death-censored graft survival. In LTx recipients, we assessed uncensored graft survival and patient survival.

Log-rank tests were used to compare survival for carriers of GA or AA and GG alleles using univariate and multivariate Cox regressions. The results were expressed with HR, 95% confidence intervals (CI), and p values. We used Mann-Whitney tests to compare the number of interferon- γ -producing cells. Statistical analyses were performed using SAS version 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC), and $p < 0.05$ was considered significant.

Results

PD-1.3 SNP was strongly associated with kidney graft survival in D+ recipients, especially in D+R+ patients

The frequency of the A allele was 13.0% (with 847 GG patients, 252 heterozygous GA patients, and 20 AA patients). There was no evidence to support rejection of the assumption of Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). The demographic characteristics of patients with the A allele did not differ from the characteristics of wild-type homozygous patients (GG) whether in group D+ ($n = 486$) or D- ($n = 633$) (Table 1).

End-stage renal disease occurred in 107 D+ recipients and 112 D- recipients. During the study period, 103 patients died (38 D+ and 65 D-) (median follow-up time, 5.8 years; range, 0.0–23.8 years; 8,206 patient-years). The PD-1.3 SNP A allele (GA or AA) was significantly associated with better uncensored graft survival ($p = 0.006$) in the D+ group compared with the GG allele (Figure 1A). PD-1.3 SNP was significantly associated with death-censored graft survival ($p = 0.001$) but not with patient survival ($p = 0.748$). 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; $p = 0.0017$). The association was stronger in the D+R+ group than in the D+R- group (Figure 1B). In contrast, there was no significant association in the D- recipient group as a whole ($p = 0.486$) (Figure 1A) or in the D-R+ or D-R- subgroups ($p = 0.723$ and $p = 0.522$, respectively) (Figure 1B).

From 1985 to 1995 ($n = 116$ D+, $n = 176$ D-) and from 1996 to 2008 ($n = 370$ D+, $n = 457$ D-), risk of death-censored graft survival remained better in A carrier than in GG D+ recipients ($p = 0.014$ and $p = 0.022$, respectively) (Figure 2). Multivariate analysis demonstrated that the PD-1.3 SNP remained an independent risk factor in both periods (HR, 0.336; 95% CI, 0.132–0.851; $p = 0.021$ for 1985–1995 period and HR, 0.421; 95% CI, 0.190–0.934; $p = 0.033$ for 1996–2008 period). In addition, the difference between death-censored graft survival observed in D+ A carriers and GG patients during the first period (+4.8% at

Table 1 Demographic Characteristics of Patients From Tours, France, Who Underwent Kidney Transplantation Between 1985 and 2008

	D+ patients (n = 486)			D- patients (n = 633)		
	G/G (n = 371)	A carriers (n = 115)	p	G/G (n = 476)	A carriers (n = 157)	p
Demographic characteristics						
Mean donor age, 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, 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
Cause of renal disease						
Diabetes (%)	22 (6)	6 (5)	0.95	25 (5)	5 (3)	0.40
Glomerulonephritis (%)	57 (15)	16 (14)	0.82	58 (11)	12 (8)	0.27
Polycystic kidney disease (%)	68 (18)	25 (22)	0.50	67 (14)	37 (23)	0.01
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
Pre-transplantation CMV serology of recipient						
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
Graft characteristics						
Graft rank > 1 (%)	56 (15)	12 (10)	0.27	58 (12)	22 (14)	0.64
Mean cold ischemia time, hours	21 ± 9	21 ± 8	0.99	20 ± 8	21 ± 8	0.25
Mean HLA mismatches AB	2.7 ± 1	2.7 ± 1	0.58	2.7 ± 1	2.8 ± 1	0.29
Mean HLA mismatches DR	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
Treatments in first 3 months						
Anti-thymocyte globulins (%)	247 (67)	67 (59)	0.19	300 (63)	116 (74)	0.02
Anti-IL-2R (%)	110 (30)	35 (31)	0.92	143 (30)	35 (22)	0.07
Calcineurin inhibitors (%)	345 (93)	107 (93)	0.85	457 (96)	147 (94)	0.31
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

Data are shown as percentage or mean ± standard deviation (SD). Chi-square and Mann-Whitney tests were used to compare qualitative and quantitative data, respectively.

CMV, cytomegalovirus; D-, donor CMV seronegative; D+, donor CMV seropositive; HLA, human leukocyte antigen; IL-2R, interleukin-2 receptor; R-, recipient CMV seronegative; R+, recipient CMV seropositive.

5 years and +15.1% at 10 years) remained at least as great in the most recent transplantation period (+7.7% at 5 years and +18.2% at 10 years). Therefore, the association was strong and robust in D+ recipients regardless of the period of transplantation. The incidence of CMV viremia after 1995 in D+ recipients did not differ in relation to the PD-1.3 SNP (GG vs A carriers: 57.4% vs 55.3%, $p = 0.738$).

PD-1.3 SNP was strongly associated with survival in D+ LTx recipients

The frequency of the A allele was 13.7%, and Hardy-Weinberg equilibrium was respected ($p > 0.05$). The demographic characteristics of patients with the A allele did not differ from the characteristics of wild-type homozygous patients (GG) whether in the D+ or D- group (Table 2).

Death occurred in 101 patients, and retransplantation occurred in 4 patients (median follow-up time, 1.9 years; range, 0.0–15.4 years; 514 patient-years). In 85 D+ patients, uncensored graft survival and patient survival were significantly better for A carriers than for GG patients ($p = 0.004$ and $p = 0.006$, respectively). In D- patients,

survival did not differ according to genotype (Figure 3). 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; $p = 0.006$). Occurrence of CMV viremia (data available for 58 D+ patients) was not associated with PD-1.3 SNP (GG vs A carriers: 65% vs 73%, $p = 0.6$).

To assess more fully the effects of SNP on the function of the lung transplant itself, we also analyzed FEV. Of the 61 D+ patients still alive at 6 months post-transplantation, FEV was available in 47 (12 A carriers and 35 GG). A carriers had a significantly greater FEV at 6 months ($71\% \pm 17\%$ vs $54\% \pm 16\%$, $p = 0.001$). In contrast, FEV in D-R- patients was not statistically different in A carriers or GG (14 A carriers, $67\% \pm 26\%$; 46 GG, $63\% \pm 19\%$; $p = 0.29$).

AA homozygous patients had a greater number of CMV-responding T cells

To improve understanding of the above-mentioned clinical results, we assessed the CMV-specific immune response

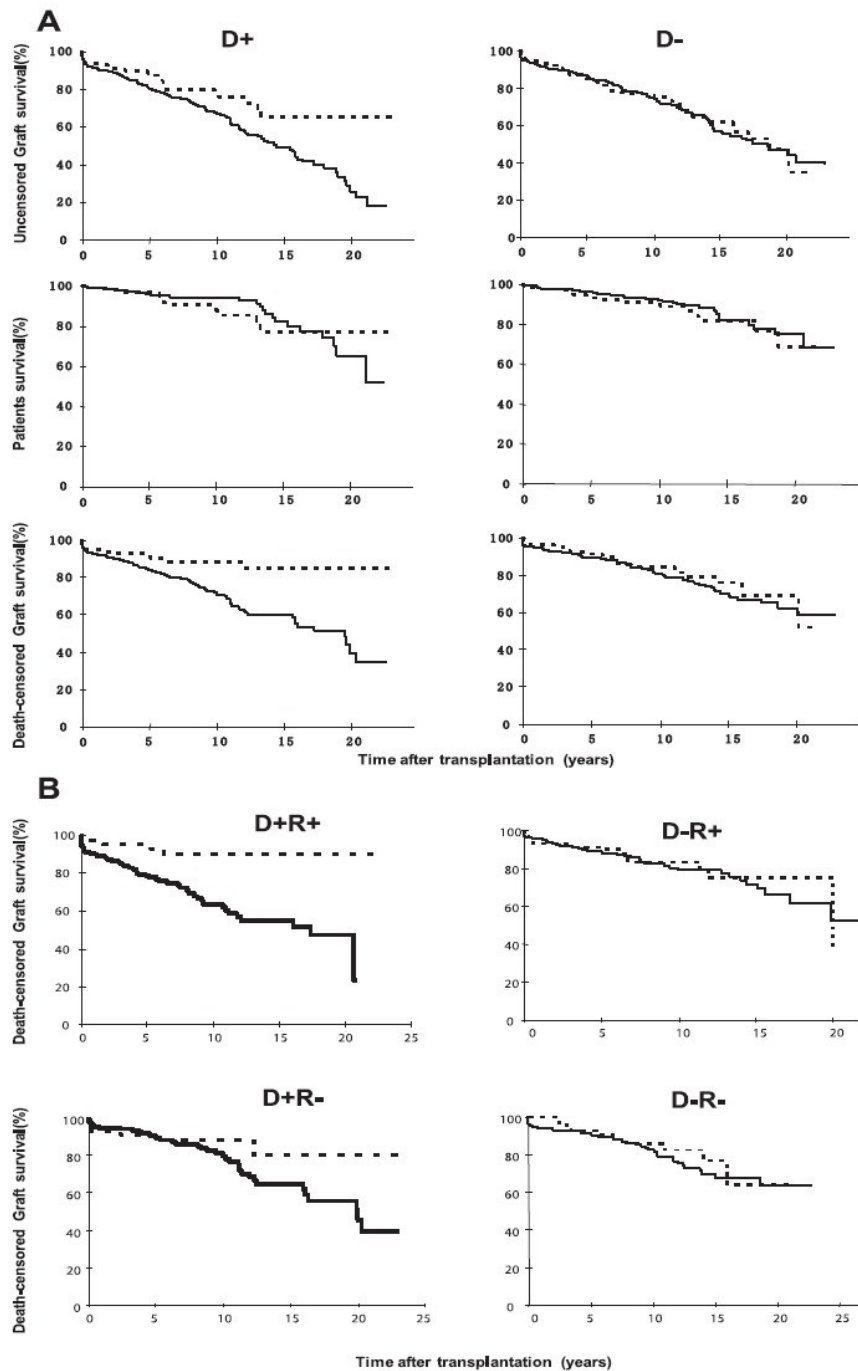


Figure 1 Variant A allele of the PD-1.3 SNP was strongly associated with graft survival in patients who received kidneys from CMV-infected donors. (A) Kaplan-Meier analyses of data for patients who received D+ KTx ($n = 486$) and D- KTx ($n = 633$). Uncensored graft survival, patient survival, and death-censored graft survival are shown in the upper, middle, and lower graphs. Bold lines represent GG allele carriers, and dashed lines represent A allele carriers (AA or GA). In D+ recipients, the presence of the A allele was associated with a better uncensored graft survival rate ($p = 0.006$) (upper left graph) and death-censored graft survival rate ($p = 0.001$) (lower left graph). In the D- group (right graphs), the SNP was not associated with uncensored graft survival, patient survival, or death-censored graft survival. (B) Variant A allele of PD-1.3 SNP is highly associated with death-censored kidney graft survival in D+R+ patients. Graphs represent death-censored graft survival by Kaplan-Meier analysis for the group indicated: D-R+ ($n = 328$, $p = 0.726$), D-R- ($n = 305$, $p = 0.723$), D+R+ ($n = 253$, $p = 0.001$), and D+R- ($n = 233$, $p = 0.145$).

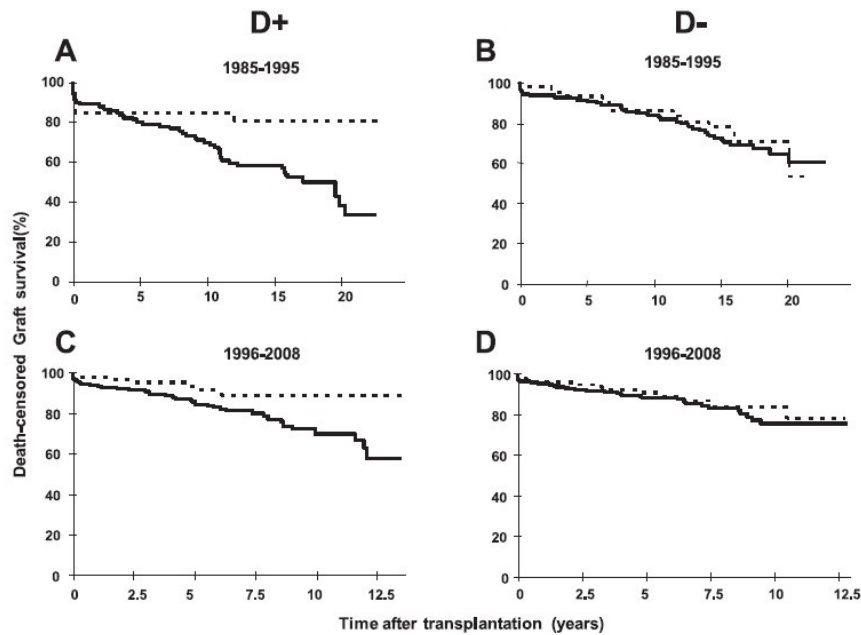


Figure 2 Variant A allele of PD-1.3 SNP was associated with kidney graft survival in D+ recipients regardless of period of transplantation. Upper graphs (A and B) represent death-censored graft survival by Kaplan-Meier analysis for transplantations performed between 1985 and 1995 [$n = 116$ (A); $n = 176$ (B)], and lower graphs (C and D) represent death-censored graft survival for transplantations performed between 1996 and 2008 [$n = 370$ (C); $n = 457$ (D)]. Bold lines represent GG allele carriers, and dashed lines represent A allele carriers (AA and GA). The presence of the A allele was associated with better graft survival in D+ recipients for both periods of transplantation [$p = 0.014$ (A) and $p = 0.022$ (B)]. In contrast, there was no association in D- recipients [$p = 0.696$ (B) and $p = 0.540$ (D)].

Table 2 Demographic Characteristics of Patients Who Underwent Lung Transplantation From 3 Hospitals in France

	D+ patients ($n = 85$)			D- patients ($n = 96$)		
	G/G ($n = 64$)	A carriers ($n = 21$)	p	G/G ($n = 75$)	A carriers ($n = 21$)	p
Demographic characteristics						
Mean donor age, years	45 ± 14	44 ± 16	0.95	37 ± 13	44 ± 15	0.09
Mean recipient age, years	36 ± 14	35 ± 13	0.75	36 ± 14	39 ± 15	0.75
Recipient male (%)	35 (54)	13 (59)	0.91	44 (58)	11 (52)	0.79
Graft rank > 1 (%)	3 (5)	0 (0)	0.57	0	1	0.22
Cause of lung disease						
Cystic fibrosis (%)	33 (52)	10 (45.5)	0.95	44 (58)	10 (48)	0.51
Emphysema (%)	9 (14)	4 (18)	0.84	15 (20)	6 (29)	0.58
Pulmonary fibrosis (%)	6 (9)	1 (4.5)	0.83	5 (7)	3 (14)	0.50
Other (%)	16 (25)	7 (32)	0.73	11 (15)	2 (9)	0.77
Pre-transplantation CMV serology of recipient						
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
Unknown (%)	2 (3)	0	0.98	3 (4)	0	0.82
Transplanted organ (%)						
Single lung (%)	14 (22)	4 (18)	0.76	12 (16)	7 (33)	0.14
Double lung (%)	40 (62)	15 (68)	0.19	52 (69)	12 (57)	0.43
Heart and lung (%)	1 (2)	1 (5)	0.98	4 (5.5)	1 (5)	0.65
Others (%)	9 (14)	2 (9)	0.82	7 (9.5)	1 (5)	0.82

Data are shown as percentage or mean \pm standard deviation (SD). Chi-square and Mann-Whitney tests were used to compare qualitative and quantitative data, respectively.

CMV, cytomegalovirus; D-, donor CMV seronegative; D+, donor CMV seropositive; R-, recipient CMV seronegative; R+, recipient CMV positive.

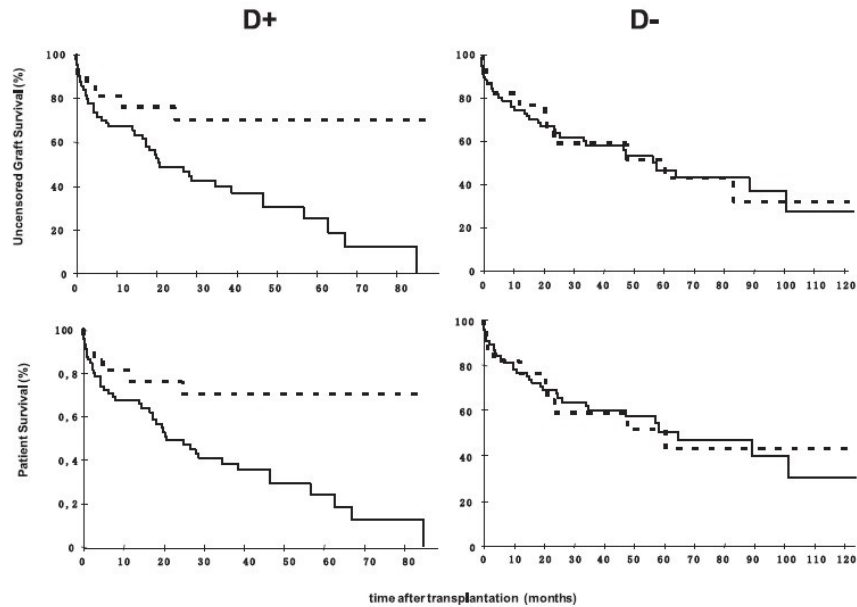


Figure 3 PD-1.3 SNP was highly associated with survival of recipients of D+ LTx. Kaplan-Meier analyses of data for patients who received D+ LTx ($n = 85$) and D- LTx ($n = 96$). Uncensored graft survival is shown in the upper graph, and patient survival is shown in the lower graph. Bold lines represent GG allele carriers, and dashed lines represent A allele carriers (AA or GA). In D+ LTx recipients, the presence of the A allele was associated with better uncensored graft survival ($p = 0.004$) and patient survival ($p = 0.006$). In the D- group (right graphs), the SNP did not affect uncensored graft survival or patient survival.

according to the PD-1.3 SNP assessing the number of IFN- γ -producing T cells responding to CMV-pp65 peptides in KTx recipients. We analyzed only homozygous patients (i.e., AA and GG). Because the duration of CMV infection might affect the accumulation of dysfunctional T cells, we expected that the strongest effect of the PD1 SNP (if any) would be observed in patients infected long before the time of analysis. Therefore, we analyzed the CMV immune response in patients infected before transplantation (i.e., long before the analysis took place). We performed individual matching on clinical variables likely to influence the anti-CMV immune response, as described in the Methods section. We included all R+ patients who were AA carriers and still being followed in our transplant center ($n = 7$); each AA patient was individually matched with 2 GG control patients. The clinical characteristics of each group are presented in Table 3. As shown in Figure 4, the number of IFN- γ -producing cells responding to pp65 peptides expressed per 10^6 PBMCs and per 10^6 lymphocytes was 2.6-fold and 4.2-fold higher for AA than matched GG carriers, respectively.

Discussion

We previously reported that CMV infection in kidney graft donors was associated with reduced graft survival.²³ However, the risk factors for graft loss in these patients are largely unknown. The present study reports a strong and robust association between a SNP in the programmed cell death 1 gene *PDCD1* (involved in viral-induced T-cell exhaustion) and graft survival in patients who had received

either KTx or LTx from CMV-infected donors, whereas there was no association in D- patients. The HRs were very similar in both KTx and LTx recipients. Obtained in 2 different organ settings, these results not only strongly support this clinical association but also indicate a non-organ-specific mechanism. Our case-control study found a stronger T-cell response to CMV in AA patients. Therefore, these results were compatible with lower PD-1 activity in CMV-specific CD8⁺ T cells from A carrier patients, which is in agreement with another study that reported defective PD-1-mediated inhibition of IFN- γ production in PBMCs of AA patients.³⁷ Although disruption of the binding site of runx1 transcription factor caused by the PD1.3 SNP has been described,³⁹ the exact mechanisms underlying the association of the SNP with CMV-specific T-cell dysfunction are uncertain. However, our results are in accordance with a more exhausted phenotype in blood CMV-specific T cells in GG patients. A study in mice demonstrated that tissue-resident viral-specific T cells were more prone to clonal exhaustion than circulating blood T cells.⁴⁴ Thus, we may speculate that graft-resident CMV-specific T cells of GG recipients may be more exhausted and have a poorer ability to control CMV reactivation within transplanted organs.

Our findings should encourage the design of studies aiming to individually tailor CMV prevention strategies to limit the indirect sequelae of CMV. Opelz and Döhler⁴⁵ more recently reported that CMV prevention improved death-censored graft survival in D+R+ and D+R- patients but not in D-R+ patients. In agreement with this study, Kliem et al⁴⁶ showed that 4-year graft survival was

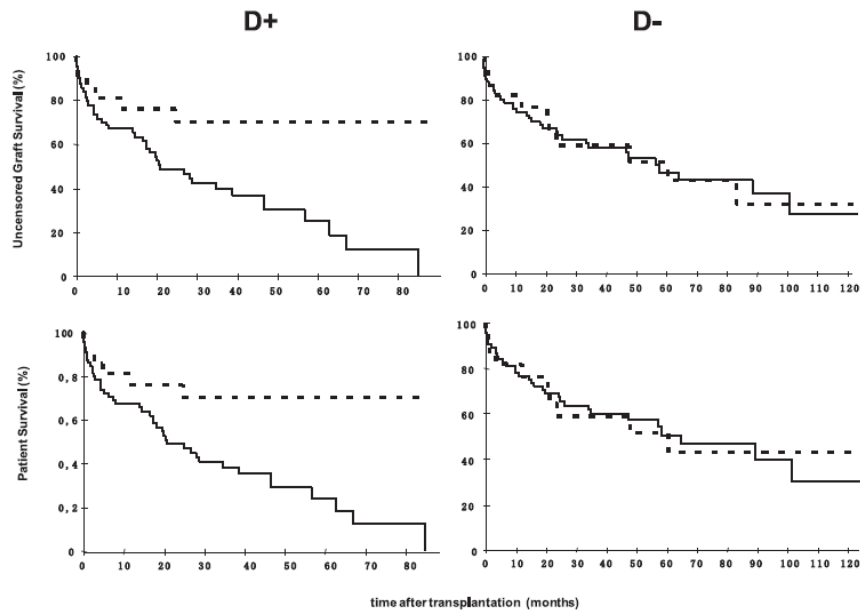


Figure 3 PD-1.3 SNP was highly associated with survival of recipients of D+ LTx. Kaplan-Meier analyses of data for patients who received D+ LTx ($n = 85$) and D- LTx ($n = 96$). Uncensored graft survival is shown in the upper graph, and patient survival is shown in the lower graph. Bold lines represent GG allele carriers, and dashed lines represent A allele carriers (AA or GA). In D+ LTx recipients, the presence of the A allele was associated with better uncensored graft survival ($p = 0.004$) and patient survival ($p = 0.006$). In the D- group (right graphs), the SNP did not affect uncensored graft survival or patient survival.

according to the PD-1.3 SNP assessing the number of IFN- γ -producing T cells responding to CMV-pp65 peptides in KTx recipients. We analyzed only homozygous patients (i.e., AA and GG). Because the duration of CMV infection might affect the accumulation of dysfunctional T cells, we expected that the strongest effect of the PD1 SNP (if any) would be observed in patients infected long before the time of analysis. Therefore, we analyzed the CMV immune response in patients infected before transplantation (i.e., long before the analysis took place). We performed individual matching on clinical variables likely to influence the anti-CMV immune response, as described in the Methods section. We included all R+ patients who were AA carriers and still being followed in our transplant center ($n = 7$); each AA patient was individually matched with 2 GG control patients. The clinical characteristics of each group are presented in Table 3. As shown in Figure 4, the number of IFN- γ -producing cells responding to pp65 peptides expressed per 10^6 PBMCs and per 10^6 lymphocytes was 2.6-fold and 4.2-fold higher for AA than matched GG carriers, respectively.

Discussion

We previously reported that CMV infection in kidney graft donors was associated with reduced graft survival.²³ However, the risk factors for graft loss in these patients are largely unknown. The present study reports a strong and robust association between a SNP in the programmed cell death 1 gene *PDCDI* (involved in viral-induced T-cell exhaustion) and graft survival in patients who had received

either KTx or LTx from CMV-infected donors, whereas there was no association in D- patients. The HRs were very similar in both KTx and LTx recipients. Obtained in 2 different organ settings, these results not only strongly support this clinical association but also indicate a non-organ-specific mechanism. Our case-control study found a stronger T-cell response to CMV in AA patients. Therefore, these results were compatible with lower PD-1 activity in CMV-specific CD8⁺ T cells from A carrier patients, which is in agreement with another study that reported defective PD-1-mediated inhibition of IFN- γ production in PBMCs of AA patients.³⁷ Although disruption of the binding site of runx1 transcription factor caused by the PD1.3 SNP has been described,³⁹ the exact mechanisms underlying the association of the SNP with CMV-specific T-cell dysfunction are uncertain. However, our results are in accordance with a more exhausted phenotype in blood CMV-specific T cells in GG patients. A study in mice demonstrated that tissue-resident viral-specific T cells were more prone to clonal exhaustion than circulating blood T cells.⁴⁴ Thus, we may speculate that graft-resident CMV-specific T cells of GG recipients may be more exhausted and have a poorer ability to control CMV reactivation within transplanted organs.

Our findings should encourage the design of studies aiming to individually tailor CMV prevention strategies to limit the indirect sequelae of CMV. Opelz and Döhler⁴⁵ more recently reported that CMV prevention improved death-censored graft survival in D+R+ and D+R- patients but not in D-R+ patients. In agreement with this study, Kliem et al⁴⁶ showed that 4-year graft survival was

Table 3 Demographic Characteristics of Case-Control Study Population

	G/G (<i>n</i> = 14) ^a	A carriers (<i>n</i> = 7) ^b	<i>p</i>
Recipient characteristics			
Age, years	54 ± 14	52 ± 11	0.97
Cause of renal disease			
Diabetes (%)	0	1 (14)	0.71
Glomerulonephritis (%)	1 (7)	1 (14)	0.79
Polycystic kidney (%)	5 (36)	2 (28)	0.87
Other (%)	8 (57)	3 (43)	0.88
Graft characteristics			
Immunosuppressive treatments in first 3 months			
Anti-lymphocyte antibodies (%)	8 (57)	4 (57)	0.64
IL-2R antagonists (%)	6 (43)	3 (43)	0.64
Calcineurin inhibitor (%)	14 (100)	5 (72)	0.19
Azathioprine (%)	1 (7)	2 (29)	0.51
Rapamycin (%)	0 (0)	1 (14)	0.72
Mycophenolate mofetil (%)	13 (93)	5 (72)	0.51
CMV serology before transplantation			
D+R+	2 (14)	2 (14)	0.51
D-R+	12 (86)	12 (86)	0.51
Graft rank	3 (21)	3 (21)	0.51
HLA class I AB mismatch	3.0 ± 1.0	3.2 ± 0.8	0.57
HLA class II DR mismatch	1.5 ± 0.7	1.1 ± 0.9	0.38
Characteristics at the time of blood withdrawal			
Age, years	60 ± 13	61 ± 13	0.45
Immunosuppressive treatments			
Calcineurin inhibitor (%)	12 (85)	5 (72)	0.45
Azathioprine (%)	1 (7)	0 (0)	0.72
Rapamycin (%)	1 (7)	1 (14)	0.79
Mycophenolate mofetil (%)	12 (86)	6 (86)	0.51
Blood count			
Full lymphocyte (per mm ³)	1,262 ± 443	1,481 ± 766	0.47
CD8 ⁺ subpopulation (per mm ³)	429 ± 436	510 ± 289	0.57
CD4 ⁺ subpopulation (per mm ³)	541 ± 287	707 ± 451	0.41
Clinical events after transplantation			
CMV disease (%)	0 (0)	0 (0)	
Acute rejection (%)	4 (28)	1 (14)	0.86

Data are shown as percentage or mean ± standard deviation (SD). Chi-square and Mann-Whitney tests were used to compare qualitative and quantitative data, respectively.

CMV, cytomegalovirus; D-R+, donor CMV seronegative and recipient CMV positive; D+R+, donor CMV seropositive and recipient CMV seropositive; HLA, human leukocyte antigen; IL-2R, interleukin-2 receptor.

^aWild-type homozygous GG patients.

^bHomozygous variant AA patients.

improved by ganciclovir prophylaxis only in D+R+ patients. Genotyping of PD-1.3 could identify patients who may benefit most from prolonged anti-viral treatment to prevent graft failure.

The strong association between the PD1.3 SNP and FEV at 6 months observed exclusively in D+ patients might suggest a causal relationship between bronchiolitis obliterans syndrome, intra-graft CMV reactivation, and PD1.3 SNP. In addition, 59% of graft loss among D+ KTx recipients was reported to be a consequence of chronic allograft nephropathy in GG patients, in contrast to 25% in A carriers (*p* = 0.033). However, we could not analyze correlations between pathologic graft lesions, local CMV replication, and PD1 genotypes because serial biopsies are not performed in KTx. These results together support the

role of a cellular immune response to modulate local CMV replication and subsequent chronic allograft damage. To date, no study has focused on the role of CMV-specific cellular immunity to predict long-term indirect CMV effects. Most studies have focused on the early risk of post-transplant CMV viremia or disease.^{47,48} Our results raise the possibility that serial monitoring of the CMV response might be more appropriate to predict CMV-associated graft loss.

Our study has some limitations. First, we could not reliably assess CMV disease in relation to kidney graft failure and the SNP allele because the incidence of CMV disease was low (5%). Although it is known that CMV disease increases the risk of death, there is no evidence to indicate that CMV disease per se is associated with chronic

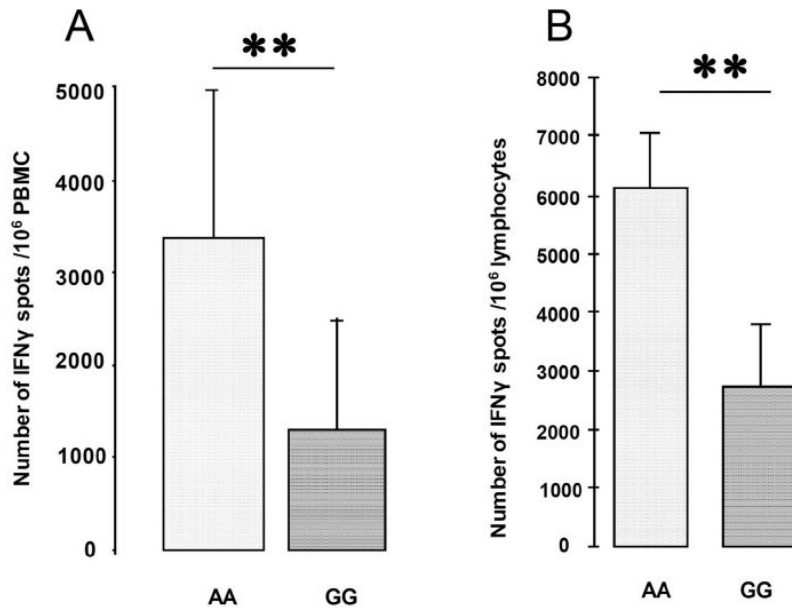


Figure 4 Enzyme-linked immunospot assay in response to CMV-pp65 peptides in AA patients (unshaded histogram) and GG patients (shaded histogram). (A) Number of IFN- γ -producing cells/ 10^6 PBMCs expressed as mean \pm SD (AA, 3,343/million cells \pm 1,556; GG, 1,295/million cells \pm 1,192; $**p = 0.003$). (B) IFN- γ -producing cells/ 10^6 lymphocytes expressed as mean \pm SD (AA, 4,980 \pm 2,104; GG, 1,929 \pm 1,995; $**p = 0.006$).

kidney graft dysfunction. For LTx recipients in whom CMV disease was a cause of death, information about CMV disease was often lacking, and a prospective study should be performed to assess the link between PD-1.3 SNP and CMV disease. Second, the CMV-specific immune response was assessed in a small number of patients because only a few AA KTx recipients were available. Therefore, although matching with GG recipients was based on very stringent matching criteria, a larger study might confirm these results. Third, the study period was long, with several changes in methods used to assess viral replication and treatments, especially viral prophylaxis regimens. Nevertheless, the impact of PD-1.3 SNP remained in the more recent period for KTx recipients, and LTx recipients underwent transplant after 2000. Therefore, our results could be considered as relevant to the current field of organ transplantation.

In conclusion, the presence of variant A allele of the PD-1.3 SNP conferred protection against graft failure in recipients of D+ KTx and LTx.

Disclosure statement

None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of the presented manuscript or other conflicts of interest to disclose.

This study was supported by VLM (Vaincre-La-Mucoviscidose) and FEDER (Fonds-Européens-de-DEveloppement-Régional). The funders permitted the data collection, but they had no role in the study design, data analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

The authors thank Doreen Raine for editing the manuscript.

References

- Staras SAS, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis* 2006;43:1143-51.
- Lopo S, Vinagre E, Palmilha P, Paixao MT, Nogueira P, Freitas MG. Seroprevalence to cytomegalovirus in the Portuguese population. *Euro Surveill* 2011;16:2002-3.
- Reeves MB, MacAry PA, Lehner PJ, Sissons JGP, Sinclair JH. Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:4140-5.
- Reeves M, Sinclair J. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;325:297-313.
- Hummel M, Zhang Z, Yan S, et al. Allogeneic transplantation induces expression of cytomegalovirus immediate-early genes in vivo: a model for reactivation from latency. *J Virol* 2001;75:4814-22.
- Orloff SL, Hwee Y-K, Kreklywich C, et al. Cytomegalovirus latency promotes cardiac lymphoid neogenesis and accelerated allograft rejection in CMV naïve recipients: CMV latency promotes cardiac TLOs. *Am J Transplant* 2011;11:45-55.
- Cook CH, Bickerstaff AA, Wang J-J, et al. Disruption of murine cardiac allograft acceptance by latent cytomegalovirus: disruption of murine cardiac allograft. *Am J Transplant* 2008;9:42-53.
- Lowance D, Neumayer HH, Legendre CM, et al. Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. International Valacyclovir Cytomegalovirus Prophylaxis Transplantation Study Group. *N Engl J Med* 1999;340:1462-70.
- Palmer SM, Limaye AP, Banks M, et al. Extended valganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus after lung transplantation: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2010;152:761-9.
- Jaksch P, Zwegyck B, Kerschner H, et al. Cytomegalovirus prevention in high-risk lung transplant recipients: comparison of 3- vs 12-month valganciclovir therapy. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:670-5.
- Helanterä I, Koskinen P, Tomroth T, Loginov R, Gronhagen-Riska C, Lautenschlager I. The impact of cytomegalovirus infections and acute rejection episodes on the development of vascular changes in 6-month

- protocol biopsy specimens of cadaveric kidney allograft recipients. *Transplantation* 2003;75:1858-64.
12. 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;21:1579-86.
 13. Reischig T, Jindra P, Hes O, Bouda M, Kormunda S, Třeška 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;87:436-44.
 14. Paraskeva M, Bailey M, Levvey BJ, et al. Cytomegalovirus replication within the lung allograft is associated with bronchiolitis obliterans syndrome: CMV in the allograft is associated with BOS. *Am J Transplant* 2011;11:2190-6.
 15. Weigt SS, Elashoff RM, Keane MP, et al. Altered levels of CC chemokines during pulmonary CMV predict BOS and mortality post-lung transplantation. *Am J Transplant* 2008;8:1512-22.
 16. 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;181:1391-6.
 17. Johansson I, Mårtensson G, Andersson R. Cytomegalovirus and long-term outcome after lung transplantation in Gothenburg, Sweden. *Scand J Infect Dis* 2010;42:129-36.
 18. Christie JD, Edwards LB, Aurora P, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report—2009. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:1031-49.
 19. Markovic-Lipkovski J, Müller CA, Engler-Blum G, et al. Human cytomegalovirus in rejected kidney grafts; detection by polymerase chain reaction. *Nephrol Dial Transplant* 1992;7:865-70.
 20. Shabir S, Kaul B, Pachnio A, et al. Impaired direct priming of CD8 T cells by donor-derived cytomegalovirus following kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:1698-708.
 21. 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.
 22. Dzabic M, Rahbar A, Yaiw K-C, et al. Intra-graft cytomegalovirus protein expression is associated with reduced renal allograft survival. *Clin Infect Dis* 2011;53:969-76.
 23. Gatault P, Halimi J-M, Forconi C, 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;13:2119-29.
 24. Van Ree RM, de Vries APJ, Zelle DM, et al. Latent cytomegalovirus infection is an independent risk factor for late graft failure in renal transplant recipients. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 2011;17:CR609-17.
 25. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 2011;13:492-9.
 26. Antoine P, Olislagers V, Huygens A, et al. Functional exhaustion of CD4+ T lymphocytes during primary cytomegalovirus infection. *J Immunol* 2012;189:2665-72.
 27. 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;8:990-9.
 28. 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;175:8218-25.
 29. 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;176:2645-53.
 30. Zhang J-Y, Zhang Z, Jin B, 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;181:3741-4.
 31. Zhang J-Y, Zhang Z, Wang X, et al. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood* 2007;109:4671-8.
 32. 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;16:1147-51.
 33. Petrovas C, Chaon B, Ambrozak DR, et al. Differential association of programmed death-1 and CD57 with ex vivo survival of CD8+ T cells in HIV infection. *J Immunol* 2009;183:1120-32.
 34. Sester U, Presser D, Dirks J, Gärtner BC, Köhler H, Sester M. PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus-specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy: PD-1 expression and IL-2 loss in CMV viremia. *Am J Transplant* 2008;8:1486-97.
 35. La Rosa C, Krishnan A, Longmate J, et al. Programmed death-1 expression in liver transplant recipients as a prognostic indicator of cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 2008;197:25-33.
 36. Ferreiros-Vidal I, D'Alfonso S, Papasteriades C, et al. Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe. *Genes Immun* 2007;8:138-46.
 37. Bertsias GK, Nakou M, Choulaki C, et al. Genetic, immunologic, and immunohistochemical analysis of the programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009;60:207-18.
 38. Kroner A, Mehling M, Hemmer B, et al. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2005;58:50-7.
 39. Prokunina L, Castillejo-López C, Öberg F, et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 2002;32:666-9.
 40. Prokunina L, Gunnarsson I, Sturfelt G, et al. The systemic lupus erythematosus-associated PDCD1 polymorphism PD1.3A in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:327-8.
 41. Nielsen C, Hansen D, Husby S, Jacobsen BB, Lillevang ST. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 2003;62:492-7.
 42. Ruttman E, Geltner C, Bucher B, et al. Combined CMV prophylaxis improves outcome and reduces the risk for bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) after lung transplantation. *Transplantation* 2006;81:1415-20.
 43. Iannone MA, Taylor JD, Chen J, et al. Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry. *Cytometry* 2000;39:131-40.
 44. 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;84:2078-89.
 45. Opelz G, Döhler B. Reduced rate of cardiovascular death after cytomegalovirus prophylaxis in renal transplant recipients. *Transplantation* 2015;99:1197-202.
 46. Kliem V, Fricke L, Wollbrink T, Burg M, Rademacher J, Rohde F. Improvement in long-term renal graft survival due to CMV prophylaxis with oral ganciclovir: results of a randomized clinical trial. *Am J Transplant* 2008;8:975-83.
 47. Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, et al. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 2005;201:1031-6.
 48. Manuel O, Husain S, Kumar D, et al. Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin Infect Dis* 2013;56:817-24.

V. Discussions et perspectives.

Nous montrons dans ces travaux (article n°1) qu'un rein issu d'un donneur infecté par le CMV est un facteur de risque indépendant de perte de fonction du greffon. Ce risque est nettement plus important si le receveur est aussi séropositif avant la greffe (D+R+ comparé aux D+R-). Soulignons qu'aucune analyse du lien entre sérologie CMV du donneur et devenir des greffons n'a été rapportée dans d'autres types de greffes d'organes. Concernant la transplantation cardiaque, comme nous l'avons détaillé dans l'introduction de cette thèse (pages 37-38), plusieurs études ont établi un lien entre la survenue d'une virémie CMV et l'apparition de lésions de CAV. Cependant, nous pouvons observer que dans l'étude la plus récente, (106), qui incluait 72% de patients D+, le lien entre la virémie et la survenue d'une CAV était principalement attribuable aux patients D+R+, alors que la proportion des patients D+R- était comparable chez les patients avec et sans CAV. Cette étude laisse présager un lien significatif entre la séropositivité du donneur et le risque de développer une CAV chez les sujets R+. Enfin, dans la cohorte multicentrique de greffés pulmonaires de notre étude, nous avons une association significative entre la sérologie CMV positive chez le donneur et la survie du patient ($p=0.04$). Ensemble, ces résultats indiquent que l'infection par le CMV du donneur d'organe (rein, poumon et cœur) est un paramètre significatif de la survie des greffons à long terme.

Nos travaux ont également montré pour la première fois que l'infection du donneur par le CMV façonne la réponse lymphocytaire anti-CMV, notamment CD8 (article n°2). Ainsi chez le patient séropositif avant la transplantation, le nombre de lymphocytes T anti-CMV répondeurs est plus élevé lorsque le rein est issu d'un donneur infecté, laissant penser que le rein est bien une source importante de virions qui participe à l'inflation du pool de lymphocytes T CD8 spécifiques du CMV. L'implantation de cet inoculum viral

supplémentaire vient donc bouleverser l'équilibre entre le donneur et le receveur dans un contexte d'immunosuppression. Cette "superinfection" n'a cependant d'effet sur le niveau de réponse antivirale qu'à la condition que les cellules du donneur puissent présenter les peptides viraux par leur molécule HLA de classe I, puisque l'impact de la sérologie positive du donneur sur la réponse lymphocytaire anti-CMV disparaît en l'absence d'identités HLA-I partagées entre le receveur et le donneur. De plus nous avons montré que l'expansion des lymphocytes T CD8 anti CMV restreints par le HLA-A2 chez le sujet D+R- (primo-infecté au moment de la greffe) nécessite l'expression de A2 par le donneur. Ce résultat confirme donc le rôle des cellules du donneur dans l'infiltration des LT CD8 anti-CMV à distance de la greffe.

Nous montrons également que la reconnaissance des peptides viraux présentés par les molécules HLA-I partagées entre donneur et receveur est non seulement importante à prendre en considération pour comprendre l'établissement de la réponse immunitaire spécifique anti-CMV, mais est également un déterminant essentiel du risque accru de dégradation de fonction des reins D+ (article n°1). Nous faisons ainsi l'hypothèse que l'absence d'engagement du TCR par les lymphocytes T CD8 spécifiques du CMV, incapables de reconnaître les cellules infectées du donneur, limite fortement le contrôle de l'infection *in situ*, qui ferait le lit de la progression de lésions chroniques. Le second facteur de risque de développer des lésions dans les greffons rénaux et pulmonaires D+ est le polymorphisme du gène de Programmed Cell Death 1 (PD-1.3), les patients D+ porteurs d'au moins un allèle variant A ayant un meilleur pronostic que les patients homozygotes sauvages GG (article n°3). Nos données indiquent que les patients homozygotes AA pour le SNP-PD1.3 ont un plus grand nombre de lymphocytes anti-CMV producteurs d'IFN- γ , suggérant que ce polymorphisme pourrait moduler la réponse immunitaire spécifique anti-CMV. De plus, nous montrons que les patients R+ ayant une forte réduction du nombre de LT CD8 après la transplantation ont un risque accru de perte de greffon. Ensemble ces données suggèrent que la qualité de la réponse lymphocytaire

cytotoxique anti-CMV est importante pour contrôler la réplication virale dans le greffon et les lésions induites par cette dernière, ce qui n'a encore jamais été rapporté dans la littérature scientifique.

Ainsi nous proposons deux mécanismes à l'origine du développement des lésions liées à l'infection à CMV dans le rein. D'un coté les patients « full-mismatched » en HLA de classe I dont les lymphocytes T CD8 anti-CMV ne seraient pas capables de contrôler l'infection dans le greffon (indépendamment de leur capacité à contrôler l'infection d'une cellule du soi) du fait d'une mauvaise reconnaissance des peptides viraux dans le greffon. D'un autre coté des receveurs dont les lymphocytes T CD8 anti-CMV présenteraient un certain degré de dysfonction empêchant un contrôle efficace de l'infection en dépit de leur capacité à reconnaître la cellule allogénique infectée. En accord avec cette hypothèse, nous avons constaté que l'effet du SNP-PD1.3 disparaît totalement chez les patients transplantés rénaux ne partageant pas d'identité HLA-I avec leur donneur (figure ci-dessous non publiée).

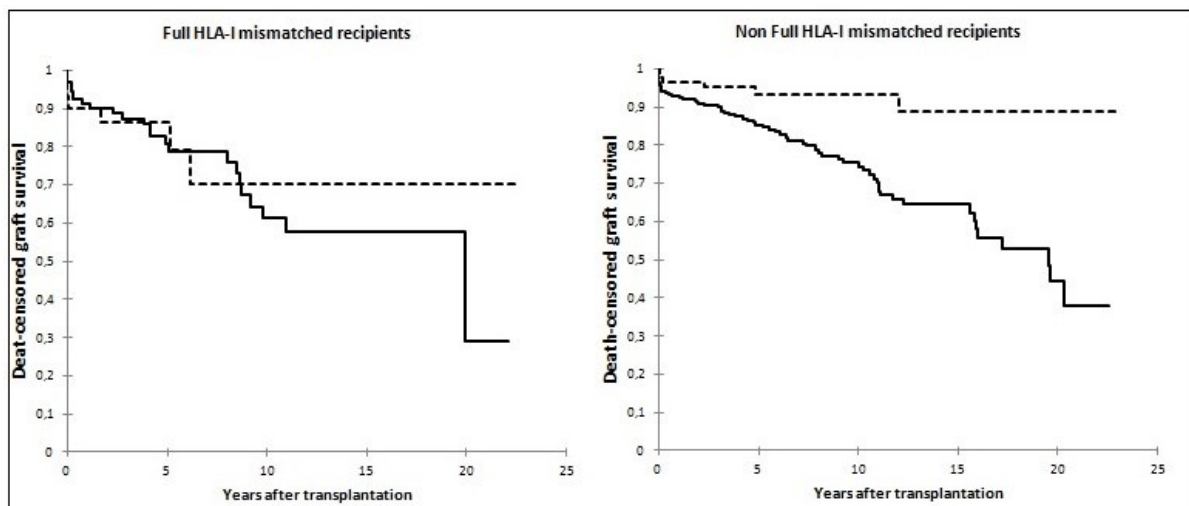


Figure 9: Effect of PD-1.3 SNP according to HLA-I matching.

Variant A allele of the SNP-PD1.3 was associated with graft survival who received kidneys from CMV- infected donors when at least one HLA-I identity was shared between donors and their recipient (right figure, GG patients: 279, A-carriers: 85, $p=0.001$), but not in full HLA-I mismatched recipients (left figure, GG patients: 92, A-carriers: 30, $p=0.657$).

L'effet du polymorphisme PD-1.3 (considéré comme un potentiel facteur de dysfonction des lymphocytes T cytotoxiques) chez les patients D⁺ ne peut donc être observé qu'à la condition que la cellule allogénique infectée puisse être reconnue par les lymphocytes T CD8. Il est alors intéressant d'envisager que la dysfonction lymphocytaire chez les patients GG puisse se constituer après la transplantation en rapport avec des stimulations répétées des LT CD8 par les cellules infectées au sein du greffon. En effet, comme cela a été précédemment approfondi (pages 64-67), le mécanisme de dysfonction des lymphocytes T CD8 anti-viraux le mieux décrit est celui de l'épuisement clonal impliquant fortement PD-1, induit par des stimulations antigéniques chroniques. A l'heure actuelle, l'épuisement clonal est considéré comme caractérisant seulement les infections virales chroniques avec des réplifications continues et soutenues. Son existence n'est pas établie dans l'infection à CMV, ce virus étant considéré comme incapable d'installer une réplification suffisamment intense et prolongée. Nous montrons par nos travaux que l'infection CMV chez le patient transplanté d'organe recevant un rein infecté est très singulière, et pourrait présenter des caractéristiques plus proches d'une infection chronique continue, en particulier au sein du greffon. Ainsi, ce bouleversement de l'histoire naturelle de l'infection CMV chez le receveur d'un organe infecté par le CMV serait peut-être susceptible d'induire un certain degré de dysfonction lymphocytaire CD8, voire d'épuisement.

Dans nos résultats non publiés nous avons constaté que le nombre de LT CD8 totaux (très lié à l'infection par le CMV), est significativement plus faible chez les patients D⁺ ayant un génotype GG que chez ceux porteurs de l'allèle A (figure ci-dessous). Ceci suggère que le SNP influe sur l'inflation des LT CD8 effecteurs anti CMV.

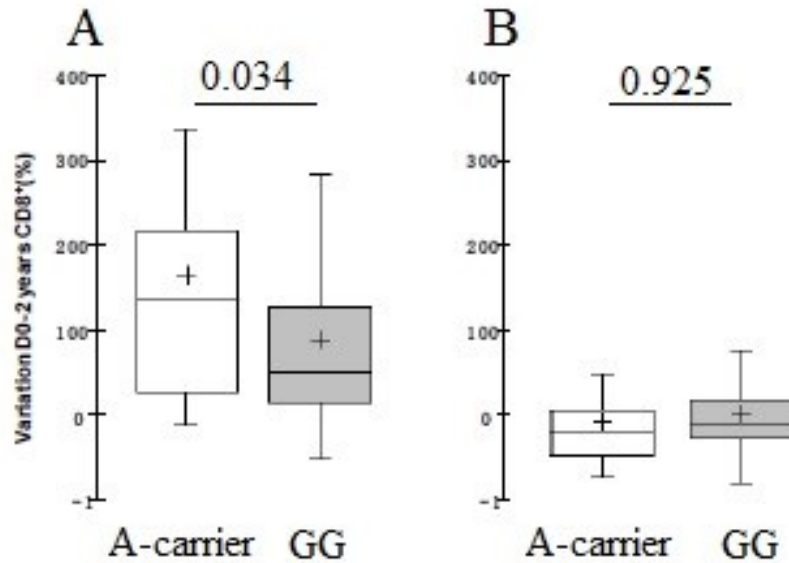


Figure 10: Effect of SNP-PD1.3 on variation of CD8 T cell count after kidney transplantation.

A-carriers have a larger expansion of their CD8+ T-cell count. A (D+ recipients) and B (D-R-recipients) show the evolution of the CD8+ T-cell compartment between pre-operative day 0 and year-2 post-transplantation according to presence (grey box) or absence (white box) of A allele of the SNP PD1.3.

Results are expressed as median (horizontal line), inter-quartile range (boxes) and standard deviation (outside bars) indicate SD. Mean values are symbolized by a (+) symbol

Ce résultat est compatible avec un épuisement des LT CD8 anti-CMV chez les patients GG recevant un rein D+. Il faut d'ailleurs rappeler que les ligands de PD1 sont fortement exprimés par les cellules tubulaires rénales (261), et qu'ils protègent des lésions d'ischémie reperfusion dans un modèle murin (262). Finalement nous proposons le schéma suivant dans le but d'intégrer l'ensemble de nos résultats.

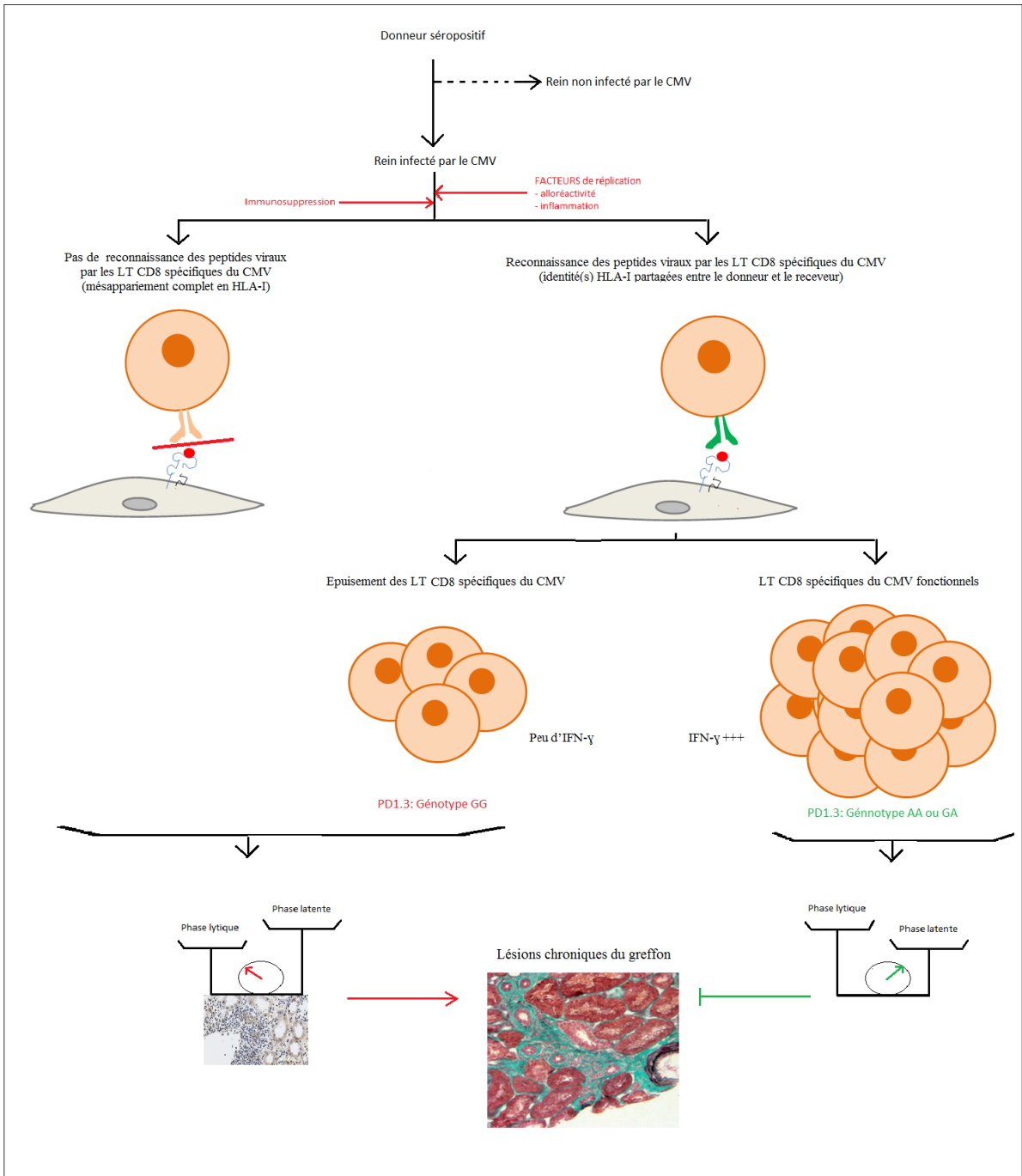


Figure 11: Hypothèses concernant les mécanismes de non-contrôle par les LT CD8 anti-CMV de l'infection *in situ* du greffon et des lésions chroniques induites.

L'ensemble de nos résultats soulèvent plusieurs questions non résolues qui nous paraissent importantes dans la compréhension des mécanismes de la pathogénie de l'infection à CMV sur des lésions du greffon et le développement d'une dysfonction lymphocytaire T CD8 chez certains patients.

Questions 1: le polymorphisme PD1.3 influence t-il la survie des greffons cardiaques?

Nos résultats sur le lien entre dysfonction du greffon rénal et pulmonaire et le polymorphisme PD1.3 doivent conduire à des travaux similaires dans d'autres transplantations d'organes solides comme le cœur (actuellement en cours). Nous avons sollicité l'équipe de transplantation cardiaque de Tours qui a réalisé 273 transplantations cardiaques depuis 1991.

Question 2: existe-t-il un épuisement des LT CD8 anti-CMV chez les greffés rénaux, secondaire à une réplication plus ou moins chronique du CMV intragreffon .

Les premières études qui visaient à montrer un épuisement lymphocytaire se sont appuyer sur des critères phénotypiques et fonctionnelles. Plus récemment ont été menées des études analysant la transcription de nombreux gènes sur la base de l'utilisation de puces à ARN. Elles ont montré que plusieurs gènes étaient surexprimés ou sous-exprimés lorsque les LT CD8+ présentaient un phénotype épuisé. L'étude des variations de la quantité des ARNm de PD-1, BATF (pour Basic Leucine Zipper Transcription Factor), IRF9 (pour Interferon Regulatory Factor 9) et STAT1 (pour Signal Transducer and Activator Of Transcription 1) qui sont up-régulés en cas d'épuisement (205), mais également du coactivateur transcriptionnel Lysine Acetyltransferase 2B (KAT2B) dont la synthèse est diminuée (200), apparait comme une piste crédible pour étudier l'établissement éventuel de l'épuisement chez le patient dans transplanté. Des travaux réalisés au sein du laboratoire ont permis d'établir la faisabilité de l'étude de l'expression de ces gènes dans les LT CD8 anti CMV (triés après marquage par les dextramères pp65).

Pour diverses raisons que nous avons préalablement développé, qui tiennent à la biologie du CMV et à l'impossibilité de réaliser des biopsies itératives, il serait intéressant de pouvoir suivre de façon régulière la réplication du virus dans le greffon rénal. Par ailleurs, nous avons montré que les patients non virémiques n'étaient pas protégés du risque de perte de greffon associé à la sérologie positive du donneur, alors que leur réponse anti-CMV s'amplifie significativement suite à la greffe (D+R+ virémie ^{neg}: 4456±3816 vs. 2190±2266 spots IFN- γ /millions de lymphocytes, 5068±3861 vs. 3239±4090 spots IFN- γ /mL avec p=0,014). Nous avons d'ailleurs observé que la virémie n'était pas associée à une augmentation du nombre de lymphocytes CD8. Ensemble, ces résultats suggèrent que la surveillance de la virémie n'est pas un biomarqueur pertinent pour évaluer la réplication au sein du greffon. Nous pourrions envisager de surveiller la réplication virale par réalisation de PCR dans les urines. Cette méthode est la méthode de référence pour diagnostiquer les infections materno-foetales dans les deux premières semaines de vie du nouveau-né. Des techniques de cultures rapides sont maintenant plus souvent utilisées. Cependant la réplication virale est très forte dans cette situation aucune données récente n'est disponible, à notre connaissance, chez le patient transplanté. Un lien entre la virurie et l'expression des gènes impliqués dans l'épuisement des LT CD8 anti-CMV chez les patients partageant au moins une identité HLA-I avec leur donneur serait un élément important pour affirmer l'existence d'un épuisement clonal induit par la réplication virale du CMV au sein des greffons infectés par le CMV.

Question 3: peut-on prévenir le développement des lésions liées à l'infection du donneur?

Enfin, nous pouvons discuter des stratégies thérapeutiques qui viseraient à réduire l'infection productive dans le greffon dans le but d'améliorer le pronostic fonctionnel de la greffe, alors que jusqu'ici l'utilisation des traitements antiviraux avaient pour objectif de limiter la morbi-mortalité associée à la survenue des infections aiguës invasives à CMV. Nos résultats suggèrent qu'il faudrait éviter de transplanter des organes de donneurs séropositifs à des

receveurs en l'absence de compatibilité en classe I. Cependant, cette mesure préventive dépend de modifications de critères d'allocations qui peuvent paraître compliquées à mettre en œuvre.

A l'heure actuelle, seules des molécules chimiques antivirales sont utilisées. Le valganciclovir et le ganciclovir sont ainsi utilisés en prévention et pour le traitement de la maladie à CMV pendant 3 à 6 mois suite à la transplantation. Leur toxicité, notamment hématologique, limite cependant leur utilisation au long cours, qui pourrait s'avérer intéressante si l'on en croit l'amélioration de survie des greffons (décès censurés) chez les patients D+R+ dans un essai thérapeutique (143) et dans un large registre international (142). Peu d'études chez l'animal ont étudiés l'effet d'un traitement antiviral sur le développement de lésions du greffon. Notons que Britt et al. ont développé un modèle de transplantation rénale allogénique (BALB/c vers C54BL/6) dans un contexte de primo-infection de (D+R-) avec une souche de MCMV génétiquement modifiée (MCMV Smith157). Ils ont ainsi montré que l'utilisation du ganciclovir permettait de réduire le développement de lésions tubulaires et la composante inflammatoire interstitielle, tant l'infiltrat que l'œdème, avec des biopsies se rapprochant des souris D-R- (138).

Pour conclure, nos travaux apportent des données originales et robustes sur le déroulement de la superinfection par un greffon, ses déterminants, et ses conséquences sur la réponse immunitaire spécifique du CMV et le devenir des greffons.

VI. Références bibliographiques

1. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol.* 2010 Jun 18;20(4):202–13.
2. Freeman, Jr. RB. The “Indirect” Effects of Cytomegalovirus Infection. *Am J Transplant.* 2009 Nov;9(11):2453–8.
3. Zhang Z, Li Z, Yan S, Wang X, Abecassis M. TNF- α Signaling is Not Required for In Vivo Transcriptional Reactivation of Latent Murine Cytomegalovirus: Transplantation. 2009 Sep;88(5):640–5.
4. Simon CO, Seckert CK, Dreis D, Reddehase MJ, Grzimek NKA. Role for Tumor Necrosis Factor Alpha in Murine Cytomegalovirus Transcriptional Reactivation in Latently Infected Lungs. *J Virol.* 2005 Jan 1;79(1):326–40.
5. McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* 2006 Apr;117(1):90–104.
6. Sinclair J, Reeves M. Human Cytomegalovirus Manipulation of Latently Infected Cells. *Viruses.* 2013 Nov 21;5(11):2803–24.
7. Davison AJ, Dolan A, Akter P, Addison C, Dargan DJ, Alcendor DJ, et al. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol.* 2003 Jan;84(Pt 1):17–28.
8. Gatherer D, Seirafian S, Cunningham C, Holton M, Dargan DJ, Baluchova K, et al. High-resolution human cytomegalovirus transcriptome. *Proc Natl Acad Sci.* 2011 Dec 6;108(49):19755–60.
9. Gershburg E, Pagano JS. Conserved herpesvirus protein kinases. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Jan;1784(1):203–12.
10. Marschall M, Stein-Gerlach M, Freitag M, Kupfer R, van Den Bogaard M, Stamminger T. Inhibitors of human cytomegalovirus replication drastically reduce the activity of the viral protein kinase pUL97. *J Gen Virol.* 2001 Jun;82(Pt 6):1439–50.
11. Varnum SM, Strelbow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, Pasa-Tolic L, et al. Identification of Proteins in Human Cytomegalovirus (HCMV) Particles: the HCMV Proteome. *J Virol.* 2004 Oct 15;78(20):10960–6.
12. Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grässer FA, et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods.* 2005 Apr;2(4):269–76.
13. Murphy E, Vaníček J, Robins H, Shenk T, Levine AJ. Suppression of immediate-early viral gene expression by herpesvirus-coded microRNAs: implications for latency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 8;105(14):5453–8.
14. Stern-Ginossar N, Elefant N, Zimmermann A, Wolf DG, Saleh N, Biton M, et al. Host Immune System Gene Targeting by a Viral miRNA. *Science.* 2007 Jul 20;317(5836):376–81.
15. Sinzger C, Jahn G. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology.* 1996;39(5-6):302–19.
16. Cojohari O, Peppenelli MA, Chan GC. Human cytomegalovirus induces an atypical activation of Akt to stimulate the survival of short-lived monocytes. *J Virol.* 2016 May 4;JVI.00214–16.
17. Bentz GL, Yurochko AD. Human CMV infection of endothelial cells induces an angiogenic response through viral binding to EGF receptor and beta1 and beta3 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 8;105(14):5531–6.

18. Vanarsdall AL, Howard PW, Wisner TW, Johnson DC. Human Cytomegalovirus gH/gL Forms a Stable Complex with the Fusion Protein gB in Virions. *Britt WJ, editor. PLOS Pathog.* 2016 Apr 15;12(4):e1005564.
19. Eisenberg RJ, Atanasiu D, Cairns TM, Gallagher JR, Krummenacher C, Cohen GH. Herpes Virus Fusion and Entry: A Story with Many Characters. *Viruses.* 2012 May 10;4(12):800–32.
20. Sinzger C. Entry route of HCMV into endothelial cells. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2008 Mar;41(3):174–9.
21. Marschall M, Feichtinger S, Milbradt J. Regulatory Roles of Protein Kinases in Cytomegalovirus Replication. In: *Advances in Virus Research* [Internet]. Elsevier; 2011 [cited 2016 Jan 23]. p. 69–101. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012385987700004X>
22. Rossetto CC, Tarrant-Elorza M, Pari GS. Cis and trans acting factors involved in human cytomegalovirus experimental and natural latent infection of CD14 (+) monocytes and CD34 (+) cells. *PLoS Pathog.* 2013;9(5):e1003366.
23. Mendelson M, Monard S, Sissons P, Sinclair J. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J Gen Virol.* 1996 Dec;77 (Pt 12):3099–102.
24. Taylor-Wiedeman J, Sissons JG, Borysiewicz LK, Sinclair JH. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol.* 1991 Sep;72 (Pt 9):2059–64.
25. Sindre H, Tjønnfjord GE, Rollag H, Ranneberg-Nilsen T, Veiby OP, Beck S, et al. Human cytomegalovirus suppression of and latency in early hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1996 Dec 15;88(12):4526–33.
26. Soland MA, Keyes LR, Bayne R, Moon J, Porada CD, St. Jeor S, et al. Perivascular Stromal Cells as a Potential Reservoir of Human Cytomegalovirus: HCMV Infects Perivascular Stromal Cells. *Am J Transplant.* 2014 Apr;14(4):820–30.
27. Murphy JC. Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J.* 2002 Mar 1;21(5):1112–20.
28. Reeves MB. Chromatin-mediated regulation of cytomegalovirus gene expression. *Virus Res.* 2011 May;157(2):134–43.
29. Goodrum FD, Jordan CT, High K, Shenk T. Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 10;99(25):16255–60.
30. Cheung AKL, Abendroth A, Cunningham AL, Slobedman B. Viral gene expression during the establishment of human cytomegalovirus latent infection in myeloid progenitor cells. *Blood.* 2006 Dec 1;108(12):3691–9.
31. Bego M, Maciejewski J, Khaiboullina S, Pari G, St. Jeor S. Characterization of an Antisense Transcript Spanning the UL81-82 Locus of Human Cytomegalovirus. *J Virol.* 2005 Sep 1;79(17):11022–34.
32. Reeves MB, Sinclair JH. Analysis of latent viral gene expression in natural and experimental latency models of human cytomegalovirus and its correlation with histone modifications at a latent promoter. *J Gen Virol.* 2010 Mar 1;91(3):599–604.
33. Poole E, Avdic S, Hodgkinson J, Jackson S, Wills M, Slobedman B, et al. Latency-Associated Viral Interleukin-10 (IL-10) Encoded by Human Cytomegalovirus Modulates Cellular IL-10 and CCL8 Secretion during Latent Infection through Changes in the Cellular MicroRNA hsa-miR-92a. *J Virol.* 2014 Dec 15;88(24):13947–55.

34. Jenkins C, Abendroth A, Slobedman B. A novel viral transcript with homology to human interleukin-10 is expressed during latent human cytomegalovirus infection. *J Virol*. 2004 Feb;78(3):1440–7.
35. Zheng X, Gao Y, Zhang Q, Liu Y, Peng Y, Fu M, et al. Identification of Transcription Factor AML-1 Binding Site Upstream of Human Cytomegalovirus UL111A Gene. Meng Z, editor. *PLOS ONE*. 2015 Feb 6;10(2):e0117773.
36. Döcke WD, Prösch S, Fietze E, Kimel V, Zuckermann H, Klug C, et al. Cytomegalovirus reactivation and tumour necrosis factor. *Lancet Lond Engl*. 1994 Jan 29;343(8892):268–9.
37. Döcke W-D, Kiessling C, Worm M, Friedrich M, Pruss A, Weitz M, et al. Subclinical activation of latent cytomegalovirus (CMV) infection and anti-CMV immune response in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2003 May;148(5):954–63.
38. Söderberg-Nauclér C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell*. 1997 Oct 3;91(1):119–26.
39. Guyotat D, Gibert R, Chomel J, Archimbaud E, Bossard S, Maupas J, et al. Incidence and prognosis of cytomegalovirus infections following allogeneic bone marrow transplantation. *J Med Virol*. 1987 Dec;23(4):393–9.
40. Koskinen PK, Kallio EA, Tikkanen JM, Sihvola RK, Häyry PJ, Lemström KB. Cytomegalovirus infection and cardiac allograft vasculopathy. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc*. 1999 Jun;1(2):115–26.
41. Lautenschlager I, Höckerstedt K, Taskinen E, von Willebrand E. Expression of adhesion molecules and their ligands in liver allografts during cytomegalovirus (CMV) infection and acute rejection. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 1996;9 Suppl 1:S213–215.
42. Rahbar A, Boström L, Lagerstedt U, Magnusson I, Söderberg-Naucler C, Sundqvist V-A. Evidence of active cytomegalovirus infection and increased production of IL-6 in tissue specimens obtained from patients with inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2003 May;9(3):154–61.
43. Reeves MB, MacAry PA, Lehner PJ, Sissons JGP, Sinclair JH. Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 15;102(11):4140–5.
44. Smith MS, Goldman DC, Bailey AS, Pfaffle DL, Kreklywich CN, Spencer DB, et al. Granulocyte-Colony Stimulating Factor Reactivates Human Cytomegalovirus in a Latently Infected Humanized Mouse Model. *Cell Host Microbe*. 2010 Sep;8(3):284–91.
45. Wu S-E, Miller WE. The human cytomegalovirus lytic cycle is induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in peripheral blood monocytes and in the THP-1 monocytic cell line. *Virology*. 2015 Sep;483:83–95.
46. Kutza AS, Muhl E, Hackstein H, Kirchner H, Bein G. High incidence of active cytomegalovirus infection among septic patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1998 May;26(5):1076–82.
47. Ong DSY, Spitoni C, Klein Klouwenberg PMC, Verduyn Lunel FM, Frencken JF, Schultz MJ, et al. Cytomegalovirus reactivation and mortality in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med*. 2016 Mar;42(3):333–41.
48. Kandiel A, Lashner B. Cytomegalovirus Colitis Complicating Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol*. 2006 Dec;101(12):2857–65.
49. Limaye AP. Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus in Organ Transplant Recipients. *Clin Infect Dis*. 2002 Oct;35(7):866–72.
50. Mincez LR, Nguyen MH, Mitsani D, Shields RK, Kwak EJ, Silveira FP, et al. Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Infections among Lung Transplant Recipients Are Associated with

- Poor Outcomes despite Treatment with Foscarnet-Containing Regimens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Jan 1;58(1):128–35.
51. Hakki M, Drummond C, Houser B, Marousek G, Chou S. Resistance to maribavir is associated with the exclusion of pUL27 from nucleoli during human cytomegalovirus infection. *Antiviral Res.* 2011 Nov;92(2):313–8.
 52. Winston DJ, Saliba F, Blumberg E, Abouljoud M, Garcia-Diaz JB, Goss JA, et al. Efficacy and safety of maribavir dosed at 100 mg orally twice daily for the prevention of cytomegalovirus disease in liver transplant recipients: a randomized, double-blind, multicenter controlled trial. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2012 Nov;12(11):3021–30.
 53. Marty FM, Ljungman P, Papanicolaou GA, Winston DJ, Chemaly RF, Strasfeld L, et al. Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet Infect Dis.* 2011 Apr;11(4):284–92.
 54. Carbone J. The Immunology of Posttransplant CMV Infection: Potential Effect of CMV Immunoglobulins on Distinct Components of the Immune Response to CMV. *Transplantation.* 2016 Mar;100:S11–S18.
 55. Rea F, Potena L, Yonan N, Wagner F, Calabrese F. Cytomegalovirus Hyper Immunoglobulin for CMV Prophylaxis in Thoracic Transplantation: *Transplantation.* 2016 Mar;100:S19–S26.
 56. Kotton CN. CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy: *CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy.* *Am J Transplant.* 2013 Feb;13(s3):24–40.
 57. Schulz U, Solidoro P, Müller V, Szabo A, Gottlieb J, Wilkens H, et al. CMV Immunoglobulins for the Treatment of CMV Infections in Thoracic Transplant Recipients: *Transplantation.* 2016 Mar;100:S5–S10.
 58. Ishida JH, Burgess T, Derby MA, Brown PA, Maia M, Deng R, et al. Phase 1 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of RG7667, an Anticytomegalovirus Combination Monoclonal Antibody Therapy, in Healthy Adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Aug;59(8):4919–29.
 59. Ishida JH, Patel A, Mehta AK, Gatault P, McBride JM, Burgess T, et al. Phase 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of RG7667, a Combination Monoclonal Antibody, for Prevention of Cytomegalovirus Infection in High-Risk Kidney Transplant Recipients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Nov 21;
 60. San-Juan R, Navarro D, García-Reyne A, Montejo M, Muñoz P, Carratala J, et al. Effect of delaying prophylaxis against CMV in D+/R– solid organ transplant recipients in the development of CMV-specific cellular immunity and occurrence of late CMV disease. *J Infect.* 2015 Nov;71(5):561–70.
 61. Meijers RWJ, Litjens NHR, Hesselink DA, Langerak AW, Baan CC, Betjes MGH. Primary Cytomegalovirus Infection Significantly Impacts Circulating T Cells in Kidney Transplant Recipients: Primary CMV Affects T Cells Posttransplantation. *Am J Transplant.* 2015 Dec;15(12):3143–56.
 62. Luzuriaga K, Sullivan JL. Infectious Mononucleosis. *N Engl J Med.* 2010 May 27;362(21):1993–2000.
 63. Medovic R, Igrutinovic Z, Radojevic-Marjanovic R, Markovic S, Raskovic Z, Simovic A, et al. Clinical and laboratory differences between Epstein-Barr and cytomegalovirus infectious mononucleosis in children. *Srp Arh Celok Lek.* 2016;144(1-2):56–62.
 64. Enid Klauber, Laurence E. Briski, R. Cytomegalovirus Colitis in the Immunocompetent Host: an Overview. *Scand J Infect Dis.* 1998 Jan;30(6):559–64.
 65. Rafailidis PI, Mourtzoukou EG, Varbobitis IC, Falagas ME. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virology.* 2008;5(1):47.

66. Domènech E, Vega R, Ojanguren I, Hernández Á, Garcia-Planella E, Bernal I, et al. Cytomegalovirus infection in ulcerative colitis: A prospective, comparative study on prevalence and diagnostic strategy: *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Oct;14(10):1373–9.
67. Goodman AL, Murray CD, Watkins J, Griffiths PD, Webster DP. CMV in the gut: a critical review of CMV detection in the immunocompetent host with colitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Jan;34(1):13–8.
68. Roblin X, Pillet S, Oussalah A, Berthelot P, Del Tedesco E, Phelip J-M, et al. Cytomegalovirus Load in Inflamed Intestinal Tissue Is Predictive of Resistance to Immunosuppressive Therapy in Ulcerative Colitis. *Am J Gastroenterol*. 2011 Nov;106(11):2001–8.
69. Al-Omari A, Aljamaan F, Alhazzani W, Salih S, Arabi Y. Cytomegalovirus infection in immunocompetent critically ill adults: literature review. *Ann Intensive Care* [Internet]. 2016 Dec [cited 2016 Nov 29];6(1). Available from: <http://annalsofintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/s13613-016-0207-8>
70. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2002 Apr 15;34(8):1094–7.
71. Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest*. 2011 May 2;121(5):1673–80.
72. Peterson PK, Balfour HH, Marker SC, Fryd DS, Howard RJ, Simmons RL. Cytomegalovirus disease in renal allograft recipients: a prospective study of the clinical features, risk factors and impact on renal transplantation. *Medicine (Baltimore)*. 1980 Jul;59(4):283–300.
73. Boyce NW, Hayes K, Gee D, Holdsworth SR, Thomson NM, Scott D, et al. Cytomegalovirus infection complicating renal transplantation and its relationship to acute transplant glomerulopathy. *Transplantation*. 1988 Apr;45(4):706–9.
74. Bestard O, Lucia M, Crespo E, Van Liempt B, Palacio D, Melilli E, et al. Pretransplant Immediately Early-1-Specific T Cell Responses Provide Protection for CMV Infection After Kidney Transplantation: Anti-CMV T Cell Response and CMV Infection. *Am J Transplant*. 2013 Jul;13(7):1793–805.
75. Brayman KL, Dafoe DC, Smythe WR, Barker CF, Perloff LJ, Naji A, et al. Prophylaxis of serious cytomegalovirus infection in renal transplant candidates using live human cytomegalovirus vaccine. Interim results of a randomized controlled trial. *Arch Surg Chic Ill 1960*. 1988 Dec;123(12):1502–8.
76. Sagedal S, Hartmann A, Nordal KP, Osnes K, Leivestad T, Foss A, et al. Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int*. 2004 Jul;66(1):329–37.
77. Atabani SF, Smith C, Atkinson C, Aldridge RW, Rodriguez-Perálvarez M, Rolando N, et al. Cytomegalovirus Replication Kinetics in Solid Organ Transplant Recipients Managed by Preemptive Therapy: CMV and Preemptive Antiviral Therapy. *Am J Transplant*. 2012 Sep;12(9):2457–64.
78. Erdbruegger U, Scheffner I, Mengel M, Schwarz A, Verhagen W, Haller H, 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 Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2012 Jan;27(1):435–43.
79. Hughes D, Hafferty J, Fulton L, Friend P, Devaney A, Loke J, et al. Donor and recipient CMV serostatus and antigenemia after renal transplantation: An analysis of 486 patients. *J Clin Virol*. 2008 Feb;41(2):92–5.
80. Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, Sund S, Scott H, Degré M, et al. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2002 Oct;2(9):850–6.

81. Nett PC, Heisey DM, Fernandez LA, Sollinger HW, Pirsch JD. Association of Cytomegalovirus Disease and Acute Rejection with Graft Loss in Kidney Transplantation: Transplantation. 2004 Oct;78(7):1036–41.
82. Razonable RR, Rivero A, Rodriguez A, Wilson J, Daniels J, Jenkins G, et al. Allograft rejection predicts the occurrence of late-onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV-mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir. *J Infect Dis*. 2001 Dec 1;184(11):1461–4.
83. 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 Dec 27;68(12):1879–83.
84. Helantera I, Koskinen P, Tornroth T, Loginov R, Gronhagen-Riska C, Lautenschlager I. The impact of cytomegalovirus infections and acute rejection episodes on the development of vascular changes in 6-month protocol biopsy specimens of cadaveric kidney allograft recipients: *Transplantation*. 2003 Jun;75(11):1858–64.
85. Helanterä I, Koskinen P, Finne P, Loginov R, Kyllönen L, Salmela K, et al. Persistent cytomegalovirus infection in kidney allografts is associated with inferior graft function and survival. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2006 Nov;19(11):893–900.
86. Dzabic M, Rahbar A, Yaiw K-C, Naghibi M, Religa P, Fellstrom B, et al. Intragraft Cytomegalovirus Protein Expression Is Associated With Reduced Renal Allograft Survival. *Clin Infect Dis*. 2011 Nov 15;53(10):969–76.
87. Christie JD, Edwards LB, Aurora P, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report—2009. *J Heart Lung Transplant*. 2009 Oct;28(10):1031–49.
88. Costanzo MR, Naftel DC, Pritzker MR, Heilman JK, Boehmer JP, Brozena SC, et al. Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors. *Cardiac Transplant Research Database. J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 1998 Aug;17(8):744–53.
89. Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dipchand AI, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th Official Adult Heart Transplant Report—2012. *J Heart Lung Transplant*. 2012 Oct;31(10):1052–64.
90. Künsebeck HW, Kugler C, Fischer S, Simon AR, Gottlieb J, Welte T, et al. Quality of life and bronchiolitis obliterans syndrome in patients after lung transplantation. *Prog Transplant Aliso Viejo Calif*. 2007 Jun;17(2):136–41.
91. 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 Jun 15;181(12):1391–6.
92. Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dipchand AI, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-first Official Adult Heart Transplant Report—2014; Focus Theme: Retransplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014 Oct;33(10):996–1008.
93. Taylor DO, Stehlik J, Edwards LB, Aurora P, Christie JD, Dobbels F, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Heart Transplant Report-2009. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2009 Oct;28(10):1007–22.
94. Chantranuwat C, Blakey JD, Kobashigawa JA, Moriguchi JD, Laks H, Vassilakis ME, et al. Sudden, unexpected death in cardiac transplant recipients: an autopsy study. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2004 Jun;23(6):683–9.

95. Hussain T, Burch M, Fenton MJ, Whitmore PM, Rees P, Elliott M, et al. Positive Pretransplantation Cytomegalovirus Serology Is a Risk Factor for Cardiac Allograft Vasculopathy in Children. *Circulation*. 2007 Mar 19;115(13):1798–805.
96. Mehra MR, Crespo-Leiro MG, Dipchand A, Ensminger SM, Hiemann NE, Kobashigawa JA, et al. International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation of a standardized nomenclature for cardiac allograft vasculopathy—2010. *J Heart Lung Transplant*. 2010 Jul;29(7):717–27.
97. Kobashigawa JA, Tobis JM, Starling RC, Tuzcu EM, Smith AL, Valentine HA, et al. Multicenter Intravascular Ultrasound Validation Study Among Heart Transplant Recipients. *J Am Coll Cardiol*. 2005 May;45(9):1532–7.
98. Tuzcu EM, Kapadia SR, Sachar R, Ziada KM, Crowe TD, Feng J, et al. Intravascular ultrasound evidence of angiographically silent progression in coronary atherosclerosis predicts long-term morbidity and mortality after cardiac transplantation. *J Am Coll Cardiol*. 2005 May 3;45(9):1538–42.
99. Lu W, Palatnik K, Fishbein GA, Lai C, Levi DS, Perens G, et al. Diverse morphologic manifestations of cardiac allograft vasculopathy: A pathologic study of 64 allograft hearts. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Sep;30(9):1044–50.
100. Van Hoffen E, Gmelig-Meyling FH, Bosboom-Kalsbeek KC, Hu H, De Jonge N, Tilanus MG, et al. Cytokine messenger RNA expression by donor-specific cytotoxic T-cell clones after allogeneic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 1997 Feb;16(2):216–21.
101. Tellides G, Tereb DA, Kirkiles-Smith NC, Kim RW, Wilson JH, Schechner JS, et al. Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes. *Nature*. 2000 Jan 13;403(6766):207–11.
102. Wang Y, Bai Y, Qin L, Zhang P, Yi T, Teesdale SA, et al. Interferon-gamma induces human vascular smooth muscle cell proliferation and intimal expansion by phosphatidylinositol 3-kinase dependent mammalian target of rapamycin raptor complex 1 activation. *Circ Res*. 2007 Sep 14;101(6):560–9.
103. Shiao SL, Kirkiles-Smith NC, Shepherd BR, McNiff JM, Carr EJ, Pober JS. Human effector memory CD4+ T cells directly recognize allogeneic endothelial cells in vitro and in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Oct 1;179(7):4397–404.
104. Jane-wit D, Manes TD, Yi T, Qin L, Clark P, Kirkiles-Smith NC, et al. Alloantibody and Complement Promote T Cell-Mediated Cardiac Allograft Vasculopathy Through Noncanonical Nuclear Factor- κ B Signaling in Endothelial Cells. *Circulation*. 2013 Dec 3;128(23):2504–16.
105. Seki A, Fishbein MC. Predicting the development of cardiac allograft vasculopathy. *Cardiovasc Pathol*. 2014 Sep;23(5):253–60.
106. Delgado JF, Reyne AG, de Dios S, López-Medrano F, Jurado A, Juan RS, et al. Influence of cytomegalovirus infection in the development of cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2015 Aug;34(8):1112–9.
107. Mehra MR. Contemporary Concepts in Prevention and Treatment of Cardiac Allograft Vasculopathy. *Am J Transplant*. 2006 Jun;6(6):1248–56.
108. Nytrøen K, Rustad LA, Erikstad I, Aukrust P, Ueland T, Lekva T, et al. Effect of high-intensity interval training on progression of cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2013 Nov;32(11):1073–80.
109. Topilsky Y, Gandhi MJ, Hasin T, Voit LL, Raichlin E, Boilson BA, et al. Donor-specific antibodies to class II antigens are associated with accelerated cardiac allograft vasculopathy: a three-dimensional volumetric intravascular ultrasound study. *Transplantation*. 2013 Jan 27;95(2):389–96.

110. Frank R, Molina MR, Goldberg LR, Wald JW, Kamoun M, Lal P. Circulating donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies and complement C4d deposition are associated with the development of cardiac allograft vasculopathy. *Am J Clin Pathol*. 2014 Dec;142(6):809–15.
111. Tran A, Fixler D, Huang R, Meza T, Lacelle C, Das BB. Donor-specific HLA alloantibodies: Impact on cardiac allograft vasculopathy, rejection, and survival after pediatric heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2016 Jan;35(1):87–91.
112. Nath DS, Ilias Basha H, Tiriveedhi V, Alur C, Phelan D, Ewald GA, et al. Characterization of immune responses to cardiac self-antigens myosin and vimentin in human cardiac allograft recipients with antibody-mediated rejection and cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2010 Nov;29(11):1277–85.
113. Grattan MT. Cytomegalovirus Infection Is Associated With Cardiac Allograft Rejection and Atherosclerosis. *JAMA J Am Med Assoc*. 1989 Jun 23;261(24):3561.
114. Gao SZ, Hunt SA, Schroeder JS, Alderman EL, Hill IR, Stinson EB. Early development of accelerated graft coronary artery disease: risk factors and course. *J Am Coll Cardiol*. 1996 Sep;28(3):673–9.
115. Fateh-Moghadam S, Bocksch W, Wessely R, Jäger G, Hetzer R, Gawaz M. Cytomegalovirus infection status predicts progression of heart-transplant vasculopathy. *Transplantation*. 2003 Nov 27;76(10):1470–4.
116. Potena L, Grigioni F, Ortolani P, Magnani G, Marrozzini C, Falchetti E, et al. Relevance of cytomegalovirus infection and coronary-artery remodeling in the first year after heart transplantation: a prospective three-dimensional intravascular ultrasound study. *Transplantation*. 2003 Mar 27;75(6):839–43.
117. Chen R, Xiong S, Yang Y, Fu W, Wang Y, Ge J. The relationship between human cytomegalovirus infection and atherosclerosis development. *Mol Cell Biochem*. 2003 Jul;249(1-2):91–6.
118. Muhlestein JB, Horne BD, Carlquist JF, Madsen TE, Bair TL, Pearson RR, et al. Cytomegalovirus seropositivity and C-reactive protein have independent and combined predictive value for mortality in patients with angiographically demonstrated coronary artery disease. *Circulation*. 2000 Oct 17;102(16):1917–23.
119. Eryol NK, Kiliç H, Gül A, Ozdogru I, Inanç T, Dogan A, et al. Are the high levels of cytomegalovirus antibodies a determinant in the development of coronary artery disease? *Int Heart J*. 2005 Mar;46(2):205–9.
120. Blum A, Peleg A, Weinberg M. Anti-cytomegalovirus (CMV) IgG antibody titer in patients with risk factors to atherosclerosis. *Clin Exp Med*. 2003 Nov;3(3):157–60.
121. Petrakopoulou P, Kübrich M, Pehlivanli S, Meiser B, Reichart B, von Scheidt W, et al. Cytomegalovirus infection in heart transplant recipients is associated with impaired endothelial function. *Circulation*. 2004 Sep 14;110(11 Suppl 1):II207–212.
122. Reinders MEJ, Fang JC, Wong W, Ganz P, Briscoe DM. EXPRESSION PATTERNS OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN HUMAN CARDIAC ALLOGRAFTS: ASSOCIATION WITH REJECTION. *Transplantation*. 2003 Jul;76(1):224–30.
123. Pilmore HL, Eris JM, Painter DM, Bishop GA, McCaughan GW. Vascular endothelial growth factor expression in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation*. 1999 Mar 27;67(6):929–33.
124. Hertig A, Verine J, Mougenot B, Jouanneau C, Ouali N, Sebe P, et al. Risk Factors for Early Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Grafts. *Am J Transplant*. 2006 Dec;6(12):2937–46.

125. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Fibroblasts in Kidney Fibrosis Emerge via Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *J Am Soc Nephrol.* 2008 Nov 19;19(12):2282–7.
126. Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T, Miyazono K. Snail is required for TGF β -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Sci.* 2008 Oct 15;121(20):3317–24.
127. Streblov DN, Kreklywich CN, Andoh T, Moses AV, Dumortier J, Smith PP, et al. The Role of Angiogenic and Wound Repair Factors During CMV-Accelerated Transplant Vascular Sclerosis in Rat Cardiac Transplants: CMV Accelerated TVS Involves Angiogenesis and Wound Healing. *Am J Transplant.* 2008 Feb;8(2):277–87.
128. Dumortier J, Streblov DN, Moses AV, Jacobs JM, Kreklywich CN, Camp D, et al. Human Cytomegalovirus Secretome Contains Factors That Induce Angiogenesis and Wound Healing. *J Virol.* 2008 Jul 1;82(13):6524–35.
129. Botto S, Streblov DN, DeFilippis V, White L, Kreklywich CN, Smith PP, et al. IL-6 in human cytomegalovirus secretome promotes angiogenesis and survival of endothelial cells through the stimulation of survivin. *Blood.* 2011 Jan 6;117(1):352–61.
130. Assinger A, Kral JB, Yaiw KC, Schrottmaier WC, Kurzejamska E, Wang Y, et al. Human Cytomegalovirus-Platelet Interaction Triggers Toll-Like Receptor 2-Dependent Proinflammatory and Proangiogenic Responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Apr 1;34(4):801–9.
131. Yaiw K-C, Mohammad A-A, Costa H, Taher C, Badrnya S, Assinger A, et al. Human Cytomegalovirus Up-Regulates Endothelin Receptor Type B: Implication for Vasculopathies? *Open Forum Infect Dis.* 2015 Dec;2(4):ofv155.
132. Ma L-J, Yang H, Gaspert A, Carlesso G, Barty MM, Davidson JM, et al. Transforming growth factor-beta-dependent and -independent pathways of induction of tubulointerstitial fibrosis in beta6(-/-) mice. *Am J Pathol.* 2003 Oct;163(4):1261–73.
133. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, et al. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell.* 1999 Feb 5;96(3):319–28.
134. Tikkanen JM, Kallio EA, Bruggeman CA, Koskinen PK, Lemström KB. Prevention of Cytomegalovirus Infection-enhanced Experimental Obliterative Bronchiolitis by Antiviral Prophylaxis or Immunosuppression in Rat Tracheal Allografts. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Aug 15;164(4):672–9.
135. Lemstrom K, Sihvola R, Bruggeman C, Hayry P, Koskinen P. Cytomegalovirus Infection Enhanced Cardiac Allograft Vasculopathy Is Abolished by DHPG Prophylaxis in the Rat. *Circulation.* 1997 Jun 17;95(12):2614–6.
136. Orloff SL, Hwee Y-K, Kreklywich C, Andoh TF, Hart E, Smith PA, et al. Cytomegalovirus Latency Promotes Cardiac Lymphoid Neogenesis and Accelerated Allograft Rejection in CMV Naïve Recipients: CMV Latency Promotes Cardiac TLOs. *Am J Transplant.* 2011 Jan;11(1):45–55.
137. Shimamura M, Saunders U, Rha B, Guo L, Cassady KA, George JF, et al. Ganciclovir Transiently Attenuates Murine Cytomegalovirus-Associated Renal Allograft Inflammation: Transplantation. 2011 Oct;92(7):759–66.
138. Shimamura M, Seleme MC, Guo L, Saunders U, Schoeb TR, George JF, et al. Ganciclovir Prophylaxis Improves Late Murine Cytomegalovirus-Induced Renal Allograft Damage: Transplant J. 2013 Jan;95(1):48–53.
139. Hodson EM, Jones CA, Webster AC, Strippoli GF, Barclay PG, Kable K, et al. Antiviral medications to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ

- transplants: a systematic review of randomised controlled trials. *The Lancet*. 2005 Jun;365(9477):2105–15.
140. Kalil AC, Levitsky J, Lyden E, Stoner J, Freifeld AG. Meta-analysis: the efficacy of strategies to prevent organ disease by cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Ann Intern Med*. 2005 Dec 20;143(12):870–80.
 141. Hodson EM, Ladhani M, Webster AC, Strippoli GF, Craig JC. Antiviral medications for preventing cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. In: *The Cochrane Collaboration, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013 [cited 2016 Nov 30]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD003774.pub4>
 142. Opelz G, Döhler B. Reduced rate of cardiovascular death after cytomegalovirus prophylaxis in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2015 Jun;99(6):1197–202.
 143. Kliem V, Fricke L, Wollbrink T, Burg M, Radermacher J, Rohde F. Improvement in long-term renal graft survival due to CMV prophylaxis with oral ganciclovir: results of a randomized clinical trial. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2008 May;8(5):975–83.
 144. Arora S, Andreassen AK, Andersson B, Gustafsson F, Eiskjaer H, Bøtker HE, et al. The Effect of Everolimus Initiation and Calcineurin Inhibitor Elimination on Cardiac Allograft Vasculopathy in *De Novo* Recipients: One-Year Results of a Scandinavian Randomized Trial: Everolimus and Cardiac Allograft Vasculopathy. *Am J Transplant*. 2015 Jul;15(7):1967–75.
 145. Crough T, Khanna R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Jan 1;22(1):76–98.
 146. Lopez-Verges S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, et al. Expansion of a unique CD57+NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 Sep 6;108(36):14725–32.
 147. Hendricks DW, Balfour HH, Dunmire SK, Schmeling DO, Hogquist KA, Lanier LL. Cutting Edge: NKG2ChiCD57+ NK Cells Respond Specifically to Acute Infection with Cytomegalovirus and Not Epstein-Barr Virus. *J Immunol*. 2014 May 15;192(10):4492–6.
 148. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Pitt M, Curtsinger J, Luo X, et al. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood*. 2012 Mar 15;119(11):2665–74.
 149. Rölle A, Pollmann J, Ewen E-M, Le VTK, Halenius A, Hengel H, et al. IL-12–producing monocytes and HLA-E control HCMV-driven NKG2C+ NK cell expansion. *J Clin Invest*. 2014 Dec 1;124(12):5305–16.
 150. Wu Z, Sinzger C, Frascaroli G, Reichel J, Bayer C, Wang L, et al. Human Cytomegalovirus-Induced NKG2Chi CD57hi Natural Killer Cells Are Effectors Dependent on Humoral Antiviral Immunity. *J Virol*. 2013 Jul 1;87(13):7717–25.
 151. Déchanet J, Merville P, Bergé F, Bone-Mane G, Taupin J, Michel P, et al. Major Expansion of $\gamma\delta$ T Lymphocytes following Cytomegalovirus Infection in Kidney Allograft Recipients. *J Infect Dis*. 1999 Jan;179(1):1–8.
 152. Pitard V, Roumanes D, Lafarge X, Couzi L, Garrigue I, Lafon M-E, et al. Long-term expansion of effector/memory V 2- T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood*. 2008 May 13;112(4):1317–24.
 153. Alejef A, Pachnio A, Halawi M, Christmas SE, Moss PAH, Khan N. Cytomegalovirus drives V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T cell inflation in many healthy virus carriers with increasing age: CMV distorts $\gamma\delta$ T cells over time. *Clin Exp Immunol*. 2014 Jun;176(3):418–28.
 154. Couzi L, Pitard V, Moreau J-F, Merville P, DÃ©chanet-Merville J. Direct and Indirect Effects of Cytomegalovirus-Induced $\hat{I}^3\hat{I}^1$ T Cells after Kidney Transplantation. *Front Immunol [Internet]*.

2015 Jan 21 [cited 2015 Nov 10];6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00003/abstract>

155. Willcox CR, Pitard V, Netzer S, Couzi L, Salim M, Silberzahn T, et al. Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human $\gamma\delta$ T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat Immunol*. 2012 Aug 12;13(9):872–9.
156. Reeves MB, Sinclair JH. Circulating Dendritic Cells Isolated from Healthy Seropositive Donors Are Sites of Human Cytomegalovirus Reactivation In Vivo. *J Virol*. 2013 Oct 1;87(19):10660–7.
157. Coronel R, Takayama S, Juwono T, Hertel L. Dynamics of Human Cytomegalovirus Infection in CD34⁺ Hematopoietic Cells and Derived Langerhans-Type Dendritic Cells. Sandri-Goldin RM, editor. *J Virol*. 2015 May 15;89(10):5615–32.
158. Del Prete A, Luganini A, Scutera S, Rossi S, Anselmo A, Greco D, et al. Interferon- α Production by Plasmacytoid Dendritic Cells Is Dispensable for an Effective Anti-Cytomegalovirus Response in Adaptor Protein-3-Deficient Mice. *J Interferon Cytokine Res*. 2015 Mar;35(3):232–8.
159. Delale T, Paquin A, Asselin-Paturel C, Dalod M, Brizard G, Bates EEM, et al. MyD88-Dependent and -Independent Murine Cytomegalovirus Sensing for IFN- Release and Initiation of Immune Responses In Vivo. *J Immunol*. 2005 Nov 15;175(10):6723–32.
160. Hokeness-Antonelli KL, Crane MJ, Dragoi AM, Chu W-M, Salazar-Mather TP. IFN- α -mediated inflammatory responses and antiviral defense in liver is TLR9-independent but MyD88-dependent during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Nov 1;179(9):6176–83.
161. Boehme KW, Guerrero M, Compton T. Human Cytomegalovirus Envelope Glycoproteins B and H Are Necessary for TLR2 Activation in Permissive Cells. *J Immunol*. 2006 Nov 15;177(10):7094–102.
162. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, et al. Human Cytomegalovirus Activates Inflammatory Cytokine Responses via CD14 and Toll-Like Receptor 2. *J Virol*. 2003 Apr 15;77(8):4588–96.
163. Landais I, Pelton C, Streblov D, DeFilippis V, McWeeney S, Nelson JA. Human Cytomegalovirus miR-UL112-3p Targets TLR2 and Modulates the TLR2/IRAK1/NF κ B Signaling Pathway. Dittmer DP, editor. *PLOS Pathog*. 2015 May 8;11(5):e1004881.
164. Dammermann W, Bochmann D, Bentzien F, Komorowski L, Steinhagen K, Ullrich S, et al. CMV specific cytokine release assay in whole blood is optimized by combining synthetic CMV peptides and toll like receptor agonists. *J Immunol Methods*. 2014 Dec 1;414:82–90.
165. Santone M, Aprea S, Wu TYH, Cooke MP, Mbow ML, Valiante NM, et al. A new TLR2 agonist promotes cross-presentation by mouse and human antigen presenting cells. *Hum Vaccines Immunother*. 2015 Aug 3;11(8):2038–50.
166. Juckem LK, Boehme KW, Feire AL, Compton T. Differential Initiation of Innate Immune Responses Induced by Human Cytomegalovirus Entry into Fibroblast Cells. *J Immunol*. 2008 Apr 1;180(7):4965–77.
167. Spiller OB, Hanna SM, Devine DV, Tufaro F. Neutralization of cytomegalovirus virions: the role of complement. *J Infect Dis*. 1997 Aug;176(2):339–47.
168. Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine Transmission of Cytomegalovirus to Infants of Women with Preconceptional Immunity. *N Engl J Med*. 2001 May 3;344(18):1366–71.
169. Meyer-König U, Ebert K, Schrage B, Pollak S, Hufert FT. Simultaneous infection of healthy people with multiple human cytomegalovirus strains. *The Lancet*. 1998 Oct;352(9136):1280–1.
170. Hansen SG, Powers CJ, Richards R, Ventura AB, Ford JC, Siess D, et al. Evasion of CD8⁺ T Cells Is Critical for Superinfection by Cytomegalovirus. *Science*. 2010 Apr 2;328(5974):102–6.

171. Antoine P, Olislagers V, Huygens A, Lecomte S, Liesnard C, Donner C, et al. Functional Exhaustion of CD4⁺ T Lymphocytes during Primary Cytomegalovirus Infection. *J Immunol*. 2012 Sep 1;189(5):2665–72.
172. Asanuma H, Sharp M, Maecker HT, Maino VC, Arvin AM. Frequencies of memory T cells specific for varicella-zoster virus, herpes simplex virus, and cytomegalovirus by intracellular detection of cytokine expression. *J Infect Dis*. 2000 Mar;181(3):859–66.
173. Libri V, Azevedo RI, Jackson SE, Di Mitri D, Lachmann R, Fuhrmann S, et al. Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4⁺ CD45RA⁺ CD27⁻ T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process: IL-7 induces re-expression of CD45RA in CD4⁺ T cells. *Immunology*. 2011 Mar;132(3):326–39.
174. Van Leeuwen EMM, Remmerswaal EBM, Heemskerk MHM, ten Berge IJM, van Lier RAW. Strong selection of virus-specific cytotoxic CD4⁺ T-cell clones during primary human cytomegalovirus infection. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):3121–7.
175. Van Leeuwen EMM, Remmerswaal EBM, Vossen MTM, Rowshani AT, Wertheim-van Dillen PME, van Lier RAW, et al. Emergence of a CD4⁺CD28⁻ Granzyme B⁺, Cytomegalovirus-Specific T Cell Subset after Recovery of Primary Cytomegalovirus Infection. *J Immunol*. 2004 Aug 1;173(3):1834–41.
176. 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 Dec 15;175(12):8218–25.
177. Hooper M, Kallas EG, Coffin D, Campbell D, Evans TG, Looney RJ. Cytomegalovirus seropositivity is associated with the expansion of CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ T cells in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1999 Jul;26(7):1452–7.
178. Pierer M, Rothe K, Quandt D, Schulz A, Rossol M, Scholz R, et al. Association of anticytomegalovirus seropositivity with more severe joint destruction and more frequent joint surgery in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012 Jun;64(6):1740–9.
179. Markovic-Plese S, Cortese I, Wandinger KP, McFarland HF, Martin R. CD4⁺CD28⁻ costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2001 Oct;108(8):1185–94.
180. Duftner C, Goldberger C, Falkenbach A, Würzner R, Falkensammer B, Pfeiffer KP, et al. Prevalence, clinical relevance and characterization of circulating cytotoxic CD4⁺CD28⁻ T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(5):R292–300.
181. Giscombe R, Nityanand S, Lewin N, Grunewald J, Lefvert AK. Expanded T cell populations in patients with Wegener's granulomatosis: characteristics and correlates with disease activity. *J Clin Immunol*. 1998 Nov;18(6):404–13.
182. García de Tena J, Manzano L, Leal JC, San Antonio E, Sualdea V, Alvarez-Mon M. Active Crohn's disease patients show a distinctive expansion of circulating memory CD4⁺CD45RO⁺CD28^{null} T cells. *J Clin Immunol*. 2004 Mar;24(2):185–96.
183. Shabir S, Smith H, Kaul B, Pachnio A, Jham S, Kuravi S, et al. Cytomegalovirus-Associated CD4⁺ CD28^{null} Cells in NKG2D-Dependent Glomerular Endothelial Injury and Kidney Allograft Dysfunction. *Am J Transplant*. 2016 Apr;16(4):1113–28.
184. Pourgheysari B, Khan N, Best D, Bruton R, Nayak L, Moss PAH. The Cytomegalovirus-Specific CD4⁺ T-Cell Response Expands with Age and Markedly Alters the CD4⁺ T-Cell Repertoire. *J Virol*. 2007 Jul 15;81(14):7759–65.
185. Van Bergen J, Kooy-Winkelaar EMC, van Dongen H, van Gaalen FA, Thompson A, Huizinga TWJ, et al. Functional Killer Ig-Like Receptors on Human Memory CD4⁺ T Cells Specific for Cytomegalovirus. *J Immunol*. 2009 Apr 1;182(7):4175–82.
186. Terrazzini N, Bajwa M, Vita S, Cheek E, Thomas D, Seddiki N, et al. A Novel Cytomegalovirus-Induced Regulatory-Type T-Cell Subset Increases in Size During Older Life

- and Links Virus-Specific Immunity to Vascular Pathology. *J Infect Dis.* 2014 May 1;209(9):1382–92.
187. Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. *J Exp Med.* 1997 Nov 3;186(9):1407–18.
 188. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999 Oct 14;401(6754):708–12.
 189. Shin H, Iwasaki A. Tissue-resident memory T cells. *Immunol Rev.* 2013 Sep;255(1):165–81.
 190. Thom JT, Oxenius A. Tissue-resident memory T cells in cytomegalovirus infection. *Curr Opin Virol.* 2016 Feb;16:63–9.
 191. Frost EL, Kersh AE, Evavold BD, Lukacher AE. Cutting Edge: Resident Memory CD8 T Cells Express High-Affinity TCRs. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2015 Oct 15;195(8):3520–4.
 192. Mackay LK, Minnich M, Kragten NAM, Liao Y, Nota B, Seillet C, et al. Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science.* 2016 Apr 22;352(6284):459–63.
 193. Gillespie GM, Wills MR, Appay V, O’Callaghan C, Murphy M, Smith N, et al. Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8⁽⁺⁾ T lymphocytes in healthy seropositive donors. *J Virol.* 2000 Sep;74(17):8140–50.
 194. Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2002 Aug 15;169(4):1984–92.
 195. Wallace DL, Masters JE, de Lara CM, Henson SM, Worth A, Zhang Y, et al. Human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell expansions contain long-lived cells that retain functional capacity in both young and elderly subjects: Lifespan and function of HCMV-specific CD8 expansions. *Immunology.* 2011 Jan;132(1):27–38.
 196. Komatsu H, Sierro S, V. Cuero A, Klenerman P. Population analysis of antiviral T cell responses using MHC class I-peptide tetramers. *Clin Exp Immunol.* 2003 Oct;134(1):9–12.
 197. Khan N, Cobbold M, Keenan R, Moss PAH. Comparative analysis of CD8⁺ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype. *J Infect Dis.* 2002 Apr 15;185(8):1025–34.
 198. Calarota SA, Chiesa A, Scaramuzzi L, Adzasehoun KMG, Comolli G, Mangione F, et al. Normalizing ELISPOT responses to T-cell counts: A novel approach for quantification of HCMV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses in kidney transplant recipients. *J Clin Virol.* 2014 Sep;61(1):65–73.
 199. Ozdemir E. Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific CD8⁺ T cells. *Blood.* 2002 Nov 15;100(10):3690–7.
 200. McKinney EF, Lee JC, Jayne DRW, Lyons PA, Smith KGC. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature.* 2015 Jun 29;523(7562):612–6.
 201. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011 Jun;131(6):492–9.
 202. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992 Nov;11(11):3887–95.
 203. Chinai JM, Janakiram M, Chen F, Chen W, Kaplan M, Zang X. New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. *Trends Pharmacol Sci.* 2015 Sep;36(9):587–95.

204. Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med*. 2012 Jun 4;209(6):1201–17.
205. 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 Oct;16(10):1147–51.
206. 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 Feb 15;84(4):2078–89.
207. Klenerman P, Oxenius A. T cell responses to cytomegalovirus. *Nat Rev Immunol*. 2016 Apr 25;16(6):367–77.
208. Speiser DE, Utzschneider DT, Oberle SG, Münz C, Romero P, Zehn D. T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion? *Nat Rev Immunol*. 2014 Sep 26;14(11):768–74.
209. Viganò S, Banga R, Bellanger F, Pellaton C, Farina A, Comte D, et al. CD160-Associated CD8 T-Cell Functional Impairment Is Independent of PD-1 Expression. Silvestri G, editor. *PLoS Pathog*. 2014 Sep 25;10(9):e1004380.
210. Schlaphoff V, Lunemann S, Suneetha PV, Jaroszewicz J, Grabowski J, Dietz J, et al. Dual Function of the NK Cell Receptor 2B4 (CD244) in the Regulation of HCV-Specific CD8⁺ T Cells. Walker CM, editor. *PLoS Pathog*. 2011 May 19;7(5):e1002045.
211. Sester U, Presser D, Dirks J, Gärtner BC, Köhler H, Sester M. PD-1 Expression and IL-2 Loss of Cytomegalovirus-Specific T Cells Correlates with Viremia and Reversible Functional Anergy: PD-1 Expression and IL-2 Loss in CMV Viremia. *Am J Transplant*. 2008 Jul;8(7):1486–97.
212. Dirks J, Egli A, Sester U, Sester M, Hirsch HH. Blockade of programmed death receptor-1 signaling restores expression of mostly proinflammatory cytokines in anergic cytomegalovirus-specific T cells. *Transpl Infect Dis*. 2013 Feb;15(1):79–89.
213. Wikby A, Ferguson F, Strindhall J, Forsey RJ, Fulop T, Hadrup SR, et al. Immune Risk Phenotypes and Associated Parameters in Very Old Humans: A Review of Findings in the Swedish NONA Immune Longitudinal Study. In: *Immunosenescence* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2007 [cited 2016 Dec 31]. p. 1–14. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-76842-7_1
214. 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 Feb 15;176(4):2645–53.
215. Griffiths SJ, Riddell NE, Masters J, Libri V, Henson SM, Wertheimer A, et al. Age-Associated Increase of Low-Avidity Cytomegalovirus-Specific CD8⁺ T Cells That Re-Express CD45RA. *J Immunol*. 2013 Jun 1;190(11):5363–72.
216. Kato T, Nishida T, Ito Y, Murase M, Murata M, Naoe T. Correlations of programmed death 1 expression and serum IL-6 level with exhaustion of cytomegalovirus-specific T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cell Immunol*. 2014 Mar;288(1-2):53–9.
217. Jackson SE, Mason GM, Wills MR. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Res*. 2011 May;157(2):151–60.
218. Heatley SL, Pietra G, Lin J, Widjaja JML, Harpur CM, Lester S, et al. Polymorphism in Human Cytomegalovirus UL40 Impacts on Recognition of Human Leukocyte Antigen-E (HLA-E) by Natural Killer Cells. *J Biol Chem*. 2013 Mar 22;288(12):8679–90.

219. Djaoud Z, Riou R, Gavlovsky P-J, Mehlal S, Bressollette C, Gérard N, et al. Cytomegalovirus-Infected Primary Endothelial Cells Trigger NKG2C+ Natural Killer Cells. *J Innate Immun.* 2016 Apr 27;8(4):374–85.
220. 3C Study Collaborative Group, Haynes R, Harden P, Judge P, Blackwell L, Emberson J, et al. Alemtuzumab-based induction treatment versus basiliximab-based induction treatment in kidney transplantation (the 3C Study): a randomised trial. *Lancet Lond Engl.* 2014 Nov 8;384(9955):1684–90.
221. Gurkan S, Luan Y, Dhillon N, Allam SR, Montague T, Bromberg JS, et al. Immune Reconstitution Following Rabbit Antithymocyte Globulin: Immune Reconstitution. *Am J Transplant.* 2010 Sep;10(9):2132–41.
222. Longuet H, Sautenet B, Gatault P, Thibault G, Barbet C, Marliere J-F, et al. Risk factors for impaired CD4⁺ T-cell reconstitution following rabbit antithymocyte globulin treatment in kidney transplantation. *Transpl Int.* 2014 Mar;27(3):271–9.
223. Gamadia LE, Rentenaar RJ, Baars PA, Remmerswaal EB, Surachno S, Weel JF, et al. Differentiation of cytomegalovirus-specific CD8(+) T cells in healthy and immunosuppressed virus carriers. *Blood.* 2001 Aug 1;98(3):754–61.
224. Webster AC, Ruster LP, McGee RG, Matheson SL, Higgins GY, Willis NS, et al. Interleukin 2 receptor antagonists for kidney transplant recipients. In: *The Cochrane Collaboration, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet].* Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2010 [cited 2016 Nov 1]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD003897.pub3>
225. San-Juan R, Comoli P, Caillard S, Moulin B, Hirsch H., Meylan P. Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Sep;20:109–18.
226. Jamal AJ, Husain S, Li Y, Famure O, Kim SJ. Risk Factors for Late-Onset Cytomegalovirus Infection or Disease in Kidney Transplant Recipients: Transplantation. 2014 Mar;97(5):569–75.
227. Luan FL, Kommareddi M, Ojo AO. Impact of Cytomegalovirus Disease in D+/R- Kidney Transplant Patients Receiving 6 Months Low-Dose Valganciclovir Prophylaxis: CMV Disease and Low-Dose VGCV Prophylaxis. *Am J Transplant.* 2011 Sep;11(9):1936–42.
228. Kaminski H, Couzi L, Garrigue I, Moreau J-F, Déchanet-Merville J, Merville P. Easier Control of Late-Onset Cytomegalovirus Disease Following Universal Prophylaxis Through an Early Antiviral Immune Response in Donor-Positive, Recipient-Negative Kidney Transplants. *Am J Transplant.* 2016 Aug;16(8):2384–94.
229. San-Juan R, Navarro D, García-Reyne A, Montejo M, Muñoz P, Carratala J, et al. Effect of long-term prophylaxis in the development of cytomegalovirus-specific T-cell immunity in D+/R- solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2015 Oct;17(5):637–46.
230. Abate D, Saldan A, Fiscon M, Cofano S, Paciolla A, Furian L, et al. Evaluation of Cytomegalovirus (CMV)-Specific T Cell Immune Reconstitution Revealed That Baseline Antiviral Immunity, Prophylaxis, or Preemptive Therapy but not Antithymocyte Globulin Treatment Contribute to CMV-Specific T Cell Reconstitution in Kidney Transplant Recipients. *J Infect Dis.* 2010 Aug 15;202(4):585–94.
231. Havenith SHC, Remmerswaal EBM, Bemelman FJ, Yong SL, van Donselaar- van der Pant KAMI, van Lier RAW, et al. Rapid T cell repopulation after rabbit anti-thymocyte globulin (rATG) treatment is driven mainly by cytomegalovirus: CMV-driven T cell repopulation after ATG. *Clin Exp Immunol.* 2012 Sep;169(3):292–301.
232. Gatault P, Lebranchu Y. Conversion to mTOR-inhibitor-based immunosuppression: which patients and when? *Transplant Res.* 2013 Nov 20;2(Suppl 1):S3.

233. Gatault P, Bertrand D, Büchler M, Colosio C, Hurault de Ligny B, Weestel P-F, et al. Eight-year results of the Spiesser study, a randomized trial comparing *de novo* sirolimus and cyclosporine in renal transplantation. *Transpl Int*. 2016 Jan;29(1):41–50.
234. Euvrard S, Morelon E, Rostaing L, Goffin E, Brocard A, Tromme I, et al. Sirolimus and Secondary Skin-Cancer Prevention in Kidney Transplantation. *N Engl J Med*. 2012 Jul 26;367(4):329–39.
235. Tedesco-Silva H, Felipe C, Ferreira A, Cristelli M, Oliveira N, Sandes-Freitas T, et al. Reduced Incidence of Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients Receiving Everolimus and Reduced Tacrolimus Doses: Reduced CMV Infection With Everolimus. *Am J Transplant*. 2015 Oct;15(10):2655–64.
236. Strueber M, Warnecke G, Fuge J, Simon AR, Zhang R, Welte T, et al. Everolimus Versus Mycophenolate Mofetil *De Novo* After Lung Transplantation: A Prospective, Randomized, Open-Label Trial. *Am J Transplant*. 2016 Nov;16(11):3171–80.
237. Büchler M, Caillard S, Barbier S, Thervet E, Toupance O, Mazouz H, et al. Sirolimus Versus Cyclosporine in Kidney Recipients Receiving Thymoglobulin[®], Mycophenolate Mofetil and a 6-Month Course of Steroids. *Am J Transplant*. 2007 Nov;7(11):2522–31.
238. Andrassy J, Hoffmann VS, Rentsch M, Stangl M, Habicht A, Meiser B, et al. Is Cytomegalovirus Prophylaxis Dispensable in Patients Receiving an mTOR Inhibitor–Based Immunosuppression? A Systematic Review and Meta-Analysis: *Transplant J*. 2012 Dec;94(12):1208–17.
239. Poglitsch M, Weichhart T, Hecking M, Werzowa J, Katholnig K, Antlanger M, et al. CMV Late Phase-Induced mTOR Activation Is Essential for Efficient Virus Replication in Polarized Human Macrophages: Antiviral Effects of mTOR Inhibitors. *Am J Transplant*. 2012 Jun;12(6):1458–68.
240. Kudchodkar SB, Yu Y, Maguire TG, Alwine JC. Human Cytomegalovirus Infection Induces Rapamycin-Insensitive Phosphorylation of Downstream Effectors of mTOR Kinase. *J Virol*. 2004 Oct 15;78(20):11030–9.
241. Moorman NJ, Shenk T. Rapamycin-Resistant mTORC1 Kinase Activity Is Required for Herpesvirus Replication. *J Virol*. 2010 May 15;84(10):5260–9.
242. Glover TE, Kew VG, Reeves MB. Rapamycin does not inhibit human cytomegalovirus reactivation from dendritic cells in vitro. *J Gen Virol*. 2014 Oct 1;95(Pt_10):2260–6.
243. Havenith SHC, Yong SL, van Donselaar-van der Pant KAMI, van Lier RAW, ten Berge IJM, Bemelman FJ. Everolimus-Treated Renal Transplant Recipients Have a More Robust CMV-Specific CD8⁺ T-Cell Response Compared With Cyclosporine- or Mycophenolate-Treated Patients: *Transplant J*. 2013 Jan;95(1):184–91.
244. Zeevi A, Morel P, Spichty K, Dauber J, Yousem S, Williams P, et al. Clinical significance of CMV-specific T helper responses in lung transplant recipients. *Hum Immunol*. 1998 Dec;59(12):768–75.
245. Sester M, Sester U, Gärtner B, Heine G, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, et al. Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation*. 2001 May 15;71(9):1287–94.
246. Hassan-Walker AF, Vargas Cuero AL, Mattes FM, Klenerman P, Lechner F, Burroughs AK, et al. CD8⁺ Cytotoxic Lymphocyte Responses against Cytomegalovirus after Liver Transplantation: Correlation with Time from Transplant to Receipt of Tacrolimus. *J Infect Dis*. 2001 Mar 15;183(6):835–43.
247. Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, Habedank D, Hetzer R, Cherepnev G, et al. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med*. 2005 Apr 4;201(7):1031–6.

248. Gerna G, Lilleri D, Fornara C, Comolli G, Lozza L, Campana C, et al. Monitoring of Human Cytomegalovirus-Specific CD4⁺ and CD8⁺ T-Cell Immunity in Patients Receiving Solid Organ Transplantation. *Am J Transplant*. 2006 Oct;6(10):2356–64.
249. Egli A, Binet I, Binggeli S, Jäger C, Dumoulin A, Schaub S, et al. Cytomegalovirus-specific T-cell responses and viral replication in kidney transplant recipients. *J Transl Med*. 2008;6(1):29.
250. 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 Dec 15;55(12):1678–89.
251. Abate D, Saldan A, Mengoli C, Fiscon M, Silvestre C, Fallico L, et al. Comparison of Cytomegalovirus (CMV) Enzyme-Linked Immunosorbent Spot and CMV Quantiferon Gamma Interferon-Releasing Assays in Assessing Risk of CMV Infection in Kidney Transplant Recipients. *J Clin Microbiol*. 2013 Aug 1;51(8):2501–7.
252. Manuel O, Husain S, Kumar D, Zayas C, Mawhorter S, Levi ME, et al. Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2013 Mar;56(6):817–24.
253. Lucia M, Crespo E, Melilli E, Cruzado JM, Luque S, Llaudo I, et al. Preformed Frequencies of Cytomegalovirus (CMV)-Specific Memory T and B Cells Identify Protected CMV-Sensitized Individuals Among Seronegative Kidney Transplant Recipients. *Clin Infect Dis*. 2014 Dec 1;59(11):1537–45.
254. Snyder LD, Medinas R, Chan C, Sparks S, Davis WA, Palmer SM, et al. Polyfunctional Cytomegalovirus-Specific Immunity in Lung Transplant Recipients Receiving Valganciclovir Prophylaxis: CMV Immunity with Valganciclovir. *Am J Transplant*. 2011 Mar;11(3):553–60.
255. Snyder LD, Chan C, Kwon D, Yi JS, Martissa JA, Copeland CAF, et al. Polyfunctional T-Cell Signatures to Predict Protection from Cytomegalovirus after Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Jan;193(1):78–85.
256. Kaminski H, Garrigue I, Couzi L, Taton B, Bachelet T, Moreau J-F, et al. Surveillance of T Cells Predicts Cytomegalovirus Infection Resolution in Kidney Transplants. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Feb 1;27(2):637–45.
257. Tu W, Potena L, Stepick-Biek P, Liu L, Dionis KY, Luikart H, et al. T-Cell Immunity to Subclinical Cytomegalovirus Infection Reduces Cardiac Allograft Disease. *Circulation*. 2006 Oct 2;114(15):1608–15.
258. Nickel P, Bold G, Presber F, Biti D, Babel N, Kreutzer S, et al. High levels of CMV-IE-1-specific memory T cells are associated with less alloimmunity and improved renal allograft function. *Transpl Immunol*. 2009 Mar;20(4):238–42.
259. Tong CYW, Bakran A, Peiris JSM, Muir P, Herrington CS. The association of viral infection and chronic allograft nephropathy with graft dysfunction after renal transplantation. *Transplantation*. 2002 Aug 27;74(4):576–8.
260. 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 Oct 1;24(10):1698–708.
261. Ding H, Wu X, Gao W. PD-L1 is expressed by human renal tubular epithelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. *Clin Immunol*. 2005 May;115(2):184–91.
262. Jaworska K, Ratajczak J, Huang L, Whalen K, Yang M, Stevens BK, et al. Both PD-1 Ligands Protect the Kidney from Ischemia Reperfusion Injury. *J Immunol*. 2015 Jan 1;194(1):325–33.

Philippe Gatault

Infection du donneur par le CMV et transplantation d'organe : impact sur la réponse immunitaire spécifique et sur la survie des greffons.

Introduction : l'infection par le cytomégalovirus (CMV) humain est la plus fréquente des infections après greffe d'organe. Des effets indirects à long terme sont fortement suspectés mais restent encore largement incompris. Notre travail de thèse s'est intéressé à mieux comprendre les conséquences de l'infection du donneur par le CMV sur la réponse immunitaire du receveur et sur le devenir de son greffon. **Résultat :** nous avons initialement rapporté que l'infection du donneur (D+) par le CMV est un facteur de risque indépendant de perte de fonction du greffon rénal particulièrement si le receveur est également séropositif avant la greffe (D+R+ comparé aux D+R-). Le risque est fortement majoré en cas de mésappariement complet en HLA de classe I entre le receveur et son donneur. Puis nous avons analysé le rôle du greffon infecté dans le développement de la réponse lymphocytaire anti-CMV. Nous avons rapporté pour la première fois que la superinfection CMV entraîne une augmentation du nombre de LT CD8 répondeurs spécifiques du CMV à distance de la transplantation, à condition que le donneur et le receveur partagent des identités HLA-I. De plus nous avons montré chez le sujet D+R- que l'expansion des lymphocytes T CD8 anti CMV restreints par le HLA-A2 nécessite l'expression de ce HLA par le donneur. Ces résultats ensemble indiquent le rôle des cellules du donneur dans l'inflation des LT CD8 anti-CMV à distance de la greffe. Dans un troisième travail, nous avons montré qu'un polymorphisme du gène de Programmed Cell Death 1 (PD-1.3) influe sur la survie des greffons rénaux et pulmonaires D+, les patients porteurs de l'allèle variant A ayant un meilleur pronostic que les patients homozygotes GG. Nos données indiquent aussi que les patients homozygotes AA ont un plus grand nombre de lymphocytes anti-CMV producteurs d'IFN- γ , suggérant que ce polymorphisme pourrait être associé à une dysfonction de la réponse immunitaire spécifique anti-CMV. **Conclusion :** ensemble ces données suggèrent pour la première fois que la qualité de la réponse lymphocytaire cytotoxique anti-CMV pourrait être importante pour contrôler la réplication virale dans le greffon et les lésions induites par cette dernière. Ainsi nous proposons deux mécanismes à l'origine du développement des lésions liées à l'infection à CMV dans le rein: défaut de reconnaissance des cellules allogéniques infectées en cas de mésappariement complet en HLA de classe I et une dysfonction LT CD8 anti-CMV.

Abstract

Background: cytomegalovirus (CMV) is the leading cause of viral infection after solid organ transplantation. Despite a large body of literature, the effects of chronic cytomegalovirus (CMV) infection on graft outcome remain controversial. **Results:** we first reported that donor CMV infection (D+) was an independent risk factor of kidney graft loss, especially in pretransplant infected recipients (R+). In addition, we observed that full HLA-I mismatching was an important determinant of this risk. In a second study, we focused on effect of donor CMV infection on anti-CMV specific immune response. We reported that CMV superinfection greatly increased the number of anti-CMV IFN- γ -producing T cells, provided that donor and recipient shared at least one HLA-I identity. Then in D+R- HLA-A2-expressing recipients, we compared the number of anti-CMVpp65 CD8+T cells restricted by HLA-A2 depending on whether the donor expressed or not HLA-A2. Patients who received non-HLA-A2 kidneys developed very few anti-CMVpp65 T-cells restricted by HLA-A2 as compared to those who received an HLA-A2-expressing kidney. This result indicated that presentation of CMV peptides by donor cells was crucial to stimulate the expansion of pp65-specific memory CD8 T cells. Finally, we established that a SNP in the Programmed Cell Death 1 gene (PD-1.3) influenced D+ kidney and lung transplants survival, while it was also associated with the level of anti-CMV specific T-cell response. **Conclusion:** taken together, these data suggest that anti-CMV specific immune response is pivotal to control infection within the graft and prevent subsequent organ damages. We propose two mechanisms to explain effect of donor CMV infection on graft outcome: (1) inability of anti-CMV CD8 T cells to recognize donor-infected cells in case of full HLA-I mismatching, (2) dysfunction of anti-CMV CD8 T cells after transplantation in some patients, highlighted by our genetic study.