

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

ECOLE DOCTORALE

N° 25 - 10 - 11

Thèse de Doctorat

Sciences de la Vie et de la Santé

Cécile Courivaud

**INFLUENCE DE VARIANTS GENETIQUES DE
L'IMMUNITE INNEE SUR LA SURVENUE DE
COMPLICATIONS INFLAMMATOIRES CHRONIQUES
APRES TRANSPLANTATION RENALE**

Thèse soutenue le 26 Octobre 2010

Rapporteurs : Pr Marie-Noëlle Peraldi

Pr Matthias Buchler

Directeur de thèse : Pr Didier Ducloux

Jury : Pr Jean-Marc Chalopin

Pr Jean-Michel Rebibou

Pr Philippe Saas N]

Mots clés

Transplantation rénale

Polymorphisme génétique

Immunité innée

Inflammation chronique

Athérosclérose

Insulino-résistance

Cancer

Dysfonction chronique du greffon

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité INSERM, UMR645, Besançon, F-25020 France ;
Université de Franche-Comté ; Etablissement Français du sang, Besançon, F-25020 France ;
IFR 133, Besançon, F-25020 France.

Mr le professeur Jean-Marc CHALOPIN

Je vous remercie de présider mon jury de thèse. Vos connaissances, votre expérience et vos grandes qualités humaines sont pour moi source d'estime et d'enseignement.

Mr le professeur Didier DUCLOUX

Cher Didier, diriger mes travaux est devenu une habitude. Ta présence, ta disponibilité tout au long de ces années m'ont toujours été très précieuses. Ce travail et tant d'autres choses n'existeraient pas sans toi. Nous verrons maintenant si devenir PhD marque réellement un tournant dans ma vie.

Mr le professeur Jean-Michel REBIBOU

Cher Jean-Michel, présent depuis mes débuts dans le service de Néphrologie, je suis honorée de te compter parmi les membres de ce jury. Pourquoi avoir enfin accepté cette thèse ? J'ai connu cette année une perte de repères associée, sur le plan professionnel, à l'hésitation de poursuivre mon travail, ici, à Besançon. Trop d'inconnu en perspective. Ce travail représentait alors une occasion rassurante et précieuse : poursuivre une tâche scientifique exigeante, tout en préservant les amitiés bisontines, qui me sont si chères et dont tu fais partie. Depuis Bruxelles j'ai nourri la peur que tu oublies jusqu'à mon prénom...Pour ma part je ne peux t'oublier.

Mr le professeur Philippe SAAS

Cher Philippe, je t'adresse ma sincère reconnaissance pour tes conseils, ton encadrement et la confiance que tu m'as accordée. Merci de m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de ton équipe.

Mme le professeur Marie-Noëlle PERALDI

C'est un honneur pour moi que vous soyez l'un des rapporteurs de ce travail. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

Mr le professeur Matthias BUCHLER

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en être rapporteur.

A l'ensemble du service de Néphrologie du CHU de Besançon et plus particulièrement aux compagnons de longue date Maria, Jamal et Bérengère.

A l'ensemble de l'équipe de l'INSERM U645 et de l'EFS de Franche-Comté.

A Maman. J'ai souvent si peur de t'oublier et pourtant pas une journée ne passe sans penser à toi. Tu me manques. Je t'aime.

A Papa et toute ma famille, les grands comme les petits. Votre présence m'est indispensable. Votre amour et votre soutien intarissables m'aident chaque jour. Que dire d'autre que : Je vous aime.

A Fantine et Timothée. "J'ai 2 amours".

Liste des abréviations

ADPN: Adiponectine

AP1: Activator Protein 1

AINS: Anti-Inflammatoire Non Stéroïdiens

CD: Cellule Dendritique

Cellule NK: Cellule Natural Killer

COX: Cyclooxygenase

CPA: Cellule Présentatrice d' Antigène

DCG: Dysfonction Chronique du Greffon

DL: Déséquilibre de liaison

FSV: Fraction stroma vasculaire

IL-6: Interleukine-6

IMC: Index de Masse Corporelle

LDL: Low Density Lipoprotein. / LDLox: LDL oxydée

LPS: Lipolysaccharide

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MMP: Métalloprotéinase

NF- κ B: Nuclear Factor-KappaB

Nod/CARD: Nucleotide oligomerization domain/Caspase recruitment domain

NODAT: New Onset Diabetes Mellitus

PAMP: Pathogen associated Molecular Pattern

PCR: Protéine C réactive

PG: Prostaglandine

PPAR: Peroxysome Proliferator-Activated Receptor

PRR: Pattern Recognition Receptor

SNP: Single Nucleotide polymorphism

TA: Tissu Adipeux

TLR: Toll-Like Receptor

Tables des matières

AVANT PROPOS	13
INTRODUCTION	15
<u>I/ LA REACTION INFLAMMATOIRE : UNE REPOSE IMMUNITAIRE INNEE</u> ..15	
I-1/ Acteurs	15
<u>I-1-1/ Les Cellules Présentatrices d'Antigènes</u>	15
Les macrophages	16
Les cellules dendritiques	17
<u>I-1-2/ Les cellules cytotoxiques</u>	17
Les cellules Natural Killer	17
Les lymphocytes T $\gamma\delta$	19
I-2/ Activation des cellules résidentes	20
<u>I-2-1/ Les PRRs</u>	20
Famille des récepteurs TLRs	22
Les récepteurs de type Nod	23
I-3/ Les chimiokines : rôle essentiel dans le recrutement des leucocytes	27
I-4/ Les médiateurs de l'inflammation	29
<u>I-4-1/ Les systèmes d'activation plasmatique</u>	30
<u>I-4-2/ Les médiateurs cellulaires</u>	30
Les eicosanoïdes	30
Les cytokines	31
<u>II/ INFLAMMATION CHRONIQUE ET TRANSPLANTATION RENALE</u>	33
II-1/ Inflammation chronique et athérosclérose	35
<u>II-1-1/ Place de l'immunité innée</u>	35
1 ^{ère} étape : la strie lipidique	36
2 ^{ème} étape : les lésions intermédiaires	39
<u>II-1-2/ Aspects cliniques</u>	41
II-2/ Inflammation chronique et insulino-résistance	45
<u>II-2-1/ Place de l'immunité innée</u>	45
Le tissu adipeux / L'adipocyte	46
Médiateurs biologiques de l'insulino-résistance	46

<u>II-2-2/ Aspects cliniques</u>	55
II-3/ Inflammation chronique et cancer	57
<u>II-3-1/ Place de l'immunité innée</u>	58
COX-2 (cyclooxygénase-2)	58
Cellules NK et le couple CX3CR1/CX3CL1 (fractalkine)	59
<u>II-3-2/ Aspects cliniques</u>	61
II-4/ Inflammation chronique et dysfonction chronique du greffon (DCG)	63
<u>II-4-1/ Place de l'immunité innée</u>	63
Récepteurs rétinoides et PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor)	64
Les prostaglandines (PG)	64
Les TLRs	67
Les chimiokines	68
<u>II-4-2/ Aspects cliniques</u>	69
<u>III/ DETERMINISME GENETIQUE DE L'INFLAMMATION/ POLYMORPHISMES GENETIQUES</u>	71
III-1/ Définition	72
III-2/ Applications	73
<u>III-2-1/ Biais liés aux caractéristiques des polymorphismes</u>	74
<u>III-2-2/ Ecueils des études d'association</u>	76
<u>III-2-3/ Quelles conséquences pour les études cliniques de polymorphisme ?</u>	79
III-3/ Approche gènes candidats versus approche génome wide	84
<u>III-3-1/ Approche gènes candidats</u>	84
<u>III-3-2/ Approche génome wide</u>	84
PREMIER GENE CANDIDAT : INTERLEUKINE-6 (IL-6)	86
I/ Description du gène de l'IL-6	87
II/ Polymorphisme du promoteur du gène de l'IL-6 en position -174 G/C	89
<u>II-1/ Etat de la littérature</u>	89
<u>II-2/ Etat de la littérature en transplantation rénale (population caucasienne)</u>	91
Article n°1: IL-6 promoter polymorphism -174 is associated with new-onset diabetes after transplantation	93

Article n°2: The interleukin-6 gene promoter polymorphism -174 is predictive of atherosclerotic events in overweight transplanted patients	102
III/ Discussion concernant ces 2 articles	122
IV/ Polymorphisme du promoteur du gène de l'IL-6 et autres maladies inflammatoires chroniques (cancer et DCG)	123
DEUXIEME GENE CANDIDAT : CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2)	126
I/ Description du gène de COX-2	127
II/ Polymorphisme du promoteur du gène de COX-2 en position -765 G/C	129
<u>II-1/ Etat de la littérature</u>	129
<u>II-2/ Etat de la littérature en transplantation rénale (population caucasienne)</u>	132
Article n°3: G-765 COX-2 gene promoter polymorphism and risk of atherosclerosis after kidney transplantation	133
Article n°4: Influence of Cyclooxygenase-2 (COX-2) gene promoter polymorphism - 765 on graft loss after renal transplantation	136
Article n°5: Influence of Cyclooxygenase-2 (COX-2) gene promoter polymorphism at position -765 on skin cancer after renal transplantation	143
III/ Discussion concernant ces 3 articles	148
IV/ Polymorphisme du promoteur du gène COX-2 et insulino-résistance	151
TROISIEME GENE CANDIDAT : CX3CR1 (récepteur de CX3CL1 ou Fractalkine) 153	
I/ Description du gène CX3CR1	154
II/ Polymorphismes V249I et T280M du gène CX3CR1	156
<u>II-1/ Etat de la littérature</u>	156
<u>II-2/ Etat de la littérature en transplantation rénale (population caucasienne)</u>	157
Article n°6: Influence of fractalkine receptor gene polymorphism V249I-T280M on cancer occurrence after renal transplantation	158
III/ Discussion	177
QUATRIEME GENE CANDIDAT: NOD2 (Nucleotide Oligomerisation Domain 2) ..178	
I/ Description du gène Nod2	179
II/ Polymorphisme du gène Nod2	180
<u>II-1/ Etat de la littérature</u>	180

<u>II-2/ Etat de la littérature en transplantation rénale (population caucasienne)</u>	182
Article n°7: No evidence of association between <i>NOD2/CARD15</i> gene polymorphism and atherosclerotic events after renal transplantation	183
III/ Discussion	188
PROJETS	189
BIBLIOGRAPHIE	194

AVANT PROPOS

L'objectif des équipes médicales dans le suivi des patients transplantés rénaux est la prévention et la prise en charge adéquate des complications à la fois :

-Immunologiques : Rejet aigu et dysfonction chronique du greffon

-Cardio-vasculaires : maladie coronarienne, artériopathie des membres inférieurs (AOMI) et maladie cérébro-vasculaire

-Métaboliques : insulino-résistance et diabète de type 2, syndrome métabolique et dyslipidémie

-Infectieuses : bactérienne, virale et parasitaire

-Néoplasiques

Ces pathologies sont actuellement reconnues comme étant des pathologies inflammatoires chroniques. Ce facteur de risque non traditionnel qu'est l'inflammation est largement prévalent au sein de la population des patients transplantés rénaux et contribue largement à l'élévation de la morbi-mortalité des patients. Mieux établir les facteurs influençant la réponse immunitaire innée et particulièrement la réponse inflammatoire pourrait permettre de stratifier les patients selon leur risque et ainsi améliorer leur survie.

Le polymorphisme génétique est une cause importante de variabilité interindividuelle affectant le niveau d'expression d'un gène et a un impact sur la survenue d'un grand nombre de pathologies. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à 4 acteurs de l'immunité innée ayant un rôle au sein de la réponse inflammatoire :

-Interleukine-6 (IL-6)

-Cyclooxygénase 2 (COX-2)

-NOD2-CARD15 (Nucleotide Oligomerisation Domain 2-Caspase-Recruitment Domain 15)

-CX3CR1: récepteur de CX3CL1 ou Fractalkine

L'objectif de ce travail est d'étudier les associations possibles entre les polymorphismes génétiques décrits pour ces 4 candidats et la survenue de complications chroniques après transplantation rénale telles que la survenue d'événements athéromateux, d'un état d'insulino-résistance à l'origine d'un diabète de type 2, de maladies néoplasiques et la dysfonction chronique du greffon.

INTRODUCTION

I/ LA REACTION INFLAMMATOIRE : UNE REPONSE IMMUNITAIRE INNEE

Les premières lignes de défense contre les pathogènes sont représentées par les épithélia qui constituent la porte d'entrée aux agents infectieux, et par les macrophages tissulaires qui peuvent les phagocyter rapidement. Les phagocytes reconnaissent les pathogènes grâce à des récepteurs invariables appelés pattern recognition receptor (PRR). Certains de ces récepteurs déclenchent l'activation des macrophages induisant ainsi une réponse inflammatoire locale qui permet de recruter de nouveaux phagocytes et d'initier la réponse adaptative en activant les cellules dendritiques. Les réponses inflammatoires induites par l'activation des macrophages sont dépendantes de la production de médiateurs solubles appelées cytokines et chimiokines et qui ont des effets locaux, mais également systémiques.

I-1/ Acteurs

I-1-1/ les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPAs)

Les CPAs ont la capacité d'internaliser les pathogènes par endocytose, phagocytose ou pinocytose, de les dégrader puis d'en présenter les antigènes à leur surface et de sécréter une grande variété de médiateurs inflammatoires et de cytokines afin d'activer leurs partenaires cellulaires. La phagocytose est l'internalisation de larges particules qui va être permise par la détection de motifs PAMPs (Pathogen associated molecular patterns) par les PRRs présents à la surface des CPAs. Ces notions de motifs PAMPs et PRRs seront abordées ultérieurement.

Les macrophages

Les macrophages, identifiés par le marqueur CD14, sont des cellules issues de la lignée myéloïde. La stimulation des précurseurs macrophagiques par M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) et GM-MCSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) va permettre leur différenciation en monocytes. Ces monocytes circulants vont, en réponse à des stimuli inflammatoires, quitter la circulation et migrer vers les tissus, où ils acquièrent les propriétés de macrophages (**Figure 1**) (**Gordon S 2003**).

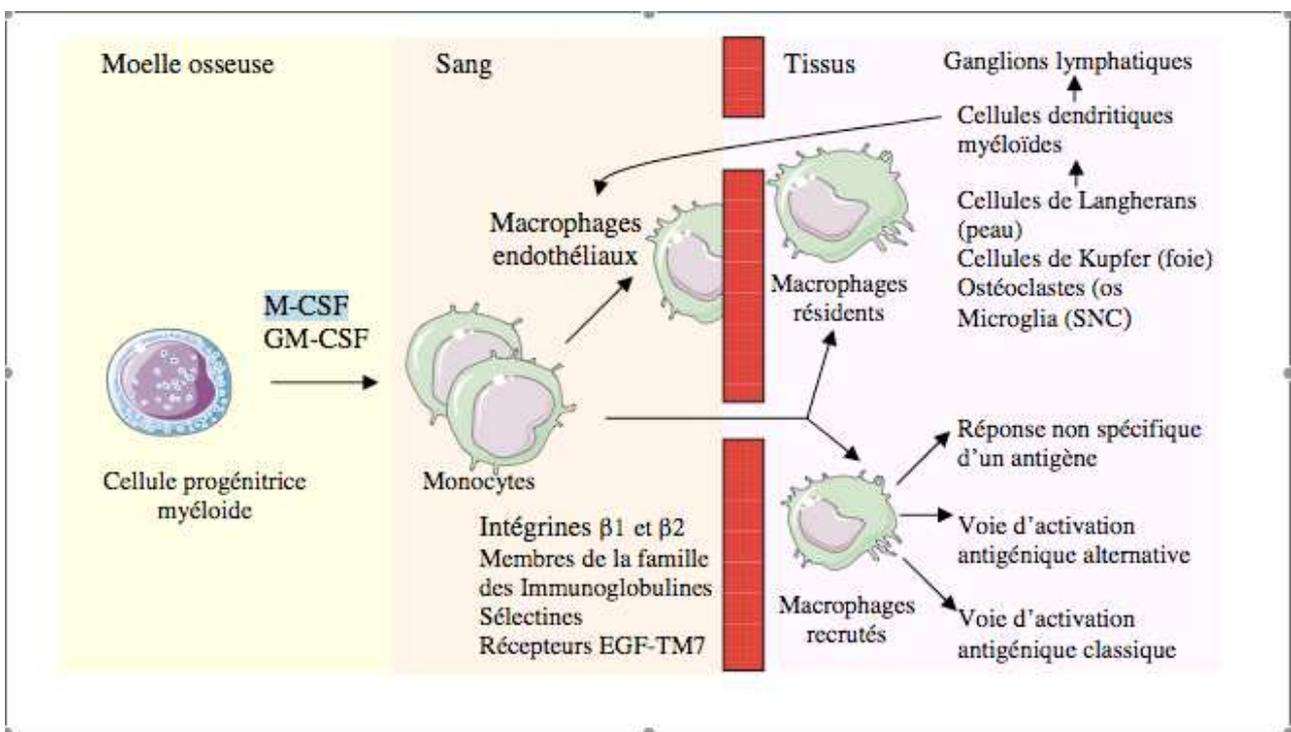


Figure 1: Différenciation, distribution et activation des macrophages *in vivo* d'après **Gordon S 2003**. La stimulation des précurseurs macrophagiques par M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) et GM-MCSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) va permettre leur différenciation en monocytes. Des molécules d'adhésion contrôlent la migration des cellules sanguines à travers l'endothélium. Les macrophages recrutés ont une activité phagocytaire et une production de médiateurs pro-inflammatoires et de produits cytotoxiques accrues. En revanche, les macrophages résidents sont dépourvus de cette activité inflammatoire. Ils sont capables d'endocytose. Des stimuli microbiens peuvent agir directement sur les macrophages résidents et modifier ainsi leurs propriétés membranaires et sécrétoires. Abréviations: EGF-TM7: Epidermal Growth Factor-Seven Transmembrane. SNC: Système Nerveux Central.

Les cellules dendritiques (CD)

Identifiées par le marqueur CD11c, les CD constituent une population très hétérogène de CPAs. Leur fonction principale, et conservée dans tous les types de CD, réside dans leur capacité de présentation d'antigènes à des cellules T naïves alors que les macrophages ne peuvent activer que des cellules T pré-activées. Il existe une interaction directe entre les cellules Natural Killer (cellules NK) et les CD. Les cellules NK peuvent aider à la maturation des CD et réciproquement. De cette façon les cellules NK et dendritiques se complètent en terme de répertoire de reconnaissance (**Cooper MA et al. 2004**).

I-1-2/ Les cellules cytotoxiques

Les cellules Natural Killer (NK)

Je n'aborderai pas ici les sous populations lymphocytaire T exprimant des récepteurs NK et les cellules NKT.

Les cellules NK sont des lymphocytes issus d'un précurseur commun aux lymphocytes T (LcT). Elles représentent 10 à 15% des lymphocytes totaux. Elles dérivent d'un précurseur médullaire CD34+ commun avec les LcT. A la différence des LcT, il n'y a pas d'étape de maturation thymique (le développement des cellules NK est normal chez les souris nude qui sont dépourvues de thymus). Leur appellation de « cellules tueuses » vient de leur capacité à détruire une cible cellulaire par cytotoxicité directe sans « immunisation » préalable contrairement à la cytotoxicité des LcT. Il s'agit de grands lymphocytes granuleux. Les inclusions cytoplasmiques contiennent les molécules granzyme et perforine, médiateurs de la cytotoxicité cellulaire. Phénotypiquement, les cellules NK se distinguent des LcT car ils n'expriment pas le CD3/TCR (T cell receptor), mais les marqueurs non spécifiques CD16

(récepteur de faible affinité pour les immunoglobulines G (IgG)) et CD56 qui est une isoforme d'une molécule d'adhérence neuronale (**Cooper MA et al. 2001**). Les cellules NK sont capables de 2 types de cytotoxicité : une cytotoxicité de type ADCC (Antibody-dependent cell cytotoxicity) par la reconnaissance via CD16 des anticorps (Ac) recouvrant une cellule cible, et une cytotoxicité dite naturelle. La cytotoxicité des cellules NK s'effectue par 2 voies. Soit la voie perforine/granzyme (la perforine et le granzyme sont libérés par exocytose des granules cytoplasmiques au contact de la cible), soit la voie "des récepteurs de mort" (engagement de récepteurs à domaine de mort tels que Fas/ FasL, TRAIL/DR4/5, TNF/TNFR1) conduisant à la mort cellulaire par apoptose. Après activation, les cellules NK produisent différentes cytokines (TNF- α , IFN- γ ...) et chimiokines inflammatoires (CCL3, CCL4, CCL5...) participant alors à l'orientation vers une réponse immunitaire de type 1 ou de type 2 et permettant le recrutement d'autres composants cellulaires de la réponse immunitaire (**Cooper MA et al. 2001**). Les différentes fonctions effectrices des cellules NK sont étroitement contrôlées par des récepteurs inhibiteurs et activateurs (**Biron CA et al. 1999**). La reconnaissance par les récepteurs inhibiteurs de molécules du CMH de classe I sur une cible cellulaire confère à cette dernière une protection sélective contre la lyse par les cellules NK (**Figure 2**) (**Biassoni R et al. 2001**). Le contrôle de l'activation des cellules NK est donc liée à la balance entre des signaux activateurs et inhibiteurs délivrés par la cellule cible, mettant en jeu ces différents récepteurs. Les fonctions des cellules NK sont également modulées par l'action de cytokines. L'IL-2 est un puissant inducteur de la cytotoxicité NK (**Moretta A et al. 2001**). La réduction de l'expression des molécules de CMH 1 ou leur modification, un phénomène courant lors d'infections virales ou de croissance d'une tumeur, diminue ou parfois même annule l'interaction des récepteurs d'inhibition avec leurs ligands naturels et laisse ainsi la cellule cible vulnérable à l'activité lytique des cellules NK.

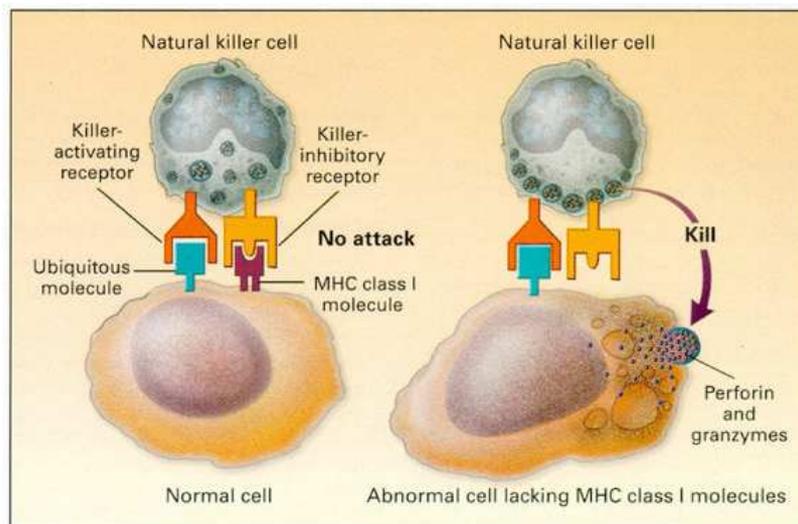


Figure 2 : Activation des cellules NK selon la théorie du « missing self ». Dans les conditions normales, la cellule cible présente à sa surface le ligand activateur et les molécules du CMH-1. Le récepteur activateur est donc activé en permanence. Mais la transmission du signal est inhibée par la liaison des molécules de CMH-1 au récepteur inhibiteur. En présence de cellules anormales (cellules infectées, cellules tumorales...), très souvent l'infection ou cancérisation d'une cellule entraîne une modification de l'expression des molécules de classe 1 du CMH afin de ne pas être reconnu par les LcT. De cette manière, l'inhibition des cellules NK va être levée et le signal transmis permet la lyse de la cellule

Lymphocytes T $\gamma\delta$ (LcT $\gamma\delta$)

Les LcT $\gamma\delta$ sont des cellules issues de la lignée lymphoïde qui expriment à leur surface un TCR constitué d'un hétérodimère $\gamma\delta$ associé à 2 molécules de CD3. Pendant le développement, les chaînes $\gamma\delta$ du TCR sont réarrangées à la place des chaînes $\alpha\beta$ classiques. Les LcT $\gamma\delta$ représentent une population minoritaire par rapport aux LcT $\alpha\beta$. Ils interviennent aussi bien dans l'élimination des cellules infectées par un pathogène intracellulaire que dans la défense anti-tumorale. Ce sont des cellules effectrices essentiellement cytotoxiques qui

lysent leur cible grâce au système perforine/granzyme. Ils sécrètent aussi de nombreuses cytokines le plus souvent de type 1 (**Morita CT et al. 1991, Kaumann SH et al. 1993**).

I-2/ Activation des cellules résidentes

L'immunité innée est un système de défense ancestral commun à tous les êtres multicellulaires (**Medzhitov R et al. 2000, Janeway CA Jr et al. 2002**). Elle permet de neutraliser très rapidement tout agent agresseur, puis d'orienter dans un deuxième temps la réponse immunitaire adaptative. Contrairement à l'immunité adaptative, les moyens de reconnaissance utilisés par ce système de défense préexistent à l'invasion par les micro-organismes. Les signaux dangers reconnus par l'immunité innée sont des déterminants moléculaires conservés des agents pathogènes tels que les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes des parois bactériennes, l'ADN non méthylé des bactéries, l'ARN double brin des virus. Ces antigènes conservés des agents pathogènes ont été appelés PAMPs (**Medzhitov R et al. 1997**). Les PAMPs sont reconnus par des récepteurs appartenant à l'immunité innée et appelé PRRs. La réponse immunitaire innée ou réaction inflammatoire résulte de l'interaction des PRRs avec les PAMPs.

I-2-1/ Les PRRs (Figure 3)

Les PRRs peuvent être membranaires, endosomiaux ou cytoplasmiques. Contrairement aux récepteurs d'antigènes (Ag) de l'immunité adaptative (TCR et BCR), l'expression des PRRs n'est pas clonale, c'est-à-dire que de nombreuses cellules expriment un PRR de même spécificité et qu'une même cellule peut exprimer plusieurs PRRs de spécificités différentes. Le rôle des PRRs est d'initier une réponse immédiate. Leurs fonctions sont triples: induction de phagocytose, activation cellulaire et chimiotactisme.

Les PRRs peuvent être divisés en 3 catégories :

- les PRRs sécrétés: Mannane binding-lectine (MBL) appartenant à la famille des collectines et qui peut se lier à certains glucides de la surface des bactéries, ceci déclenchant l'activation du complément et permettant ainsi la phagocytose des bactéries. Il existe d'autres PRRs solubles comme les surfactants et la PCR (protéine C réactive).

- les PRRs endocytiques: récepteurs transmembranaires des phagocytes qui déclenchent le processus d'endocytose/phagocytose lors de l'interaction avec leur ligand. Il en existe un très grand nombre et ils appartiennent à différentes familles. Les lectines et les scavengers receptors font partie de ces PRRs.

- les PRRs de signalisation : certains récepteurs sont capable de signaler la présence d'un agent pathogène au système immunitaire et ainsi de déclencher la réponse inflammatoire mais également l'expression de certaines molécules nécessaires à l'induction de la réponse adaptative. Il existe des récepteurs membranaires et intracellulaires permettant au système immunitaire de surveiller respectivement les compartiments extracellulaires et intracellulaires. Ils comprennent, entre autre, les récepteurs TLRs (Toll-Like Receptor) et les récepteurs de type Nod (NLR (Nucleotide oligomerization domain (Nod) Like receptors) (**Areschoug T et al. 2008**).

A noter que les récepteurs PRRs peuvent aussi reconnaître des antigènes du soi dans certaines conditions. Ces antigènes du soi, libérés lors de la nécrose cellulaire, pourraient déclencher la réaction inflammatoire qui survient après une agression tissulaire quelle que soit son origine (agression chimique, mécanique ou hypoxique). Par exemple, la protéine HSP60 (heat shock protein 60) libérée par les cellules nécrosées se lient aux récepteurs TLR4 (**Ohashi K et al. 2000**). De même, lorsque les LDL (Low density lipoprotein) sont oxydées, elles se lient aux récepteurs scavenger des macrophages.

Nous allons ci-dessous revenir plus en détail sur les récepteurs TLRs et Nod auxquelles nous nous sommes particulièrement intéressés au sein de nos travaux.

La famille des récepteurs TLRs

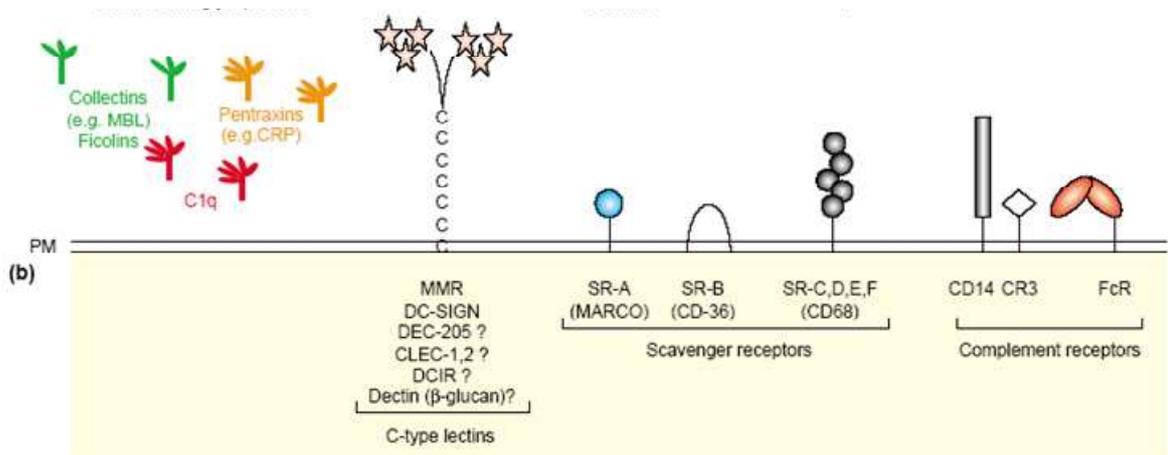
La famille des récepteurs TLRs est une famille de PRRs membranaires qui joue un rôle central dans la réponse immunitaire innée. Les TLRs sont très conservés dans l'évolution et sont impliqués dans l'induction de la réponse immunitaire innée ainsi que dans le développement. Ils ont été initialement décrits chez la drosophile, puis dans l'ensemble du règne animal (**Gay NJ et al. 1991**). Les TLRs sont des protéines transmembranaires contenant dans leur domaine extracellulaire une région riche en leucine, et un segment intracytoplasmique avec une région conservée appelée Toll/IL-1 receptor (TIR) commune à tous ces récepteurs et aux récepteurs de l'IL-1 et l'IL-18. En 1997, un homologue humain de Toll (Toll like receptor 4 ou TLR4) a été décrit par l'équipe de Janeway CA (**Medzhitov R et al. 1997**). Chez l'homme, on connaît actuellement 10 TLRs différents dont 7 ont leurs ligands identifiés (**Underhill DM et al. 2002**). Ces récepteurs sont exprimés par les cellules phagocytaires, les cellules dendritiques et certaines cellules épithéliales dont les cellules endothéliales. La localisation cellulaire des molécules TLRs est associée à la nature des ligands qu'elles reconnaissent. Ainsi les récepteurs TLR 1, 2, 4, 5 et 6 exprimés à la surface des cellules reconnaissent des composés microbiens protéiques ou lipidiques qui sont donc exogènes. A l'inverse les récepteurs TLR 3, 7, 8 et 9 reconnaissent des acides nucléiques et sont localisés dans les endosomes/lysosomes des cellules hôtes. Leurs agonistes microbiens sont donc endogènes. Le ligand de TLR10 n'est pas encore connu. La stimulation des TLRs par les PAMPs est à l'origine d'une cascade d'activation moléculaire intracellulaire incluant des molécules comme MyD88 et le groupe des « IL-1R-associated serine kinase » (IRAK) (**Medzhitov R et al. 1997**). Cette cascade conduit à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP1 (activator-protein 1) qui régulent l'expression inductible des cytokines

inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 ou l'IL-6, et des molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 (**Figure 4**) (**Medzhitov R et al. 1997**). Dans la plupart des cas, le domaine extracellulaire des TLRs requière un co-récepteur pour transmettre le signal à travers la membrane. Par exemple TLR-4 interagit avec les molécules MD2 et CD14 pour activer la voie NF- κ B suite à une stimulation par les LPS (**Takeuchi O et al. 2002**).

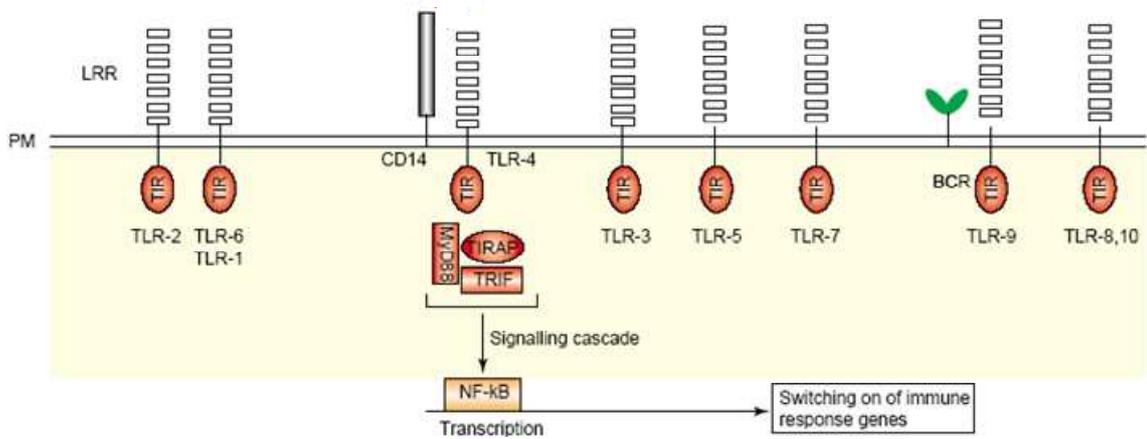
Les récepteurs de type Nod

Une autre famille de récepteurs intra-cytoplasmiques a été décrite. Ces PRRs sont très conservés au cours de l'évolution, il en existe 23 formes chez l'homme. Ces gènes sont exprimés dans les phagocytes, mais aussi dans les cellules épithéliales intestinales et pulmonaires (**Hisamatsu T et al. 2003, Tada H et al. 2005**). Ils jouent un rôle important dans la régulation de l'homéostasie en pouvant à la fois interagir avec des signaux danger endogènes et des ligands microbiens. L'ensemble de ces protéines est caractérisé par un domaine Nod central et une région C-terminale riche en répétition de résidus leucines (**Franchi et al. 2008**). On distingue 4 sous-groupes en fonction de leur extrémité effectrice N-terminale. La famille des NLR-C présente des domaines de recrutement de caspases (CARD) (**Figure 4**), celle des NLR-P des domaines pyrine (PYD), celle des NLR-A des domaines acides et enfin celle des NLR-B des domaines inhibiteurs de baculovirus (BIRs). La famille des NLR-C est représentée par les 2 NLR les plus décrits : NOD1 et NOD2. Lors de leur activation, ces récepteurs se dimérisent et peuvent recruter une serine-thréonine kinase (RICK) grâce à des interactions CARD-CARD. Cette kinase peut induire différentes cascades conduisant à l'activation de NF- κ B ou à celle de AP1 via l'activation de différentes voies de MAP-kinases (**Franchi L et al. 2009**). L'ensemble de ces voies de transduction aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires.

(a)



(b)



(c)
PM

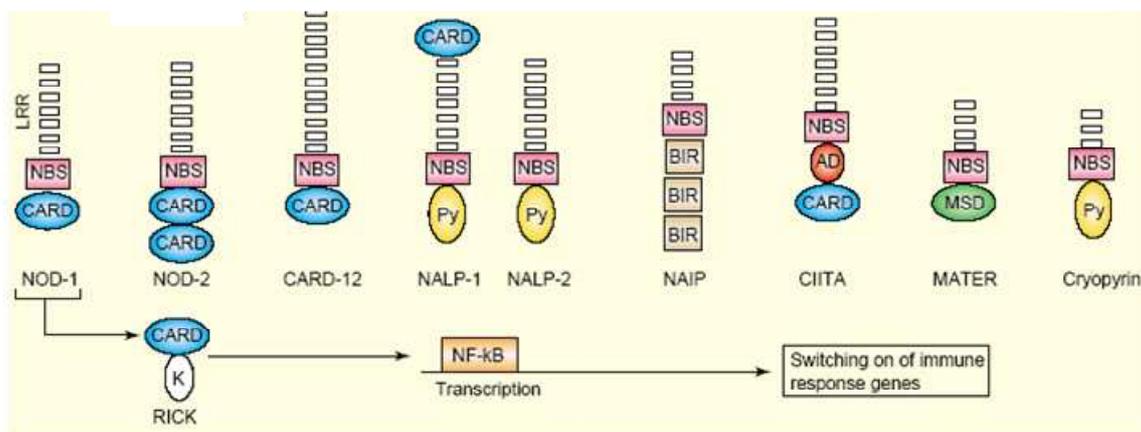


Figure 3: Les PRRs (Pattern-Recognition Receptors). (a) Les PRRs extracellulaires. (b) La famille des TLRs (Toll- Like Receptors), récepteurs transmembranaires. Leur domaine extra-cellulaire contient une région riche en leucines (LRR). Le segment intracytoplasmique possède une région conservée appelée TIR (Toll/IL-1 Receptor) commune à tous les récepteurs. (c) La famille Nod, récepteurs intracellulaires. Nod1 et Nod2 activent NF-κB après interaction avec la protéine RICK (Receptor interacting kinase protein) via les domaines CARD (Caspase recruitment domain). D'après **McGuinness DH et al. 2003**. Abbreviations: AD, activation domain (red circle); BCR, B-cell receptor (green Ig); BIR, baculovirus inhibitory repeat (brown boxes); CARD, caspase recruitment domain (blue ovals); CD, cluster designation; CIITA, class II transactivator of MHC class II genes; CLEC-1, C-type lectin receptor 1; CR3, complement receptor 3; CRP, C-reactive protein; DC-SIGN, dendritic-cell-specific intracellular adhesion molecule; DCIR, dendritic cell inhibitory receptor; DEC-205, dendritic cell 205; FcR, receptor for the Fc portion of immunoglobulin; LRR, leucine-rich repeat; MARCO, macrophage receptor with collagenous structure; MATER, maternal antigen required by embryos; MBL, mannose-binding lectin; MMR, macrophage mannose receptor; MyD88, myeloid differentiation factor 88; NAIP, neuronal apoptosis inhibitor protein; NBS, nucleotide-binding site (pink boxes); NF-κB, nuclear factor κB; NOD, nucleotide-binding oligomerization domain; PM, plasma membrane; Py, pyrin domain (yellow ovals); SR, scavenger receptor; TIRAP, TIR adaptor protein; TRIF, TIR-inducing IFN-β.

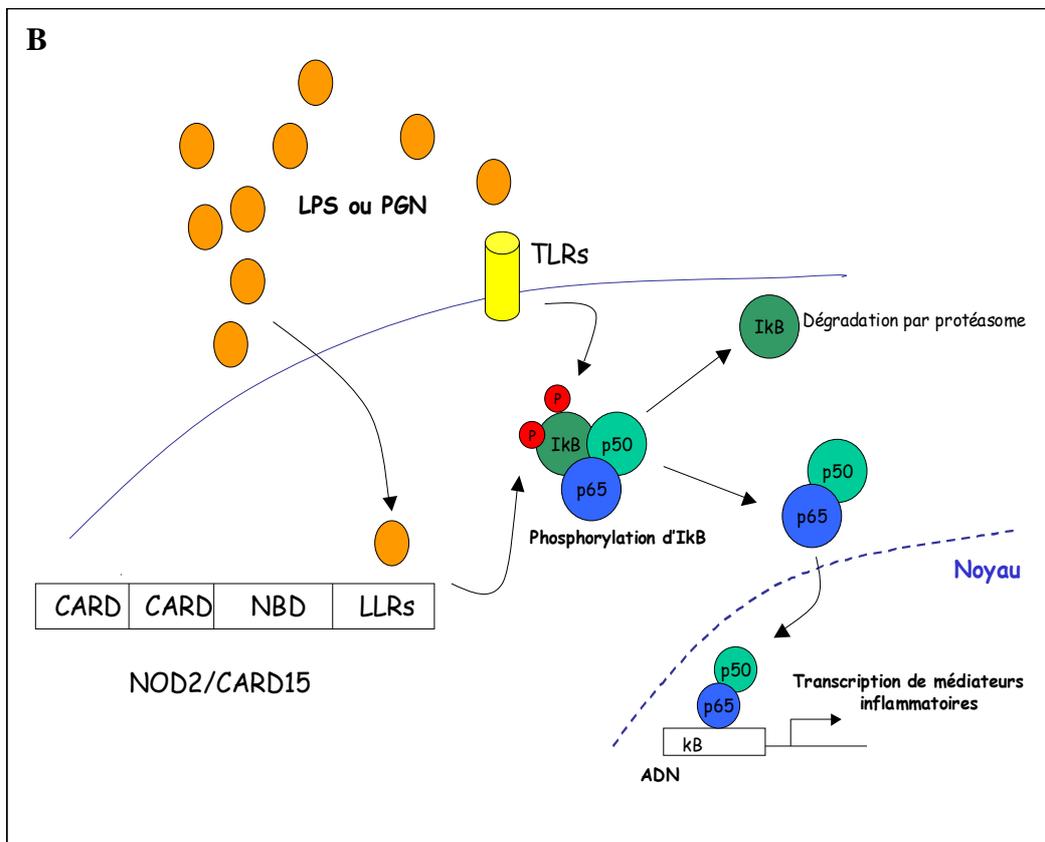
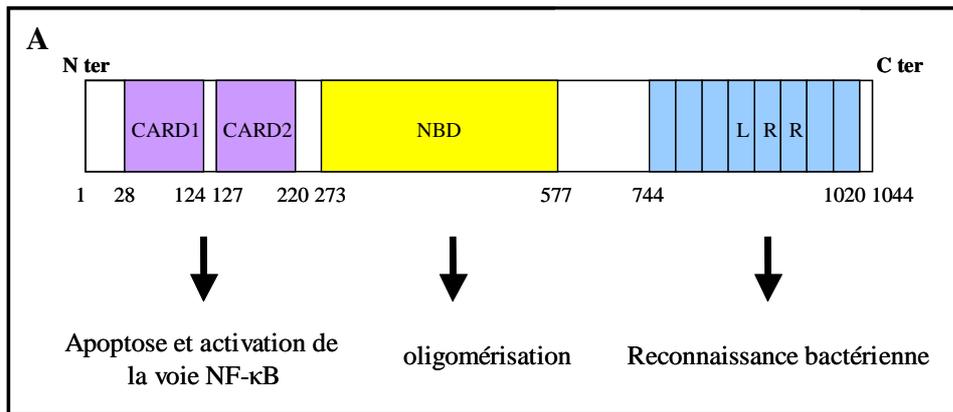


Figure 4: **A/** Structure de NOD2/CARD15 et fonctions des domaines CARD, NBD et LRR. Localisation dans la région LRR des trois principales mutations associées à la maladie de Crohn et étudiées dans ce mémoire (voir Matériels et méthodes). **B/** Rôle des récepteurs TLRs et NOD2/CARD15 dans la reconnaissance des molécules associées aux pathogènes, à l'origine de l'activation de la voie NFκB et de la production de cytokines pro-inflammatoires. **Abbréviations:** NOD, nucleotide oligomerisation domain. CARD, caspase recruitment domain. NBD, nucleotide binding domain. LRR, leucine rich repeats. LPS, lipopolysaccharide. PGN, peptidoglycane. TLRs, toll like receptors. NOD, nucleotide oligomerisation domain.

I-3/ Les chimiokines : Rôle essentiel dans le recrutement des leucocytes

Les chimiokines ou cytokines chimio-attractante sont des polypeptides avec des séquences similaires et une structure commune maintenue par 2 ponts disulfure conservés. Il existe à ce jour plus de 44 chimiokines et 21 récepteurs de chimiokines décrits. La fonction première des chimiokines, le chimiotactisme, prend place dans le processus plus large du recrutement des leucocytes depuis le sang circulant jusqu'à leur site d'action, notamment inflammatoire. Ce processus comporte 4 étapes successives conditionnant la **(Figure 5)**:

- interaction de faible affinité entre les sélectines leucocytaires ou endothéliales et leur ligand qui réduit la vitesse du leucocyte dans le flux sanguin en permettant son "roulement".
- ce processus est suivi de l'activation des intégrines par divers stimuli provoquant l'arrêt complet du leucocyte et son adhérence forte à l'endothélium.
- une perméabilité transitoire permet ensuite la diapédèse endothéliale.
- enfin, le gradient interstitiel des facteurs chimiotactiques inflammatoires et la protéolyse ciblée par les métalloprotéinases permettent la migration cellulaire jusqu'au site inflammatoire.

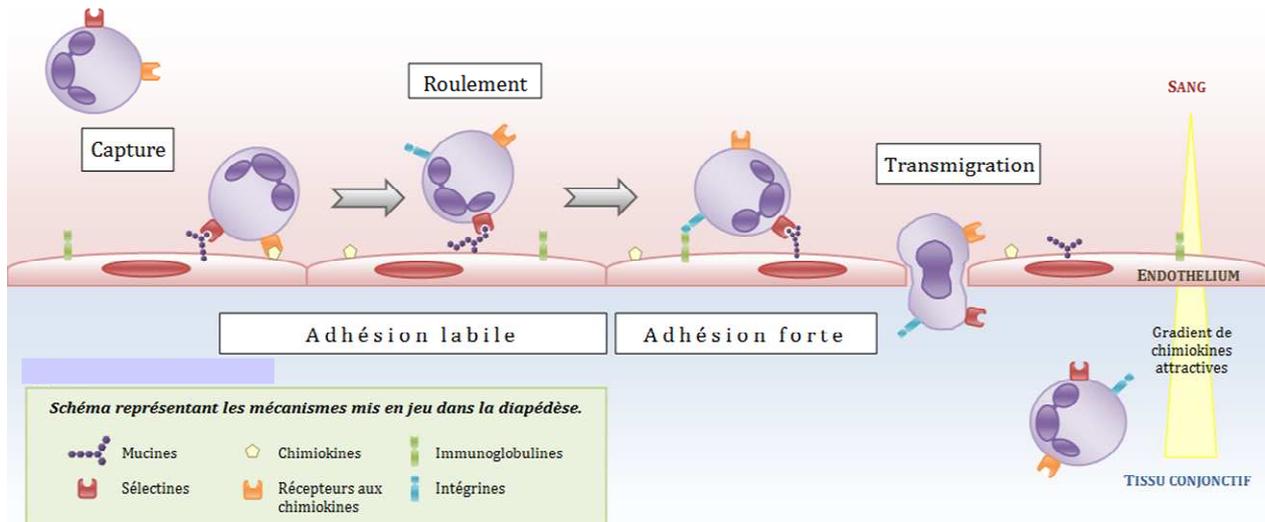


Figure 5: La diapédèse leucocytaire. La phase de capture correspond au rapprochement de la cellule vers l'endothélium. La phase de roulement (rolling) conduit à une adhésion primaire transitoire et réversible grâce à l'action principale des sélectines. La phase d'adhésion forte bloque la phase de roulement et est contrôlée majoritairement par les intégrines. Les intégrines, inactives en condition normale, sont activées par le biais de sécrétions de facteurs chimiotactiques au site inflammatoire. Enfin, la diapédèse vers le sous-endothélium est favorisé par le gradient de concentration des chimiokines.

La super famille des chimiokines peut être divisée en 4 sous-familles (C, CC, CXC et CX3C), selon la position des 2 premiers résidus de cystéine compris dans un motif de 4 cystéines. Ces 2 cystéines peuvent être séparées par 1 ou 3 amino-acides (désignés par X). Les chimiokines peuvent également être classées selon leur fonction et selon la régulation de leur expression. Certaines chimiokines jouent un rôle important dans les processus inflammatoires (**Figure 6** : exemple du rôle de CX3CL1 ou Fractalkine dans l'athérogenèse) alors que d'autres sont importantes dans le trafic normal des leucocytes vers les organes lymphoïdes primaires ou secondaires. L'action biologique des chimiokines est médiée par des récepteurs appartenant à la grande famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, couplés aux protéines G.

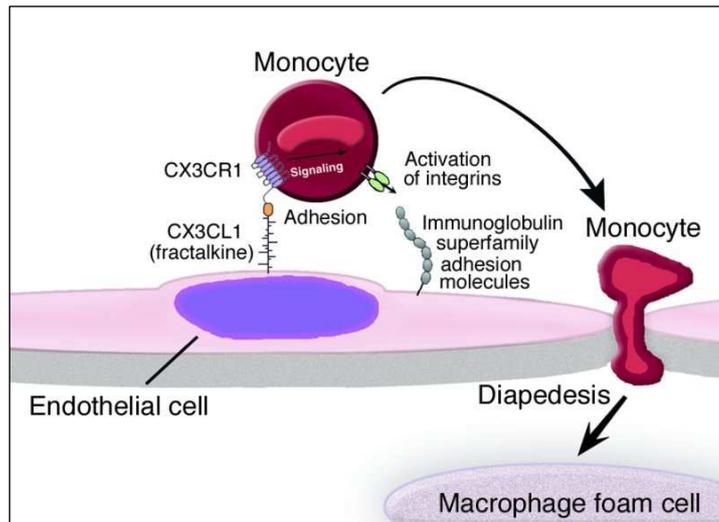


Figure 6: Rôle de la fractalkine (CX3CL1) et de son récepteur CX3CR1 dans le recrutement des leucocytes, lors de l'athérosclérose. Mise en évidence de la faculté de CX3CR1 à induire l'arrêt et la migration des leucocytes via CX3CL1. Contrairement aux autres chimiokines, l'adhérence exercée par CX3CL1 est indépendante de l'activation des intégrines. Par ailleurs, la liaison CX3CR1/CX3CL1 augmente l'avidité des intégrines leucocytaires pour leurs récepteurs. CX3CL1 est donc capable d'induire l'adhérence ferme des monocytes sur l'endothélium par, d'une part un mécanisme intrinsèque mettant en jeu sa liaison à CX3CR1 et d'autre part, en augmentant l'avidité des intégrines leucocytaires pour leurs ligands endothéliaux. D'après **Cybulsky MI et al. 2003.**

Les chimiokines sont également impliquées dans le développement et les métastases de nombreuses tumeurs.

I-4/ Les médiateurs de l'inflammation

La description des cellules intervenant au cours de l'inflammation laisse imaginer le nombre important de médiateurs intervenant dans les différentes étapes de l'inflammation. Ces médiateurs peuvent être décrits sous la forme, d'une part de systèmes d'activation plasmatique, et d'autre part de médiateurs cellulaires.

I-4-1/ Les systèmes d'activation plasmatique

Il s'agit de systèmes multi-protéiques dont les composants sont produits à distance du foyer inflammatoire. Les différents composants de ces systèmes sont présents dans le sang circulant où ils demeurent à l'état de précurseurs inactifs, jusqu'à ce qu'ils soient mis en présence d'un activateur spécifique. Ces systèmes ont entre eux des relations fonctionnelles étroites. On en décrit 4 :

-Le système contact : Facteur de Hageman, la prékallicréine, le kininogène de poids moléculaire élevé, le facteur XI.

-Le système coagulation - fibrinof formation et le système de la fibrinolyse.

-Le système du complément.

I-4-2/ Les médiateurs cellulaires

Ils sont nombreux : histamine, sérotonine, eicosanoïdes, radicaux libre oxygénés, cytokines, enzyme de destruction cellulaire... Seuls les eicosanoïdes et les cytokines, notamment l'IL-6, font l'objet de notre attention dans ce travail de thèse

Les eicosanoïdes (Figure 7)

Ce sont des composés qui dérivent de l'acide arachidonique. L'acide arachidonique est libéré à partir de phospholipides membranaires des cellules inflammatoires sous l'action des phospholipases A2. Deux grandes variétés d'enzymes interviennent sur le métabolisme de l'acide arachidonique. Les lipooxygénases, qui induisent la formation de leucotriènes (par exemple : LTB4, agent chimiotactique des polynucléaires le plus puissant et qui active également les phagocytes). Les cyclooxygénases (COX), qui génèrent la formation de prostaglandines (PG) et de thromboxanes. Il a été mis en évidence l'existence de 2 types de COX: COX-1 et COX-2.

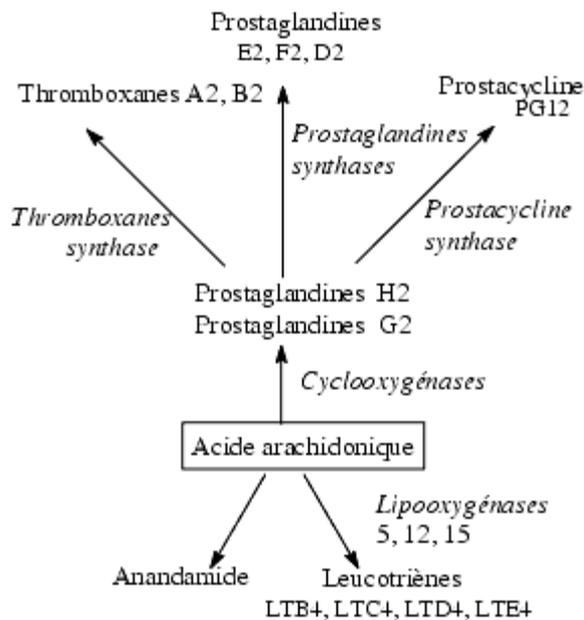


Figure 7: Biosynthèse des eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique.

Les cytokines

La multiplicité de source et de cibles, ainsi que leurs nombreuses interactions entre elles, permettent de parler de réseau de cytokines. Au moins 40 cytokines ont été décrites à ce jour. Dans ce travail nous nous sommes intéressés uniquement à l'IL-6, cytokine ayant un rôle essentiel dans les pathologies inflammatoires. Celle-ci est produite par la plupart des cellules en réponse à des stimuli variés. L'IL-6 intervient en stimulant la production hépatocyttaire des protéines de la phase aigue de l'inflammation : PCR, SAA, haptoglobine, fibrinogène. Cette cytokine fait l'objet d'un chapitre nommé "1^{er} gène candidat : l'IL-6".

La réaction inflammatoire résulte donc de l'activation des cellules impliquées dans l'immunité innée. Cette activation est secondaire à la stimulation des récepteurs PRRs par un « signal danger ». Les signaux dangers sont des déterminants moléculaires appartenant aux micro-organismes pathogènes (PAMPs) ou à certains antigènes du soi. L'organisme est en permanence confronté aux micro-organismes et à la mort cellulaire. Il est donc très probable

que de multiples réactions inflammatoires se déroulent en permanence dans l'organisme. La sévérité de la réaction inflammatoire est alors liée à l'intensité du « signal danger » et à la susceptibilité génétique de l'individu à y faire face.

II/ INFLAMMATION CHRONIQUE ET TRANSPLANTATION RENALE

Il est classique de classer les complications de la transplantation rénale selon 2 périodes :

- La période précoce qui couvre la première année suivant la transplantation. Les complications y sont surtout immunologiques, dominées par le rejet aigu d'allogreffe, et infectieuses liées à une immunosuppression maximale en début de transplantation.
- La période tardive commence classiquement après la première année. Les complications sont alors surtout cardiovasculaires, néoplasiques et métaboliques. Elles sont pour la plupart provoquées ou aggravées par le traitement immunosuppresseur au long cours. La survie des greffons à long terme est donc grevée par, bien sûr, la dysfonction chronique d'allogreffe, mais également par les pathologies cardiovasculaires et néoplasiques, qui représentent actuellement les 2 premières causes de décès chez le patient transplanté rénal, avec greffon fonctionnel (**Kasiske BL et al. 2000**). L'inflammation est un facteur de risque important de morbi-mortalité à long terme en transplantation rénale. En effet, la littérature fait état d'études observationnelles et d'études de registre indiquant que la PCR, biomarqueur de l'inflammation, est associée, à la fois dans la population générale et chez les patients transplantés rénaux à une survenue accrue d'événements athéromateux et/ou à une mortalité plus élevée toutes causes confondues (**Willerson JT et al. 2004, Pai JK et al. 2004, Bakri RS et al. 2004, Varaganam M et al. 2004, Ducloux D et al. 2004, Winkelmayr WC et al. 2004, Winkelmayr WC et al. 2007**). Par ailleurs, en hémodialyse et en dialyse péritonéale ainsi que dans la population générale, une association entre concentrations sériques d'IL-6 et morbidité cardiovasculaire et mortalité a également été rapportée (**Noh H et al. 1998, Stenvinkel P et al. 2002, Zimmermann J et al. 1999, Pai JK et al. 2004, Ridker PM et al. 2002**). Cette association a récemment été retrouvée, en transplantation rénale, par Abedini et al. lors d'une analyse post-hoc de l'étude ALERT (**Abedini S et al. 2009**).

Nous nous sommes, dans ce travail, uniquement intéressés aux déterminants génétiques des complications à long terme de la transplantation rénale (athérosclérose, insulino-résistance, néoplasie et dysfonction chronique d'allogreffe), toutes reconnues actuellement comme étant des pathologies inflammatoires chroniques (**Ross R 1999, Shacter E et al. 2002, Wang S et al. 2008, Pickup JC et al. 1998**). En effet, lors de ces travaux, notre intérêt s'est porté sur l'influence de la réponse immunitaire innée en transplantation rénale. Comme dit précédemment, les complications précoces après transplantation rénale sont essentiellement d'ordre immunologique, représentées majoritairement par le rejet aigu. L'immunité adaptative joue alors un rôle important, et l'étude de ses déterminants génétiques est rendue difficile par l'influence que peuvent exercer sur elle chaque immunosuppresseur, et leurs différentes associations. L'immunité innée est peu affectée par les immunosuppresseurs conventionnels et des anomalies ou des variations de réponse d'origine génétique pourraient ainsi jouer un rôle pathologique plus important que dans la population générale. Par ailleurs, l'immunité est très fortement impliquée dans les complications précédemment citées.

II-1 /Inflammation chronique et athérosclérose

II-1-1/ Place de l'immunité innée

L'athérosclérose est une pathologie chronique des grosses artères se développant au niveau de l'intima. Elle est caractérisée par la formation de plaques elles-mêmes constituées par une accumulation de lipides. Cette plaque est le siège d'une réaction inflammatoire, dont l'agent initiateur le plus important est le cholestérol-LDL (lipoprotéines de faible densité) sous une forme oxydée (LDL oxydées). Différents types d'arguments étayent l'hypothèse déjà ancienne faisant de l'athérosclérose une maladie inflammatoire (**Glass CK et al. 2001, Hansson GK et al. 2005**). L'analyse histologique de la plaque d'athérome, l'utilisation des modèles animaux explorant l'immunité innée et adaptative, ainsi que le rôle particulier de différentes cytokines, et enfin les études épidémiologiques ont permis de mieux comprendre les relations complexes entre réponse immunitaire et initiation/progression de la maladie athéromateuse (**Ridker PM et al. 2003**).

Schématiquement, la plaque athéromateuse évolue en plusieurs stades : la strie lipidique, des lésions intermédiaires et des lésions compliquées (**Figure 8**) (**Stary HC et al. 1994, Stary HC et al. 1995**).

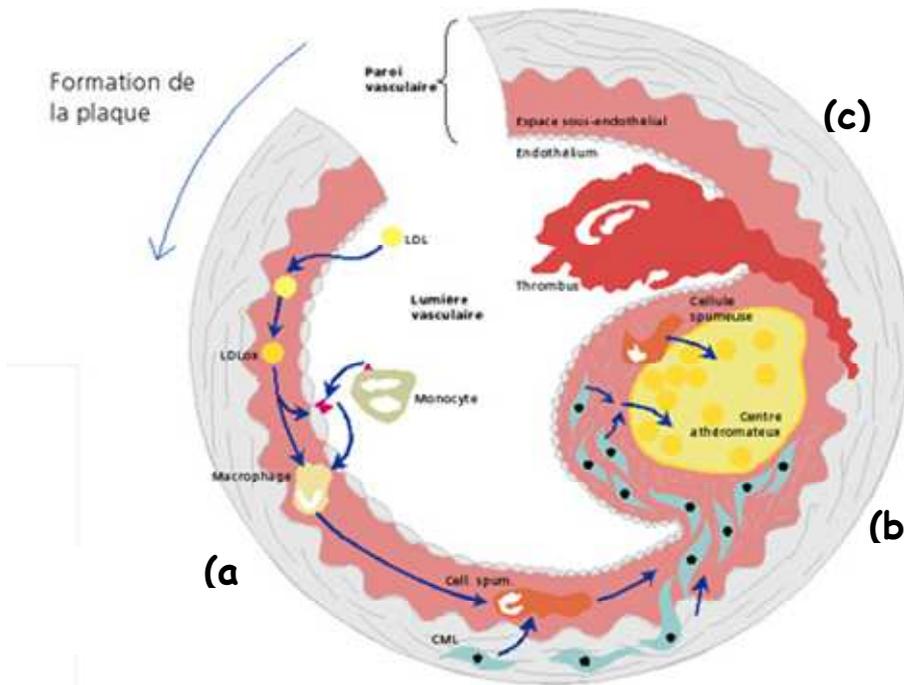


Figure 8: Représentation simplifiée de l'athérogénèse. **(a)** Formation des stries lipidiques. Les monocytes se transforment en macrophages après diapédèse puis en cellules spumeuses (cell spum) après accumulation de lipides (sous la forme de LDL oxydés, LDLox). Les cellules musculaires lisses (CML) vont subir une transformation et une phase de prolifération dans l'intima. **(b)** La lésion intermédiaire. Formation d'une coque fibreuse qui isole la lésion de la lumière vasculaire. La coque fibreuse renferme un mélange de leucocytes, de lipides et débris cellulaires qui forment un noyau nécrotique. **(c)** La lésion compliquée. L'expansion du noyau nécrotique, mais aussi la présence dans le noyau nécrotique d'enzymes protéolytiques, conduisent à la fragilisation de la coque fibreuse qui en s'ulcérant libère son contenu nécrotique à l'origine des phénomènes thrombotiques liés à l'activation de la coagulation entraînant l'occlusion de l'artère.

1^{ère} étape : la strie lipidique (Figure 8)

Lors de la phase initiale (strie lipidique), la plaque athéromateuse contient essentiellement des macrophages riches en lipides intra-cytoplasmiques, appelés cellules spumeuses (*foam cells*) et exprimant fortement à leur surface les récepteurs scavengers impliqués dans la phagocytose des LDL oxydées (LDLox). En présence de LDLox, les macrophages subissent une modulation phénotypique qui se traduit par une forte expression à leur surface de

récepteurs scavengers. Ceci a pour conséquence la capture et l'accumulation intracytoplasmique de matériel lipidique par les macrophages qui deviennent des cellules spumeuses. Ces cellules sont à l'origine de la formation de la strie lipidique. Les molécules engagées dans le recrutement, le roulement, l'adhérence et la migration trans-endothéliale des monocytes sanguins jouent un rôle central dans cette phase (**Hanson GK et al. 2002**). Les molécules intervenant dans la croissance et la différenciation des monocytes en macrophages jouent là aussi un rôle important (**Smith JD et al. 1995**). Des modèles animaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes immunologiques impliqués dans la phase de formation des stries lipidiques. Le **tableau 1** en résume les principaux résultats. Ces modèles animaux sont basés sur l'utilisation de souris génétiquement susceptibles de développer une athérosclérose accélérée : les souris apoE $-/-$ (invalidées pour le gène de l'apolipoprotéine E) ou les souris LDL_R $-/-$ (invalidées pour le gène du récepteur des lipoprotéines de faible densité [LDL]).

Familles de molécules	Modèles murins	Effets sur l'athérome comparés aux souris LDL _R ^{-/-} ou apoE ^{-/-}	Références bibliographiques
Molécules d'adhérences	Sélectine P ^{-/-}	Diminution x 1,25 à 2	Collins RG et al. J Exp Med 2000
	Sélectine E ^{-/-}	Diminution x 1,3	Collins RG et al. J Exp Med 2000
	ICAM ^{-/-}	Diminution x 1,4	Collins RG et al. J Exp Med 2000
Facteur de croissance	M-CSF ^{-/-}	Diminution x 5	Smith JD et al. Proc Natl Acad Sci 1995
Chimiokines et récepteurs de chimiokines (lignée monocytaire et macrophagique)	MCP-1	Diminution x 5	Gu L et al. Mol cell 1998
	CCR2 ^{-/-}	Diminution x 3	Boring L et al. Nature 1998
Récepteurs « scavenger » (impliqués dans la capture des LDL oxydées)	SRA ^{-/-}	Diminution	Suzuki H et al. Nature 1997
	CD36 ^{-/-}	Diminution x 4	Febbraio M et al. J Clin Invest 2000

Tableau 1 : Formation comparée des stries lipidiques dans différents modèles animaux d'athérosclérose avec ou sans déficit en molécules d'adhérence, facteurs de croissance, chimiokines ou récepteurs « scavenger » (d'après **Hansson GK et al. 2002**). Ceci illustre le rôle de l'endothélium activé et des monocytes/macrophages.

D'un point de vue dynamique, l'hypercholestérolémie est à l'origine de l'adhérence des monocytes à l'endothélium artériel : elle stimule la sécrétion des molécules d'adhérence par les cellules endothéliales (**Quinn MT et al. 1985, Quinn MT et al. 1987, Kim JA et al. 1997**). En outre, l'hypercholestérolémie est à l'origine de la formation de LDLox ayant des propriétés chimiotactiques sur les monocytes. Plusieurs études suggèrent que les lipides oxydés et plus particulièrement les LDLox sont les principaux « antigènes » de la plaque. Les

LDLox peuvent être à l'origine de la réponse immunitaire en se comportant comme un signal danger activant les cellules de l'immunité innée (**Matzinger P 1994, Matzinger P 2002, Iwasaki A et al. 2004, Palm NW et al. 2009**). Les LDLox sont donc de puissants stimuli inflammatoires. Il a également été établi que la liaison des LDLox au CD36, un des récepteurs scavengers, induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (**Janabi M et al. 2000**).

Les stries lipidiques vont progressivement évoluer vers des lésions intermédiaires. A ce stade, la plaque contient des macrophages chargés en lipides, des cellules musculaires lisses dans l'intima et surtout des LcT qui vont jouer un rôle central dans cette étape, puisqu'ils vont pouvoir sécréter des cytokines pro- et anti-inflammatoires après activation. Durant cette phase, les cellules musculaires lisses migrent de la média vers l'intima et y prolifèrent en réponse à certaines cytokines (IFN- γ et IL-4) et certains facteurs de croissance sécrétés par les cellules endothéliales lésées, les macrophages et les LcT activés *in situ*. Il en résulte une hypertrophie de l'intima (**Matsuura E et al. 2002**).

2^{ème} étape : les lésions intermédiaires (Figure 8)

Les lésions intermédiaires évoluent par la suite vers des lésions avancées avec formation d'une coque fibreuse qui isole la lésion de la lumière vasculaire. La coque fibreuse renferme un mélange de macrophages et lymphocytes, de lipides et de débris cellulaires qui forment un noyau nécrotique. Néanmoins, ce noyau continue à croître par le biais d'une adhérence et d'une infiltration leucocytaire continue de la lésion par les mêmes mécanismes que ceux décrits lors des deux précédentes phases. L'expansion du noyau nécrotique, mais aussi la présence au sein de ce noyau nécrotique d'enzymes protéolytiques conduisent à la fragilisation de la coque fibreuse qui en s'ulcérant libère son contenu nécrotique. Ceci contribue aux phénomènes thrombotiques par activation de la coagulation pouvant entraîner l'occlusion de l'artère. Les macrophages jouent un rôle au niveau de la matrice extracellulaire

de la plaque. L'activation des macrophages s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion de métalloprotéinases (MMP), enzymes protéolytiques dégradant la matrice extracellulaire et donc la plaque d'athérome (**Ross R 1999**). Cette activité MMP est régulée par la sécrétion d'inhibiteurs, les TIMPS (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase). La production par les macrophages de MMP-2 et -9 conduisant à la rupture des plaques est en revanche induite par la PGE2 en réponse à une augmentation de l'activité de la COX-2 (**Cipollone F et al. 2001**).

Les macrophages ne sont pas les seules cellules de l'immunité innée infiltrant la plaque d'athérome et pouvant jouer le rôle de CPA. En effet, les CD8 ont également été identifiées au sein de la plaque (**Doherty TM et al. 2006**). Ces cellules portent des PRRs et pourraient également être activées par les LDLox et d'autres ligands présents dans la plaque. Les CD8 sont les CPAs professionnelles les plus efficaces de l'organisme pour activer les LcT naïfs. Donc, l'activation des CD8 au sein de la plaque d'athérome peut ainsi être à l'origine de l'activation de l'immunité adaptative. Les cellules NK sont également présentes dans la plaque d'athérome (**Melian A et al. 1999, Chan WL et al. 2005, Bobryshev YV et al. 2002**).

Les lésions athéromateuses contiennent d'ailleurs des chimiokines responsables du recrutement entre autre des cellules NK. CX3CL1 (fractalkine) et l'IL-15, toutes deux impliquées dans la migration et l'activation des cellules NK, sont présentes dans les plaques athéromateuses humaines et murines (**Greaves DR et al. 2001, Lesnik P et al. 2003, Wuttge DM et al. 2001**). Les souris LDL_R ^{-/-} ayant des cellules NK incapables de libérer leurs granules cytotoxiques (souris Lyst^{beige}) ont une réduction des lésions athéromateuses suggérant le rôle pro-athérogène de ces cellules (**Schiller NK et al. 2002**). Chez les souris CX3CR1^{-/-} apoE^{-/-} il est observé une diminution de moitié de la taille des plaques d'athérome au niveau du sinus aortique et de l'aorte thoracique, en comparaison avec les souris contrôle CX3CR1^{+/+} apoE^{-/-}. Cette variation de taille est associée à une diminution du contenu en macrophages des plaques. Ces différents éléments suggèrent que la réponse

immunitaire innée joue un rôle important dans l'athérogénèse. L'immunité adaptative comme l'immunité innée affectent l'athérogénèse. Cependant, l'immunité innée semble nécessaire à la formation des lésions, contrairement à l'immunité adaptative, qui la régule uniquement. Les réponses innées étant peu affectées par les traitements immunosuppresseurs, leur rôle pourrait être amplifié chez les patients transplantés.

II-1-2/ Aspects cliniques

L'incidence des complications athéromateuses est beaucoup plus importante après transplantation rénale que dans la population générale. Les données épidémiologiques les plus fiables concernent essentiellement les syndromes coronariens aigus. A partir des données du registre Medicare, Kasiske et al ont estimé à environ 3% l'incidence de l'infarctus du myocarde dans la première année suivant la transplantation (**Kasiske BL et al. 2006**). Gill et al ont montré, sur une cohorte de 604 patients en attente de transplantation, qu'alors que l'incidence des évènements cardio-vasculaires était constante tout au long des 36 mois d'attente sur liste (12,7% chez les diabétiques et 4,5% chez les non diabétiques), elle augmentait considérablement dans la première année suivant la transplantation (18,9% chez les diabétiques et 5,8% chez les non diabétiques) (**Gill JS et al. 2005**). Dans notre registre, l'incidence des évènements coronariens à un an et l'incidence cumulée à 7 ans sont respectivement de 1,6% et 5% (données non publiées) confirmant l'excès de risque majeur dans la première année de transplantation. L'incidence des évènements cardiovasculaires est donc plus élevée après transplantation rénale que dans la population générale (**Kasiske BL et al. 1996, Kasiske BL et al. 2000**). L'augmentation du risque varie d'un facteur 3 à 20 selon l'âge. Cette observation ne peut être uniquement expliquée par la prévalence accrue des facteurs de risque traditionnels (**Ducloux D et al. 2004, Kasiske BL et al. 1996, Kasiske BL et al. 2000**). De nombreux facteurs de risque non traditionnels ont été identifiés et beaucoup

d'entre eux sont extrêmement prévalents chez les insuffisants rénaux et les transplantés rénaux. Parmi ces facteurs, l'inflammation joue un rôle majeur dans la population générale, mais aussi chez les patients transplantés. Notre équipe a montré que la PCR, biomarqueur inflammatoire, était un facteur de risque cardiovasculaire indépendant (**Ducloux D et al. 2004**). De même, nous avons montré que les polymorphismes du récepteur TLR4 diminuaient le risque de complications athéromateuses après transplantation (**Ducloux D et al. 2005**). Les TLRs, comme précédemment décrit, jouent un rôle central dans la reconnaissance du pathogène et dans l'initiation de la réponse inflammatoire (**Kiechl S et al. 2003, Pasterkamp G et al. 2004**). Notre groupe a récemment montré que les transplantés rénaux ayant un TLR-4 muté (remplacement de l'acide aspartique en position 299 de TLR4 par une Glycine ou remplacement d'une thréonine en position 399 par une isoleucine) et moins fonctionnel pour délivrer un signal inflammatoire, ont un risque athéromateux moindre (**Ducloux D et al. 2005**). D'autres molécules impliquées dans la transduction du signal au niveau du macrophage tel que Nod sont connus pour affecter la fonction de cette cellule à produire des cytokines pro-inflammatoires et pourraient donc influencer la progression de l'athérome.

D'autres arguments confirment le rôle de l'inflammation dans l'athérosclérose post-transplantation. Nous nous sommes intéressés depuis plusieurs années aux relations entre reconstitution lymphocytaire, inflammation et athérosclérose. En effet, les globulines anti-lymphocytaires polyclonales (ATG) sont utilisées dans la prévention et le traitement du rejet aigu en greffe d'organes. L'ATG est à l'origine d'une élimination brutale et majeure des LcT CD4, suivie d'une reconstitution progressive du pool de ces LcT. Néanmoins, une lymphopénie T CD4 peut persister plusieurs années chez certains patients et ceci concerne environ 20% des patients (**Muller TF et al. 1997**). Les patients lymphopéniques ont un syndrome inflammatoire plus marqué comme en témoigne des concentrations sériques de PCR plus élevées (**Ducloux D et al. 1998**). Ce syndrome inflammatoire favoriserait

l'athérogénèse (**Ducloux D et al. 2003**). Cependant, ce syndrome inflammatoire s'intègre probablement dans des perturbations plus complexes du système immunitaire s'apparentant à une immuno-sénescence accélérée (**Bamoulid J. données non publiées**). Le vieillissement du système immunitaire entraîne des modifications des réponses adaptatives dominées principalement par l'involution thymique (diminution de la production de LcT naïfs, diminution de la capacité à générer une réponse T, restriction du répertoire T). Par ailleurs, ces patients ayant une lymphopénie T CD4 ont également un syndrome inflammatoire et une production de cytokines restreintes à l'IFN- γ (**Hakim FT et al. 2007**).

Enfin, la transplantation elle-même pourrait également être athérogène en étant à l'origine de phénomènes inflammatoires, soit du fait du conflit immunitaire allogénique, soit du fait de la présence de signaux « Danger » non spécifiques représentés par l'acte chirurgical ou la conservation du greffon. Nous avons mis en place un modèle de souris apoE -/- pour étudier la relation entre transplantation et athérosclérose. Nous avons utilisé des souris de fond C57BL/6 mâles et femelles âgés de 8 à 14 semaines ainsi que des souris femelles apoE -/- sous fond génétique C57BL/6 âgées de 10 à 23 semaines. Nous avons étudié l'impact d'une greffe de peau allogénique ou autologue sur l'évolution des plaques d'athérome de souris ApoE -/- (**données non publiées**). Nous avons mis en évidence une augmentation de la quantité de plaques d'athérome chez les souris greffées quelle que soit l'origine du greffon. Ainsi, la transplantation pourrait agir via des phénomènes inflammatoires induits par la présence du transplant sur le développement des lésions vasculaires.

Tous ces éléments suggèrent que l'inflammation joue un rôle majeur dans l'athérosclérose accélérée des patients transplantés. Les facteurs à l'origine d'un état inflammatoire chronique sont principalement le transplant, certains traitements immunosuppresseurs, les infections et l'insuffisance rénale. Il est probable qu'il existe une susceptibilité individuelle à générer une

réponse inflammatoire plus ou moins importante et que celle-ci dépende en partie de caractéristiques génétiques.

II-2/ Inflammation chronique et insulino-résistance

L'inflammation chronique joue un rôle important dans la pathogénie du diabète de type 2 (**Pickup JC et al. 1998**). Cette relation est démontrée par nombres d'études prospectives montrant que l'élévation de l'IL-6 ou de la PCR est un facteur de risque indépendant de survenue d'un diabète de type 2 dans la population générale (**Spranger J et al. 2003, Hu FB et al. 2004, Pradhan AD et al. 2001**). La physiopathologie du diabète post-transplantation (New Onset Diabetes After Transplantation ou NODAT) s'apparente à celle du diabète de type 2, marquée principalement par une insulino-résistance et accessoirement par une insulino-pénie. L'inflammation pourrait par conséquent jouer un rôle dans la survenue d'un NODAT.

II-2-1/ Place de l'immunité innée

L'insulino-déficience responsable de l'hyperglycémie du diabète de type 2 est précédée par 10 ou 20 ans d'hyper-insulinisme secondaire à une insulino-résistance des tissus périphériques. L'anomalie métabolique fondamentale qui précède le diabète de type 2 est donc l'insulino-résistance.

L'obésité est associée à une réponse inflammatoire chronique caractérisée par une production anormale d'adipokines et l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoire, se traduisant par une augmentation des concentrations sériques de différents marqueurs de l'inflammation. Ceux-ci interviennent dans le rôle délétère de l'adiposité viscérale sur les paramètres métaboliques. Peu à peu s'est donc dégagé la notion que la cellule adipeuse pouvait partager avec les cellules du système immunitaire un certain nombre de propriétés.

Le tissu adipeux (TA) / L'adipocyte

Le TA est localisé dans plusieurs zones de l'organisme et les dépôts adipeux sont classés en 2 catégories : le TA sous-cutané et le TA profond (viscéral, non viscéral, intra et péri-musculaire). Les dépôts sous-cutanés et profonds semblent avoir des profils sécrétoires différents, le TA viscéral présentant une plus forte expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α) que le TA sous-cutané (**Fain JN et al. 2004, Einstein FH et al. 2005**). Au cours du développement de l'obésité, l'infiltration macrophagique semble être plus importante dans le TA profond comparativement au TA sous-cutané (**Harman-Boehm I et al. 2007**). Enfin la quantité de TA profond est plus fortement corrélée à l'insulino-résistance que celle du TA sous-cutané (**Fox CS et al. 2007**). Le TA présente une grande hétérogénéité cellulaire. Les cellules présentes peuvent être séparées en 2 grandes populations : les adipocytes matures et la fraction stroma-vasculaire (FSV) (**Rodbell M 1964**). L'adipocyte représente le type cellulaire majoritaire. La FSV comprend, elle, des pré-adipocytes pouvant dans certaines conditions se différencier en macrophages, des cellules endothéliales participant à la néovascularisation du TA et ainsi à son développement, des cellules d'origine hématopoïétique (macrophage, cellules NK et LcT $\gamma\delta$) et les cellules progénitrices (**Charriere G et al. 2003, Caspar-Bauguil S et al. 2005**).

Médiateurs biologiques de l'insulino-résistance

► Les adipokines : cytokines sécrétées et synthétisée par le tissu adipeux

La capacité sécrétoire et le profil des sécrétions de l'adipocyte varient au cours de la différenciation adipocytaire et avec l'inflammation du TA associé à l'obésité. Ces dernières années des approches de type protéomique ont été menées afin de mieux caractériser le « sécrétome » du TA (**Kratchmarova I et al. 2002, Wang P et al. 2004**). Ainsi, 259 protéines sont sécrétées par le TA humain, plus particulièrement par le TA viscéral (**Alvarez-**

Llamas G et al. 2007). Ces sécrétions sont classées en 5 catégories : signalisation, homéostasie de matrice extracellulaire, fonction immunitaire, fonction de dégradation et autres. Parmi ce nombre considérable de molécules sécrétées, des études suggèrent que seul 1/3 des adipokines proviendrait de l'adipocyte même et que la FSV, plus particulièrement les macrophages, serait responsable de la majorité des protéines sécrétées au niveau du TA (**Chen X et al. 2005, Fain JN et al. 2006**) .

Certaines adipokines ont des fonctions immuno-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α . Il est maintenant bien établi que la quantité d'IL-6 produite par le TA humain est augmentée en situation d'obésité (**Fried SK et al. 1998, Bastard JP et al. 2002**). Il a pu être estimé que 15-30% des concentrations circulantes d'IL-6 pouvaient être attribuée à la production par le TA, en l'absence de processus inflammatoire aigu (**Mohamed-Ali V et al. 1997, Fontana L et al. 2007**). L'IL-6 est davantage produite dans le TA viscéral que dans le TA sous-cutané. La majorité de l'IL-6 du TA provient des cellules de la FSV, composée en particulier de cellules endothéliales et de monocytes-macrophages (**Fried SK et al. 1998**). Beaucoup de données cliniques soutiennent un lien entre la quantité de TA en particulier viscéral et la capacité de production d'IL-6. Il existe d'ailleurs une corrélation entre l'IMC (Index de Masse Corporelle) et la valeur de PCR chez des individus en bonne santé (**Ford ES 2003**). Cette observation est à rapprocher de l'élévation du contenu en IL-6 dans le tissu adipeux des individus obèses présentant une PCR élevée. En outre, une valeur augmentée de PCR chez un individu obèse majore d'au moins 2 fois le risque de survenue de diabète de type 2 dans les 3 à 4 ans (**Barzilay JI et al. 2001**). Les taux plasmatiques d'IL-6 sont donc étroitement corrélés à l'IMC et inversement reliés à la sensibilité à l'insuline (**Bastard JP 2000, Bastard JP 2002**). Le mécanisme reliant IL-6 et insulino-résistance est complexe. De nombreux travaux récents ont permis de démontrer l'existence d'interactions entre les voies de signalisation des cytokines et celles de l'insuline. Ces interactions conduisent en général à une diminution de la

signalisation de l'insuline en présence de cytokines (**Figure 9**). L'insulino-résistance médiée par l'IL-6 reposerait à l'étage moléculaire sur la production d'une protéine appelée SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3) après fixation de l'IL-6 à son récepteur. La SOCS3 contre-régule la voie de signalisation de l'IL-6 mais agit aussi sur la voie de signalisation de l'insuline. La liaison de l'insuline à son récepteur membranaire spécifique, via l'activité tyrosine-kinase qu'il possède, permet une autophosphorylation du récepteur, puis la phosphorylation, sur des résidus tyrosine, des protéines substrats telles que les protéines IRS (insulin receptor substrate). Cet événement active 2 grandes voies de signalisation, celle de PI3 kinase (phosphatidylinositol-3 kinase) impliqué dans les effets métaboliques (transport du glucose, lipogénèse...) et la voie des MAP-kinase (mitogen activated protein kinase) impliquée dans les effets nucléaires, la croissance et la différenciation. L'un des mécanismes moléculaires importants pouvant entraîner une résistance à l'insuline est une phosphorylation anormale soit du récepteur à l'insuline, soit de l'IRS. SOCS3 secondaire à la libération excessive par le TA de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, est à l'origine d'une phosphorylation inactivatrice de l'IRS entraînant une insulino-résistance (**Figure 9**) (**Kroder G et al. 1996, Mooney RA et al. 2001, Lagathu C et al. 2003**). De la même manière que l'IL-6, le TNF- α , cytokine pro-inflammatoire, est surexprimé dans le TA de différents modèles animaux d'obésité (**Hotamisligil GS et al. 1993**). Le TNF- α recombinant altère la sensibilité à l'insuline de cellules ou d'organismes entiers et les souris déficientes en TNF- α ou en récepteurs du TNF- α présentent une sensibilité accrue à l'insuline par rapport aux animaux témoins (**Hotamisligil GS et al. 1993, Uysal KT et al. 1997**). La surexpression de TNF- α par le TA des modèles animaux d'obésité contribue ainsi très vraisemblablement à l'insulino-résistance. L'augmentation chronique des concentrations circulantes d'IL-6 et TNF- α , en diminuant l'action de l'insuline, pourrait donc être une cause d'insulino-résistance.

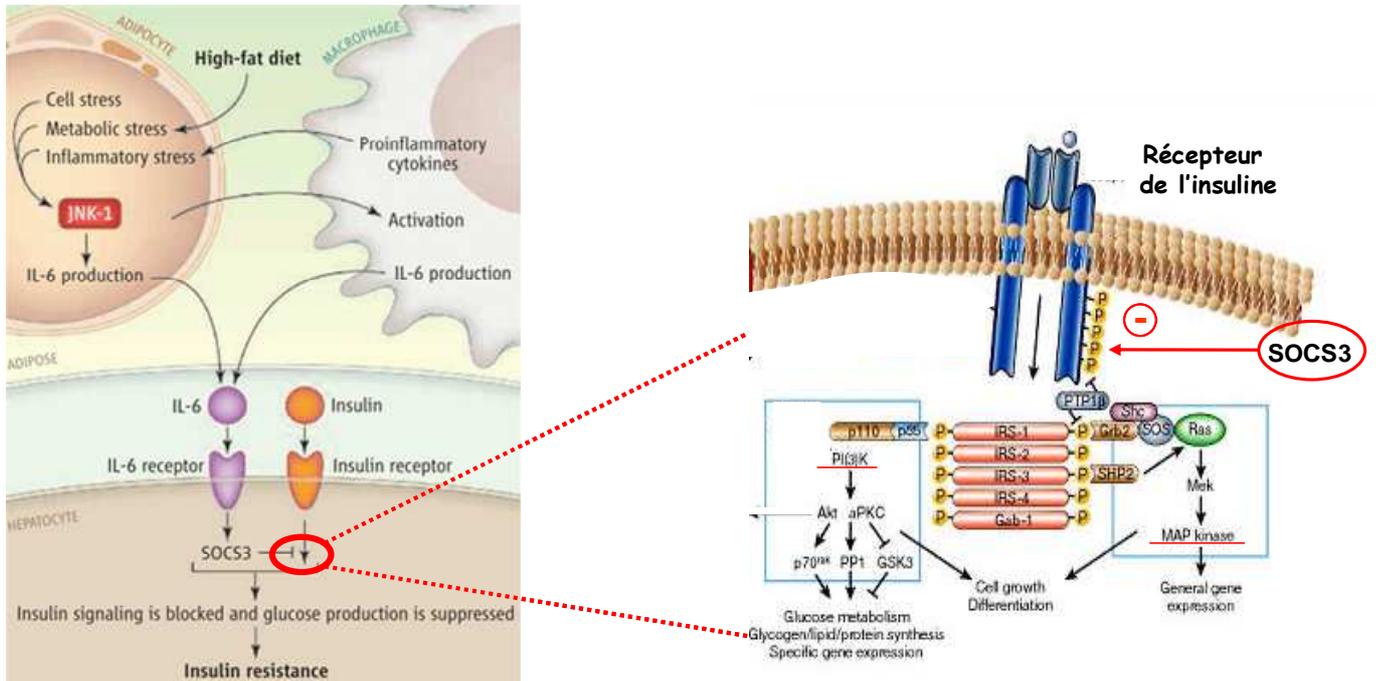


Figure 9: Interactions entre les voies de signalisation de l'IL-6 et celles de l'insuline. Mécanisme d'insulinorésistance via l'inhibition de la transduction du signal du récepteur de l'insuline par SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3). La liaison de l'insuline à son récepteur membranaire spécifique, via l'activité tyrosine-kinase qu'il possède, permet une autophosphorylation du récepteur, puis la phosphorylation, sur des résidus tyrosine, des protéines substrats telles que les protéines IRS (insulin receptor substrate). Cet événement active 2 grandes voies de signalisation, celle de PI3 kinase (phosphatidylinositol-3 kinase) impliqué dans les effets métaboliques (transport du glucose, lipogenèse...) et la voie des MAP-kinase (mitogen activated protein kinase) impliquée dans les effets nucléaires, la croissance et la différenciation. SOCS3 à l'origine d'une phosphorylation inactivatrice de l'IRS entraîne une insulino-résistance.

A l'inverse de l'IL-6 et du TNF- α , certaines adipokines ont un effet anti-inflammatoire et insulino-sensibilisant. C'est tout particulièrement le cas de l'adiponectine (ADPN). Elle est majoritairement sécrétée par le TA et sa production est inversement proportionnelle à la masse de TA viscéral. Les taux d'ADPN sont ainsi plus bas chez les sujets obèses, mais également chez les patients diabétiques (Arita Y et al. 1999, Yang WS et al. 2001, Hotta K et al. 2000). Plus récemment, il a été montré que des taux bas d'ADPN constituaient un facteur de risque indépendant de diabète de type 2 (Lindsay RS et al. 2002, Spranger J et al. 2003, Duncan BB et al. 2004). L'ADPN a en effet des propriétés anti-inflammatoires et

augmente la sensibilité des tissus à l'insuline (**Berg AH et al. 2002**). Les mécanismes d'action de l'ADPN sont résumés dans la **Figure 10**.

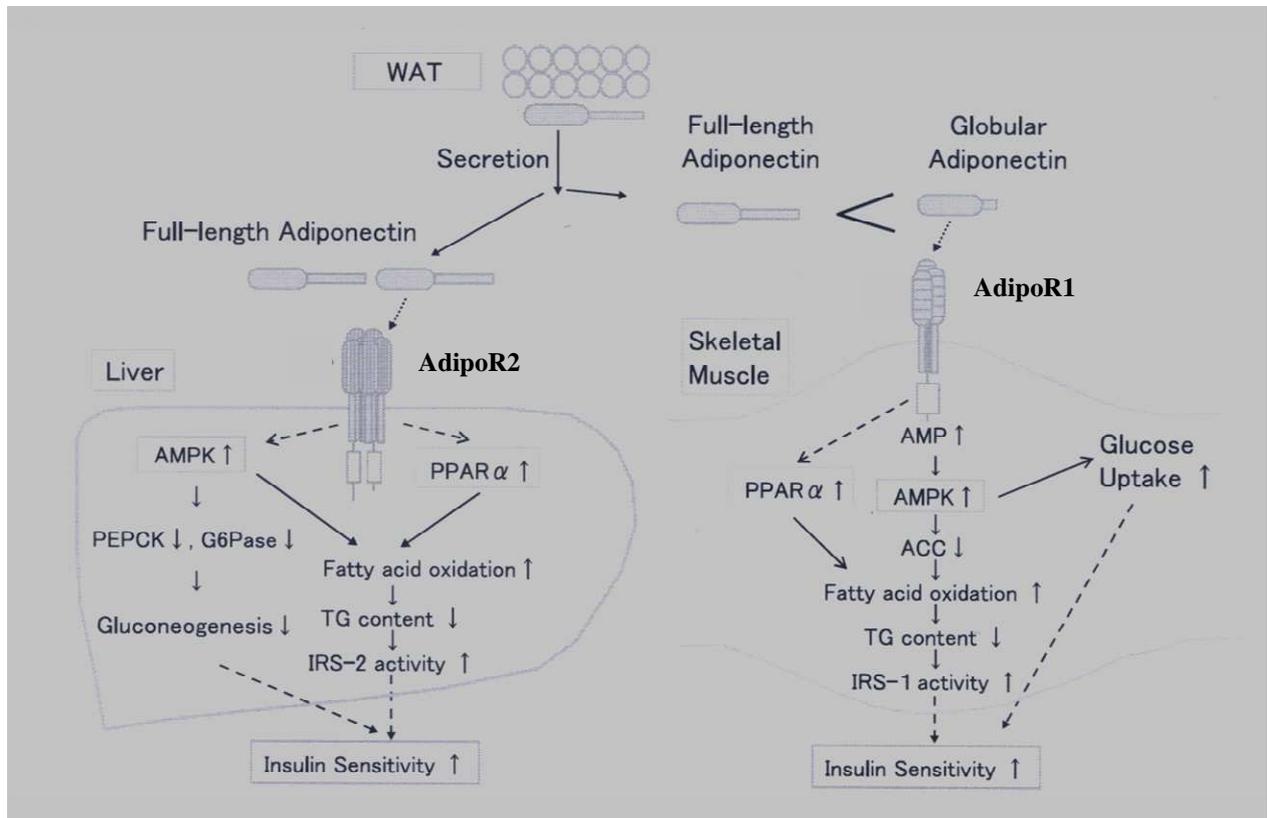


Figure 10 : La signalisation de l'adiponectine (ADPN) se fait *via* deux récepteurs AdipoR1 et AdipoR2. AdipoR1 a une expression ubiquitaire, mais plus importante au niveau du muscle, tandis qu'AdipoR2 est principalement exprimé au niveau hépatique. L'ADPN augmente la sensibilité à l'insuline par stimulation de l'activité de l'AMPK (Adenosine monophosphate kinase). L'activation de l'AMPK stimule l'activité des IRS (Insulin receptor substrate) et inhibe la production hépatique de 2 enzymes de la néoglucogénèse : la PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) et la G6Pase (Glucose-6 phosphatase).

D'autres adipokines ont été décrites (leptine, résistine, visfatine, ...) et jouent un rôle dans la sensibilité tissulaire à l'insuline (**Antuna-Puente B et al. 2008**). Leurs actions sont résumées dans la **Figure 11**.

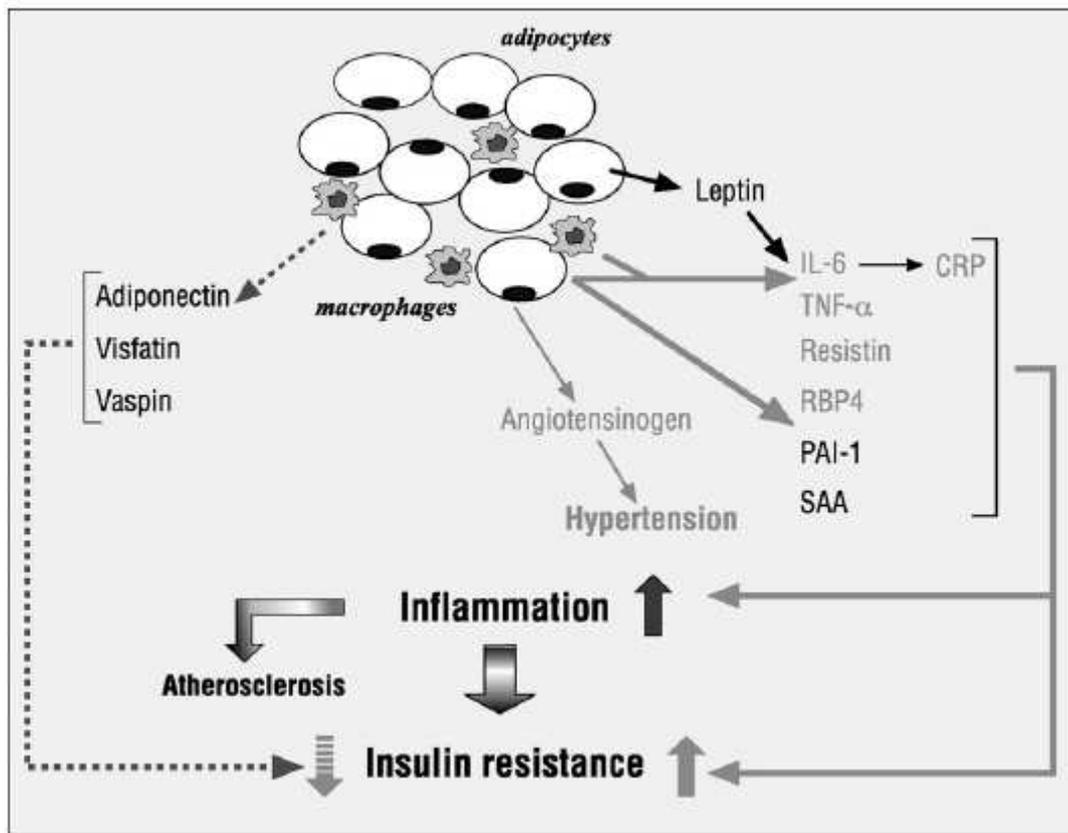


Figure 11: Le TA (adipocytes + FSV) produit des cytokines ayant des propriétés opposées. Certaines sont pro-inflammatoires et diminuent la sensibilité à l'insuline, tandis que d'autres ayant des propriétés anti-inflammatoires augmentent la sensibilité des tissus à l'insuline.

► Infiltration macrophagique dans le tissu adipeux : Rôle des chimiokines

L'infiltration du TA par des macrophages rend compte de l'inflammation observée au cours de l'obésité. Récemment, le rôle d'une chimiokine, MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1 aussi appelée CCL2), dont la fonction consiste principalement à recruter les cellules de l'immunité innée sur les sites inflammatoires, a été impliqué dans le recrutement de macrophages au sein du TA. L'expression de MCP-1 est étroitement corrélée à l'indice de masse corporelle (IMC) chez l'homme (**Bruun JM et al. 2005, Christiansen T et al. 2005**). Ses effets cellulaires dépendent de son interaction avec le récepteur CCR2. MCP-1 pourrait être à l'origine du recrutement des macrophages au cours de la mise en place de l'obésité et du diabète de type 2. Chez la souris invalidée pour le récepteur CCR2 ou recevant un

traitement par un antagoniste de CCR2, l'infiltration macrophagique induite par un régime gras diminue significativement. Dans ces 2 approches, l'homéostasie glucidique et la sensibilité à l'insuline sont améliorées (**Weisberg SP et al. 2006**). Toujours dans le domaine des chimiokines, l'étude du polymorphisme M280T du gène codant pour *CX3CR1* révèle une fréquence accrue de l'allèle M280 chez les patients obèses ainsi qu'une augmentation significative du tour de taille au sein des 2 cohortes testées (**Sirois-Gagnon et al. 2010**). Ceci suggère un rôle de *CX3CR1* dans la physiopathologie de l'obésité. L'immunité innée intervient donc dans l'insulino-résistance par deux mécanismes distincts. Les chimiokines participent à créer un environnement inflammatoire au sein du TA. En revanche, les cytokines IL-6 et TNF- α interfèrent avec les voies métaboliques, modifiant principalement la sensibilité à l'insuline.

Il est à l'heure actuelle assez légitime de penser que la production excessive de cytokines pro-inflammatoires par le tissu adipeux d'individus obèses, et en particulier par les macrophages présent au sein de ce tissu, ainsi que le défaut de cytokines anti-inflammatoires, participent à la physiopathologie de l'insulino-résistance. Les macrophages du TA constituent la principale source de synthèse et de sécrétion des médiateurs inflammatoires chez les patients obèses. Pour mieux comprendre les relations entre obésité - inflammation au sein du TA et insulino-résistance, il est nécessaire de continuer à élucider les mécanismes par lesquels les monocytes sont attirés au sein du TA, ainsi que les mécanismes impliqués dans leur différenciation en macrophage au sein du TA.

► Voies intracellulaires de l'inflammation

Deux facteurs transcriptionnels majeurs de l'inflammation, NF- κ B et AP-1 et leurs enzymes partenaires clés, respectivement l'IKK (Ikappa kinase) et JNK (c-Jun NH2-terminal kinase), ont été particulièrement étudiés. L'invalidation des gènes participant à ces complexes de transcription module la sensibilité à l'insuline. Les souris hétérozygotes IKK-béta $^{+/-}$, nourries

avec un régime hyperlipidique, ou croisées avec les souris ob/ob génétiquement obèses, présentent une baisse significative de leur glycémie et une moindre insulino-résistance avec en parallèle une signalisation insulinique plus performante (**Yuan M et al. 2001, Kim JK et al. 2001**). En concordance avec ces résultats, une inhibition sélective de la fonction de NF- κ B dans le TA protège contre le développement d'une insulino-résistance dans des modèles d'obésité nutritionnelle ou génétique (**Cai D et al. 2005**). L'activité JNK est par ailleurs augmentée chez les souris obèses (**Hirosumi J et al. 2002**).

L'effet de ces voies de l'inflammation est également très fortement suggéré par l'effet protecteur de certains composés anti-inflammatoires vis-à-vis de l'insulino-résistance associée à l'obésité. Ainsi l'aspirine est capable d'inhiber les voies IKK et JNK (**Yin MJ et al. 1998, Gao Z et al. 2003**). Chez l'homme, de fortes doses d'aspirine sont capables d'améliorer la sensibilité à l'insuline des diabétiques de type 2 (**Shi X et al. 1999**). D'autres médicaments aux propriétés anti-inflammatoires bien documentées, tels que les statines, possèdent également des effets antidiabétiques. Les statines sont capables de moduler les fonctions endothéliales et de migration leucocytaire trans-endothéliale, d'inhiber la libération de cytokines pro-inflammatoires et d'interférer directement sur la voie du NF- κ B (**Weitz-Schmidt G 2002**). Les thiazolidinediones (TZDs : troglitazone, rosiglitazone et pioglitazone), autres molécules aux propriétés anti-inflammatoires, sont également utilisées en tant qu'antidiabétique oraux. Les TZDs sont des agonistes des récepteurs PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor). Les récepteurs PPARs appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires, régulateurs majeurs des gènes impliqués dans le contrôle métabolique. On en distingue 3 sous-types : PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ . Ils forment un hétérodimère avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR). Ces dimères PPAR-RXR se fixent sur des séquences spécifiques de l'ADN pour stimuler ou réduire la transcription de gène cibles à

l'origine de leurs propriétés anti-inflammatoires et de leur rôle dans l'homéostasie du glucose

(Figure 12: exemple de PPAR α)

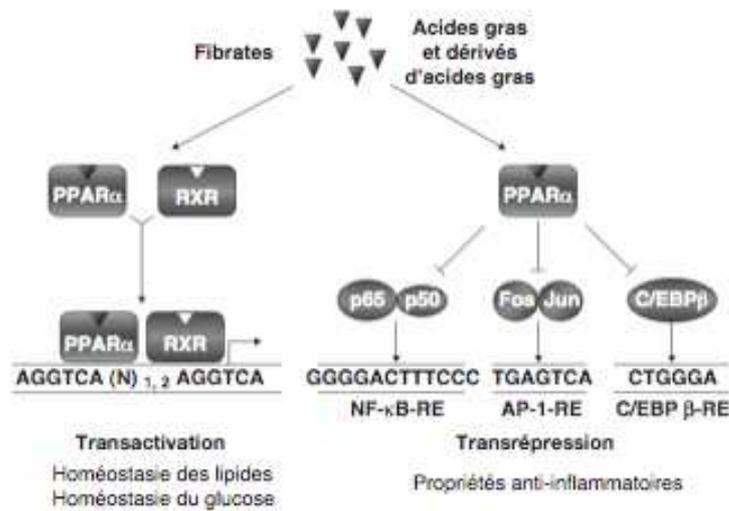


Figure 12: Rôle des récepteurs PPAR (Ici exemple du récepteur PPAR α). Les dimères PPAR-RXR se fixent sur des séquences spécifiques de l'ADN pour stimuler ou réduire la transcription de gène cibles à l'origine de leurs propriétés anti-inflammatoires et de leur rôle dans l'homéostasie du glucose

Chez l'homme, on trouve dans le TA une expression significative de l'ARNm de PPAR γ qui est quasiment indétectable dans les autres tissus humains testés. PPAR γ est donc la forme des PPARs spécifique du TA. Les eicosanoïdes en particulier les PG des séries A, D et J (dont la 15 δ -PGJ2) sont des ligands naturels, endogènes des PPAR γ . Cependant la plupart des agonistes endogènes n'ont qu'une sélectivité limitée pour les sous-types PPAR. Les TZDs, agonistes synthétiques des PPAR γ , possèdent des propriétés anti-diabétiques en améliorant la sensibilité à l'insuline, suggérant donc fortement que PPAR γ pourrait jouer un rôle dans l'action de l'insuline et l'insulino-résistance. Il existe, par ailleurs, un paradoxe en ce sens que certains AINS (Anti-inflammatoire non stéroïdien: indométhacine et ibuprofène) qui sont par définition des inhibiteurs de COX-2 peuvent se comporter comme des agonistes des sous-types PPAR α ou γ .

II-2-2/ Aspects cliniques

Le NODAT est une complication fréquente après transplantation rénale. Son incidence augmente depuis une dizaine d'années. Par ailleurs, son incidence augmente avec le délai post transplantation : 9,1% à 3 mois, 16% à 12 mois et 24% à 36 mois. En Europe, son incidence selon les études varie entre 10 et 20% (**Cosio FG et al. 2001, Kasiske BL et al. 2003**). Dans un travail multicentrique récent nous avons montré que 10% des patients transplantés développent un NODAT dans les 6 premiers mois suivant la transplantation rénale (**Courivaud C et al. 2010**). La survenue d'un NODAT est associée à une morbi-mortalité cardio-vasculaire élevée (**Ducloux D et al. 2005**). Le NODAT est également associé en transplantation rénale à un risque accru de perte de greffon et de décès (**Miles AM et al. 1998, Cosio FG et al. 2002**). Les facteurs de risques de développer un NODAT dans la littérature sont principalement les suivants : l'âge, l'IMC, l'origine ethnique, l'existence d'une infection par le virus de l'hépatite C et certaines thérapeutiques immunosuppressives sont également considérées comme « diabétoènes » (corticostéroïdes, anticalcineurines et inhibiteurs de la voie m-Tor) (**Davidson J et al. 2003**).

L'éviction de ces différentes molécules dans les protocoles thérapeutique à long terme en transplantation fait courir le risque de complications immunologiques et notamment de rejet d'allogreffe. C'est pourquoi l'approche préventive par l'analyse précise des facteurs de risque, dont la susceptibilité génétique, est indispensable, pour mieux individualiser l'immunosuppression des patients transplantés.

Le rôle de l'inflammation et des différentes adipokines dans la physiopathologie du NODAT a été peu étudié. Bayés et al ont rapporté que des taux bas d'ADPN avant transplantation prédisaient le risque de NODAT (**Bayés B et al. 2007**). L'utilisation de statines diminue le risque de NODAT (**Prasad GV et al. 2004**). En revanche, le rôle des autres adipokines, en

particulier de l'IL-6 et du TNF- α , n'a pas été étudié. Une meilleure caractérisation de leur rôle pourrait autoriser leur utilisation au sein d'algorithme de risque.

II-3/ Inflammation chronique et cancer

Le développement d'un cancer après transplantation est le résultat d'interactions complexes entre des facteurs immunologiques et non immunologiques. Il est maintenant largement reconnu qu'il existe une relation de cause à effet entre l'inflammation et le cancer et que l'immunité innée y joue un rôle prépondérant. Les agents infectieux, principalement les virus, font partie des causes de cancer et participent au développement de diverses tumeurs (**Pisani P et al. 1997**). Lors de la réaction inflammatoire induite au site d'infection, une large batterie de cytokines et de chimiokines est libérée pour activer et recruter les leucocytes au niveau de la lésion. Les infections persistantes induisent une inflammation chronique qui, par l'induction de cytokines pro- et anti-inflammatoires, peut provoquer des cascades de phénomènes mutagènes. L'exposition chronique à ces médiateurs de l'inflammation engendre une augmentation de la prolifération cellulaire, une mutagenèse, une activation d'oncogènes et l'angiogenèse (**Shacter E et al. 2002**). Les associations les plus répandues, qui couvrent près de 20% de toutes les tumeurs, sont celles des papillomavirus associés au cancer ano-génitaux et cutanés, le virus Epstein-Barr (EBV) et les lymphomes B, le virus HHV8 et le sarcome de Kaposi et les virus de l'hépatite B et C et le cancer du foie (**Coussens LM et al. 2002**). Un autre exemple n'impliquant pas d'agents infectieux, et démontrant l'association entre inflammation chronique et maladie néoplasique est celui qui existe dans la cancérogenèse colique chez les patients présentant une maladie inflammatoire chronique de l'intestin. En effet, le risque de cancer colorectal est 5 à 20 fois plus important chez les malades atteints d'une colite ulcéreuse ou de la maladie de Crohn que dans le reste de la population (**Ekbom A et al. 1990, Gillen CD et al. 1994**). Ce risque augmente de manière exponentielle avec la sévérité, l'étendue et la durée de l'inflammation.

II-3-1/ Place de l'immunité innée

COX-2 (Cyclooxygénase-2)

Les COX sont des glycoprotéines membranaires permettant la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines (PG) et thromboxanes (**Kujubu DA et al. 1991**). Il existe 2 isoformes de COX : COX-1 est la forme constitutive, COX-2 est inductible, absente dans la plupart des tissus normaux et rapidement mobilisée dans des conditions pathologiques comme l'inflammation ou le cancer. Le taux d'expression de COX-2 augmente fortement dans les pathologies inflammatoires (**Herschman HR et al. 1995, Catley MC et al. 2003, Singh Ranger G et al. 2003**). De nombreuses équipes ont caractérisé le rôle de COX-2 dans certaines conditions physiopathologiques incluant l'inflammation, l'athérosclérose, la cancérogenèse et l'angiogenèse. COX-2 est exprimée dans les adénocarcinomes coliques, les cancers du sein, du pancréas, de l'œsophage, de l'estomac et du poumon (**Zhang H et al. 2002, Half E et al. 2002, Tucker ON et al. 1999, Shamma A et al. 2000, Van Rees BP et al. 2003, Wolff H et al. 1998**). Parmi les PG produites par COX-2, les PGE2 sont, par exemple, les plus abondamment trouvées dans les cancers colorectaux (**Rigas B et al. 1993**). Elle favorise la progression tumorale en stimulant la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, en inhibant l'apoptose et en augmentant le pouvoir invasif des cellules et en modulant l'immunosuppression (**Figure 13**) (**Backlund MG et al. 2005**). La PGE2 favorise une réponse lymphocytaire T de type 2, voire la différenciation en LcT régulateurs (**Baratelli F et al. 2005, Sharma S et al. 2005**).

Les modèles animaux de tumorigenèse intestinale ont permis de confirmer ces rôles de PGE2. En effet, l'administration de PGE2 à des souris Min (Multiple intestinal neoplasia), neutralise la régression des adénomes coliques induite par le traitement par anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui inhibe spécifiquement COX-2 (**Hansen-Petrik MB et al. 2002**). Wang et al. ont confirmé ces résultats en montrant que le traitement des souris Min par la

PGE₂ augmente significativement la taille et le nombre des adénomes intestinaux (**Wang D et al. 2004**). Les PGE₂ aggravent, en outre, les tumeurs coliques induites chez les rats par l'azoxyméthane, un cancérigène chimique spécifique du côlon (**Kawamori T et al. 2003**).

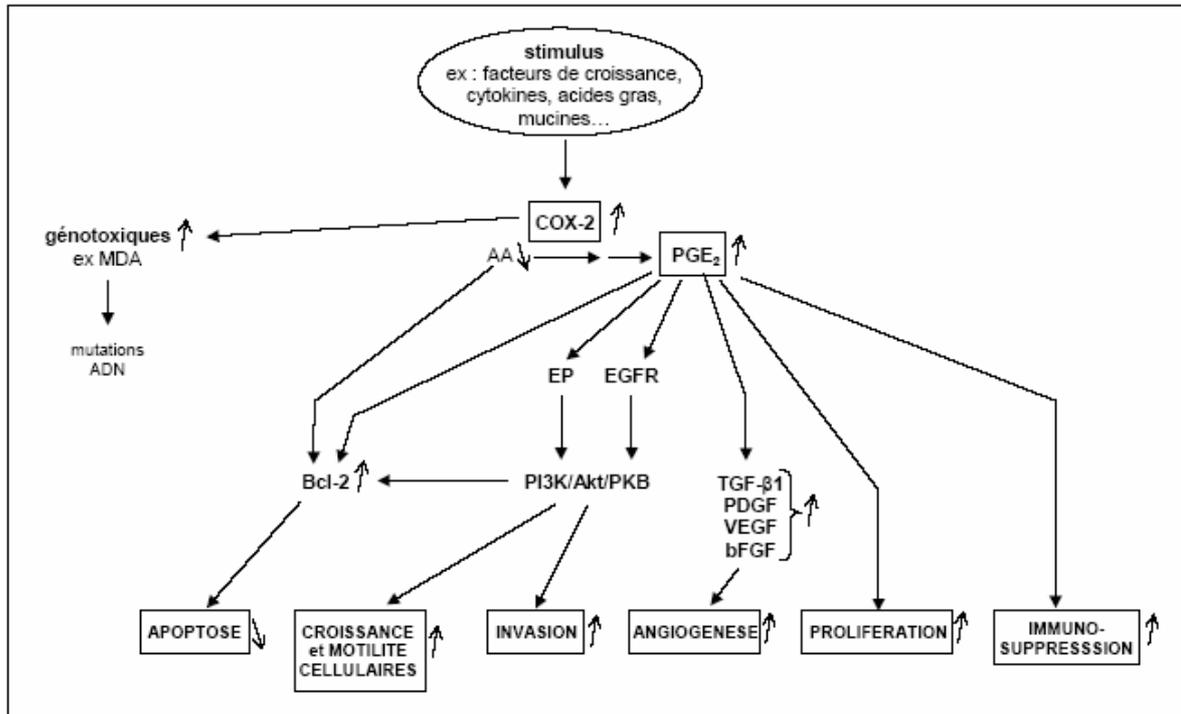


Figure 13: Intermédiaires de voies de signalisation et fonctions cellulaires contrôlées par COX-2 (cyclooxygénase-2) dans le contexte de progression tumorale. COX-2 gouverne l'expression et la synthèse d'un ensemble d'intermédiaires de signalisation et de pro-carcinogènes. Elle se comporte comme un promoteur de tumeurs et participe aux différentes étapes de la cancérogenèse en favorisant la survie et la prolifération cellulaire (protection contre l'apoptose, effets mitogènes), l'immunosuppression, l'invasion tumorale et métastatique.

Cellule NK et le couple CX3CR1/CX3CL1 (Fractalkine)

Les cellules NK sont les médiateurs de l'immunité innée anti-tumorale naturelle. Leur capacité à se déplacer, à adhérer à la membrane vasculaire et à traverser les endothéliums est fortement modifiée par l'action des chimiokines. Smyth et al ont découvert que lorsque l'on supprime la population NK par un Ac anti-NK1.1 chez des souris, celles-ci présentent une

incidence accrue des sarcomes induits par la méthylcholanthrene, cancérigène chimique, par rapport aux souris non traitées (**Smyth MJ et al. 2001**). Dans des modèles murins de métastases hépatiques et pulmonaires, la déplétion en cellules NK entraîne une augmentation du nombre de métastases, suggérant ainsi que les cellules NK protègent de la dissémination métastatique (**Smyth MJ et al. 2000**). Le rôle des cellules NK dans le contrôle des métastases a également été décrit grâce à un modèle de souris transgénique présentant une déficience sélective en cellule NK. L'injection intra-veineuse de cellules tumorales B16, cellules de mélanome murin, à ces souris entraîne l'apparition d'environ 60 fois plus de métastases pulmonaires que chez les souris « sauvages » (**Kim S et al 2000**). Chez l'animal il existe donc une corrélation inverse entre le développement des tumeurs et le niveau fonctionnel des cellules NK. Plus les cellules NK sont fonctionnelles et moins les tumeurs se développent. Les cellules tumorales ont une expression diminuée des molécules HLA de classe I leur permettant d'échapper aux LcT cytotoxiques (CTL), mais pas à la lyse des cellules NK ayant par ailleurs un mode d'action proche des CTL (**Figure 2**). L'action des cellules NK est potentialisée par certaines cytokines, l'IL-2 principalement. Cette potentialisation nécessite donc l'activation concomitante des Lc CD4 et des macrophages.

CX3CL1 (aussi nommée Fractalkine) est une chimiokine capitale dans le recrutement des cellules NK au site tumoral. Lavergne et al. démontrent le rôle anti-tumoral de cette chimiokine via sa capacité de recrutement des cellules NK au site tumoral. L'administration répétée sous-cutanée de lignées tumorales transfectées par CX3CL1 ralentit significativement la croissance tumorale, témoin d'un effet « protecteur » de cette chimiokine. Cet effet est par ailleurs dose-dépendant. Cette activité anti-tumorale persiste chez des souris Rag^{-/-} (souris déficiente en LcT et B) démontrant un effet indépendant des LcT et B. Cette inhibition de croissance tumorale disparaît, par contre, chez des souris déficientes en cellules lymphocytaires et cellules NK (souris NIH III) confirmant un mécanisme cellules NK

dépendant, et chez des souris IFN γ ^{-/-}, démontrant la nécessité d'une activation concomitante de cellules effectrices à l'origine de la production d'IFN- γ et potentialisant l'activité des cellules NK (**Lavergne E et al. 2003**).

II-3-2/ Aspects cliniques

Il est estimé que les cancers de novo seront la première cause de décès avec greffon fonctionnel chez les patients transplantés dans les prochaines 20 années. Cela est dû, d'une part, à l'augmentation de la survie post-transplantation et donc à l'immunosuppression prolongée qui en découle, et de l'autre au vieillissement de la population des patients transplantés. L'incidence annuelle des maladies néoplasiques après transplantation rénale est de 1% selon les données du registre CRISTAL en 2007 (**Agence de biomédecine. Rapport d'activité 2008**). L'incidence cumulée à 10 ans est elle de 7,9% soit un SIR (Standardized Incidence Ratio correspondant au rapport du nombre de cancers observés dans une population donnée sur le nombre de cancers attendus dans la population générale, ajusté sur le sexe et l'âge) multiplié par 2,6 par rapport à la population générale. L'augmentation du risque relatif de cancer après transplantation rénale est bien établie, même si dans les différents registres les cancers à distance de la transplantation sont certainement sous-rapportés. Globalement, le risque de cancer dans les différentes études internationales publiées est estimé comme étant 3 à 5 fois supérieur à celui de la population générale. Le risque de développer des épithéliomas cutanés, complication néoplasique la plus commune, peut être multiplié par 100 (**Euvrard S et al. 2003**). L'incidence des épithéliomas cutanés est de 82% après 20 ans en Australie et de 60% à 20 ans dans une population britannique (**Bordea C et al. 2004, Ramsay HM et al. 2003**). Les syndromes lymphoprolifératifs (Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders, PTLTD) arrivent en seconde position, avec une incidence d'après le registre français de 0,4% à

1 an et 1,2% à 5 ans après transplantation rénale (**Caillard S et al. 2006**). Après transplantation, l'utilisation d'immunosuppresseurs augmente le risque de développer un cancer de manière directe (rôle direct mutagène de certains immunosuppresseurs ainsi que sur la progression tumorale/dissémination métastatique). Par ailleurs, les immunosuppresseurs favorisent la survenue de cancers de manière indirecte via l'oncogenèse virale.

Il y a peu de données concernant le rôle de l'inflammation dans l'augmentation de l'incidence des cancers après transplantation (**Gazouli M et al. 2004**).

Une meilleure connaissance de l'immunité naturelle anti-virale et anti-tumorale est donc un domaine d'intérêt en transplantation.

II-4/ Inflammation chronique et dysfonction chronique du greffon (DCG)

Malgré les progrès de l'immunosuppression et l'amélioration de la prise en charge des patients, la dysfonction chronique du greffon (DCG) demeure une cause majeure de perte des greffons après transplantation rénale (**Nankivell BJ et al. 2003**). La DCG est aujourd'hui définie par des lésions tissulaires associant fibrose interstitielle et atrophie tubulaire correspondant à des facteurs lésionnels multiples, immunologiques (liées aux réponses immunes à médiation cellulaire et humorale dirigées contre les antigènes du greffon et influencées par les incompatibilités HLA entre donneur et receveur, ainsi que par l'existence d'Ac anti-HLA apparaissant avant et/ou après transplantation), et non immunologiques (temps d'ischémie froide et reprise retardée de fonction, âge du donneur, infection à CMV, HTA, dyslipidémie, usage des anti-calcineurines) (**Nankivell BJ et al. 2006**). La DCG est responsable de plus de 50% des pertes de greffons à long terme et constitue donc un enjeu majeur en transplantation rénale. Les mécanismes moléculaires et cellulaires en cause dans la DCG sont complexes. Cependant, l'inflammation chronique et la fibrose sont les 2 mécanismes physiopathologiques principaux de la DCG.

II-4-1/ Place de l'immunité innée

De nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes mis en jeu dans différents types d'agressions tissulaires des transplants (rejet aigu, dysfonction chronique, phénomène d'ischémie/reperfusion) et à l'origine d'un processus inflammatoire. Ces études ne concernent pas spécifiquement la dysfonction chronique du greffon, mais plus largement les mécanismes pro-inflammatoires et pro-fibrosant dans les transplants (**Goldstein DR et al. 2003, Palmer SM et al. 2006, Wang S et al. 2008, Ducloux D et al. 2004**).

Récepteurs rétinoïdes et PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor)

Kiss et al ont rapporté que des agonistes des récepteurs RAR (retinoic acid receptor) et RXR (retinoid X receptor) peuvent minimiser les lésions de rejet aigu dans des modèles murins de transplantation rénale (**Kiss E et al. 2003**). Les mêmes auteurs ont également montré dans un modèle murin de transplantation rénale que l'administration d'un agoniste des PPAR γ (rosiglitazone) améliorait, indépendamment de la dose utilisée, la fonction rénale et diminuait l'importance des lésions vasculaires chroniques par rapport à des animaux non traités (**Kiss E et al. 2010**). Dans ce même modèle, les dépôts de matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, décorine) étaient significativement plus faibles chez les rats traités. Ils observaient également une diminution du nombre de cellules mononuclées et de fibroblastes activés infiltrant le greffon. Ces monocytes avaient *in vitro* une activité migratoire et proliférative moindre. Compte tenu du rôle majeur des monocytes dans la physiopathologie de la DCG, la diminution d'infiltration monocyttaire de 50% observés dans ce modèle, avec pour les 50% restant des fonctions pro-inflammatoires et pro-fibrosantes diminuées sous l'influence de rosiglitazone, pourrait s'avérer intéressante en clinique. Les auteurs notent, par ailleurs, un effet additionnel de la combinaison d'agonistes des PPAR γ et de RAR/RXR sur le ralentissement de la fibrogenèse dans ce modèle expérimental.

Les prostalandines (PG)

PGE₂ est exprimé de manière ubiquitaire dans de nombreux tissus durant des phénomènes inflammatoires et sa synthèse provient de diverses cellules incluant des cellules immunes, des fibroblastes et des dermatocytes. PGE₂ exerce ses fonctions via 4 récepteurs : EP1 à EP4. Plusieurs études réalisées à partir de modèles murins déficients pour ces différents récepteurs ou à partir d'agoniste/antagoniste de ces récepteurs ont permis de comprendre les fonctions spécifiques de chaque récepteur. EP2 et EP4 jouent un rôle dans la régulation de la réponse immune. La liaison à EP2 inhibe la prolifération cellulaire T et la liaison à EP4 régule les

fonctions des cellules présentatrices d'antigènes (**Nataraj C et al. 2001**). PGE2 module les fonctions des cellules T et des macrophages par différents mécanismes (**Figure 14**) (**Nataraj C et al. 2001**):

- Stimulation de la production d'IL-10 par les cellules dendritiques et diminution de l'expression des molécules de co-stimulation à leur surface.
- Diminution de la production d'IL-2 essentielle à la prolifération cellulaire T.
- Inhibition de la production de cytokines telles que TNF- α et IL-12 et altération de la présentation des antigènes en inhibant l'expression des molécules CMH de classe II.
- Suppression de la synthèse d'IFN- γ par les cellules T CD4+ ou CD8+.
- Production d'IL-4 et IL-5 favorisée.

La production d'IFN- γ est un phénomène précoce en réponse à la sécrétion d'IL-12 par les macrophages et les cellules dendritiques, et ce phénomène est amplifié par d'autres cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-18 agissant en synergie avec l'IL-12. L'importance de ces mécanismes immunologiques acquis est démontré dans des études *in vivo* objectivant en l'absence d'IL-12 et d'IL-18, l'incapacité de sécrétion d'IFN- γ de manière précoce, ainsi qu'un profond déficit de réponse de type 1 vis-à-vis de pathogènes intracellulaires (**Gillespie KM et al. 2005**). Les fonctions immuno-modulatrices décrites ci-dessus expliquent la polarisation de la réponse immunitaire vers une réponse de type 2 favorisée par la production de PGE2. Dans des modèles murins de maladies auto-immunes, l'administration répétée de PGE2 diminue les manifestations cliniques d'auto-immunité et prévient les atteintes organiques liées à ces différentes pathologies (**Kelley VE et al. 1979**). PGE2 et ses analogues diminuent également l'incidence du rejet et améliore la survie du greffon à long terme dans des modèles animaux de transplantation (**Anderson CB et al. 1976, Fabrega AJ et al. 1992, Koh IH et al. 1992**). Les mécanismes de cet effet bénéfique dépendant de la PGE2 ont été récemment décrits par Aggarwall et al. (**Figure 14**) (**Aggarwal S et al. 2005**). Ceci a

également été illustré par Mahic et al. qui ont mis en évidence une augmentation d'expression de FOXP3, marqueur spécifique de la population T régulatrice (réponse immune Th3, Tr1) sous l'influence de PGE2 (Mahic M et al. 2006).

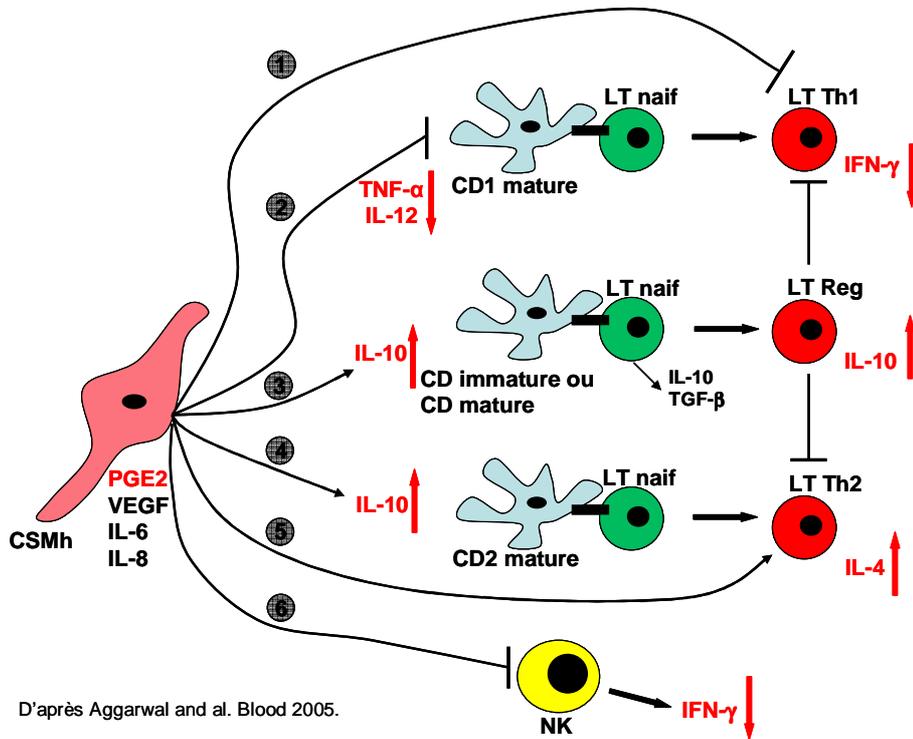


Figure 14: Implication de PGE2 dans le rôle immunomodulateur des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh). Les CSMh modulent la réponse immune en interagissant avec les cellules de l'immunité innée (CD par la voie 2 et 4, cellules NK par la voie 6) et de l'immunité adaptative (cellule T par la voie 1 et 5). L'inhibition de la sécrétion de TNF- α et la stimulation de sécrétion d'IL-10 par les CSMh affecte la maturation des CD ainsi que leurs propriétés fonctionnelles dont le résultat est une polarisation de la réponse immunitaire vers un phénotype « anti-inflammatoire/tolérance ». Lorsque les CSMh sont présente dans un microenvironnement inflammatoire, elles inhibent la sécrétion d'IFN- γ par les cellules T Th1 et cellules NK et augmentent la sécrétion d'IL-4 par les cellules T Th2, aboutissant à un « switch » de la polarisation immune dans le sens Th1 vers Th2. Abbreviations: CD : cellules dendritique ; cellules NK : cellules natural killer.

Le rôle de PGE2 illustre les interactions étroites entre immunité innée et adaptative, celles-ci pouvant orienter la réponse immunitaire adaptative vers un profil Th2, en interagissant avec des cellules de l'immunité innée telles que les CD.

Les TLRs (Toll-like receptors)

Les récepteurs TLRs exprimés à la surface de diverses cellules, sont également exprimés dans le rein à la surface des cellules épithéliales tubulaires, des podocytes et des cellules endothéliales (Akira S et al. 2004, Banas MC et al. 2008). Un déficit dans l'expression de TLR2 et TLR4 a été rapporté comme protecteur dans des modèles murins étudiant les lésions secondaires aux phénomènes d'ischémie-reperfusion (Leemans JC et al. 2005, Shigeoka AA et al. 2007). Cependant, le rôle des TLRs en transplantation rénale reste controversé. Dans un modèle de greffe cutanée murin invalidé pour MyD88 (myeloid differentiation factor -88 : protéine adaptatrice recrutée par certains TLRs pour activer les facteurs de transcription pro-inflammatoires NF- κ B et AP-1), Goldstein et al. ont observé une meilleure survie de la greffe cutanée, alors que la même greffe chez des souris invalidées pour TLR4 ne présente aucune différence en terme de survie du greffon par rapport à des souris « sauvages » (Goldstein DR et al. 2003, Samstein B et al. 2004). Des travaux *in vitro* et *in vivo* ont également mis en évidence le rôle de certains TLRs dans la fibrogenèse, mettant en évidence que TLR4, TLR9 ainsi que MyD88 lorsqu'ils sont non-fonctionnels sont associés à une diminution des marqueurs de fibrose hépatique dans différents modèle toxique et chirurgical de fibrose hépatique (Seki E et al. 2007, Watanabe A et al 2007). Ces différents travaux montrent le rôle de l'immunité innée via les récepteurs TLRs dans les mécanismes pro-inflammatoires et fibrosant en cause dans la physiopathologie de la DCG.

Les Chimiokines

Les chimiokines sont importantes dans les mécanismes d'angiogenèse et de fibrose et peuvent également avoir des effets anti-inflammatoires. Ces dernières années, de nombreuses études concernant les chimiokines et/ou leurs récepteurs ont été publiées dans des contextes cliniques ou expérimentaux d'allo-transplantation. Cependant il y a souvent plusieurs ligands pour un récepteur donné, et une chimiokine donnée peut également être le ligand de plusieurs récepteurs, rendant l'analyse des données difficile à interpréter au sein de ce réseau complexe. Plusieurs équipes n'ont pu montrer d'impact sur la survie de greffons de modèles murins KO pour les ligands MIP1 α (Macrophage inflammatory protein1- α) ou RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted) exprimés par les cellules mononucléées infiltrant les greffons lors des phénomènes de rejets (**Hancock WW et al. 2000, Gao W et al. 2000, Hancock WW et al. 2000**). D'autres ont, en revanche, en ciblant les récepteurs CCR5 et CCR1 par des modèles KO, observé une amélioration de la survie de greffons cardiaques chez les animaux ayant une invalidation de ces récepteurs invalidés (**Horuk R et al. 2001, Gao W et al. 2000**). CX3CR1 exprimé par les cellules NK, elles-mêmes impliquées dans les phénomènes de rejet, a également été étudié dans un modèle murin de transplantation cardiaque. Haskell et al ont montré que la survie des greffons n'est pas différente chez les souris CX3CR1 $^{-/-}$ ou CX3CR1 $^{+/+}$ (**Haskell CA et al. 2001**). Cependant, l'administration durant la transplantation de cyclosporine A (CsA) permet d'augmenter la survie des greffons cardiaques chez les souris CX3CR1 $^{-/-}$. Les auteurs concluent donc à un rôle important de CX3CR1 synergique avec la prise de CsA. L'effet des immunosuppresseurs peut donc moduler de façon variable l'impact des différentes chimiokines sur la greffe, rendant là encore difficile l'analogie de ces différentes expérimentations avec les différentes situations cliniques observées chez l'homme.

II-4-2/ Aspects cliniques

Chez l'homme, en transplantation rénale, une diminution du nombre d'épisodes de rejet aigu est rapportée en réponse à un traitement par analogue de la PGE2 (**Moran M et al. 1990**). Les fonctions immunomodulatrices de PGE2 détaillé ci-dessus pourraient être en cause dans le meilleur contrôle du rejet aigu observé dans cette étude.

Dans des protocoles de biopsies systématiques chez les patients transplantés rénaux, une surexpression de l'ARNm de TLR2, et non de TLR4, est corrélée avec une meilleure fonction du greffon à 2 ans (**De Groot et al. 2008**). Kruger et al. chez des patients transplantés rénaux étudient l'influence du polymorphisme en position 299 (Asp→Gly) et 399 (Thr→Ile) du gène *TLR4* responsable d'une perte de fonction de celui-ci. Ceux-ci objectivent une expression moindre, dans les greffons, des gènes pro-inflammatoires codant pour IL-18, TNF- α et MCP-1, elle-même corrélée à une meilleure reprise immédiate de fonction du greffon (**Kruger B et al. 2009**).

Sullivan et al. ont étudié en transplantation rénale le polymorphisme du gène de *CCR5* correspondant à une délétion de 32pb (*CCR5 Δ 32*). Environ 1% des caucasiens sont homozygotes pour *CCR5 Δ 32* avec pour conséquence un récepteur *CCR5* non fonctionnel. L'analyse de 1227 transplantés rénaux, avec une médiane de suivi de plus de 7 ans, montre que les homozygotes ont une meilleure survie du greffon par rapport aux hétérozygotes ou aux patients porteurs du génotype sauvage ($p < 0,05$) (**Sullivan JS 2001**). Ces données d'intérêt concernant les chimiokines corroborent également celles obtenues avec des modèles murins citées ci-dessus (**Horuk R et al. 2001**).

Le rejet chronique est une des principales causes de perte tardive des greffons en transplantation d'organe et aucun traitement ne permet actuellement d'en contrôler efficacement l'évolution. Améliorer notre compréhension de la physiopathologie du rejet

chronique pourrait nous offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques susceptible de prolonger la survie des greffons. Les nombreux essais de minimisation et de sevrage en terme d'immunosuppression montrent que l'amélioration de la fonction rénale n'est obtenue qu'au prix d'une augmentation de l'incidence du rejet aigu et qu'une sélection préalable des patients pouvant en bénéficier, fondée sur des marqueurs clinico-histo-biologiques est nécessaire (**Johnson RW et al. 2001, Smak Gregoor PJ et al. 2002, Hazzan M et al. 2005, Ekberg H et al. 2007**). Cette sélection peut également être améliorée par l'analyse de variants génétiques influençant le devenir du greffon à long terme.

III/ DETERMINISME GENETIQUE DE L'INFLAMMATION / POLYMORPHISMES

GENETIQUES

Depuis quelques années, le nombre de publications concernant d'éventuelles relations entre un variant génétique et un phénotype clinique a subi une croissance exponentielle (**figure 15**). Les résultats souvent contradictoires de ces études ont contribué à une méfiance légitime vis-à-vis des conclusions et des conséquences pratiques de ces travaux.

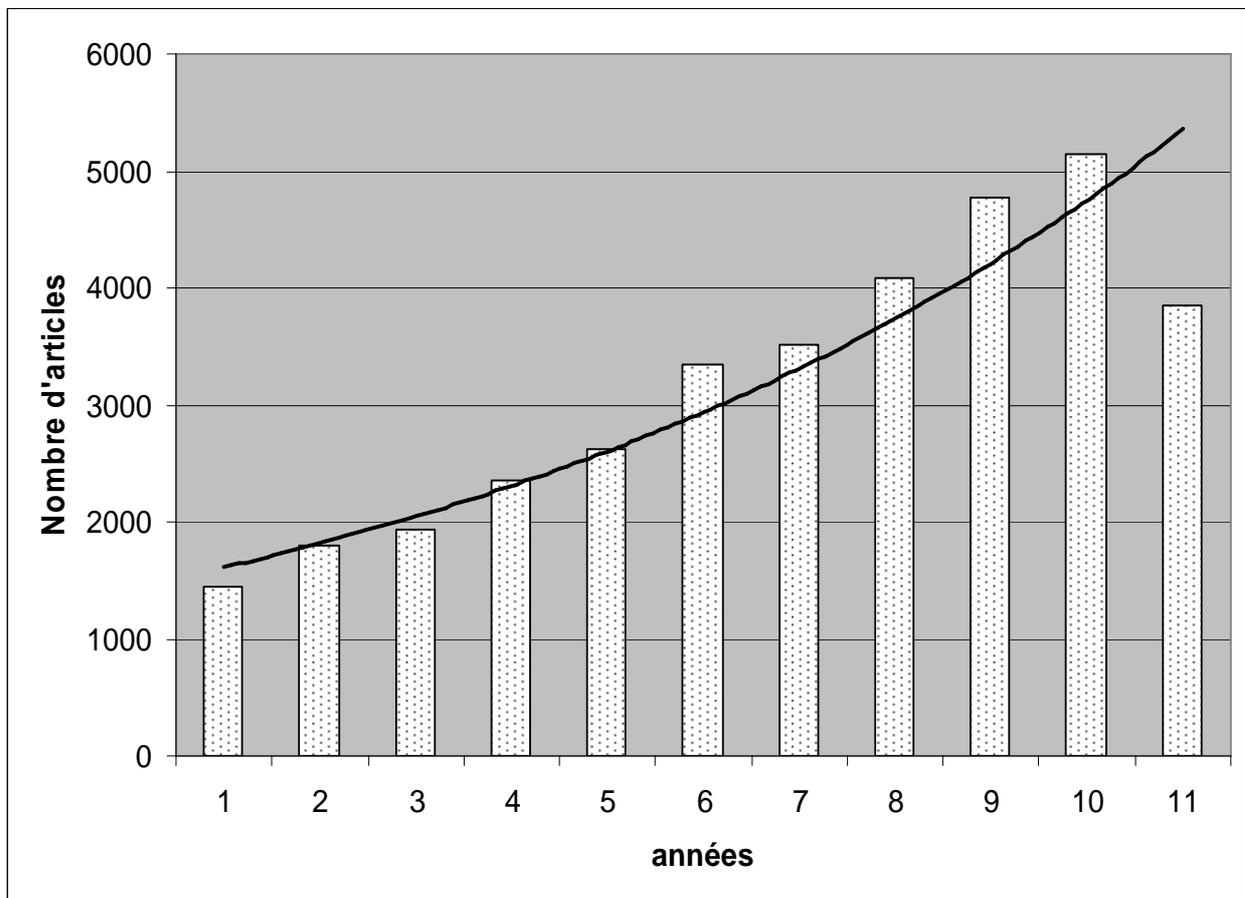


Figure 15: Evolution du nombre de publications d'études de polymorphismes entre 2000 et 2010. Données Web of Knowledge – mots clefs: genetic polymorphisms.

III-1/ Définition

Par convention, une variation rare (moins de 1% des lots de chromosomes) est appelée une mutation et une variation fréquente (à partir de 1%), un polymorphisme ou variant génétique.

Sur les 3 milliards de bases du génome humain, 99,9% sont identiques d'un individu à l'autre.

Les 0,1% restant représentent les variations ou polymorphismes, pourcentage infime, mais représentant 3 millions de nucléotides, qui sont à la base des différences entre les individus.

Rappelons que les polymorphismes résultent de 3 types de variations de la séquence d'ADN:

- Des polymorphismes simples de nucléotides (SNPs – single nucleotide polymorphism) ou polymorphismes touchant un seul nucléotide, qui correspondent à des substitutions de nucléotides.
- Des insertions ou des délétions de bases, qui peuvent impliquer une seule base ou des centaines de milliers de nucléotides.
- Des délétions d'ADN répétitifs (tandem repeats, microsatellites).

Certains polymorphismes n'ont aucun effet, tandis que d'autres peuvent affecter l'expression et la fonction de la protéine codée par le gène, ayant pour conséquences des variations phénotypiques pathologiques. Le polymorphisme le plus courant est le SNP. Il s'agit d'une variation dans la séquence nucléotidique retrouvée chez plusieurs individus d'une même espèce, qui se transmet de façon mendélienne. Quatre vingt dix pourcent de l'ensemble des variations génétiques humaines sont représentées par les substitutions d'une base, ou SNP. En effet sur les 3 milliards de paires de bases du génome humain qui contiennent environ 30 000 gènes, il a, jusqu'à maintenant, été identifié plus de 9 millions de SNP, avec près d'un SNP toutes les 1000-2000 paires de bases environs (**Sachidanandam R et al. 2001, Frazer KA et al. 2007**). La plupart sont bi-alléliques et se caractérisent par la fréquence d'un allèle minoritaire ou variant.

On classe les SNPs en fonction de la nature du nucléotide modifié. On distingue :

- Les SNPs non codants dans les régions 5' ou 3' non transcrites, dans les régions 5' ou 3' non traduites, ou encore dans les introns ou dans les régions intergéniques.
- Les SNPs codants peuvent être des polymorphismes de substitution (qui changent l'acide aminé qui est codé), ou des polymorphismes synonymes (où le codon change sans que l'acide aminé codé ne change).

Tous les SNPs proviennent de mutations, puisque la conversion d'un nucléotide en un autre est une mutation. Mais lorsque l'on observe un variant pour une séquence donnée dans une population, l'événement qui lui a donné naissance est généralement depuis longtemps révolu, ainsi le SNP observé ne constitue plus une mutation. Il s'agit tout au plus d'un variant de séquences rare ou d'un polymorphisme. On parle pourtant souvent de « mutation » pour décrire un allèle différent du type majoritaire, surtout lorsqu'on pense que l'allèle anormal est impliqué dans un caractère phénotypique. De plus la plupart des loci des populations naturelles présente plusieurs haplotypes, de sorte que le type sauvage est en fait un ensemble de différents haplotypes. Même dans le cas où un ou plusieurs haplotypes sont associés à un trait phénotypique, il n'est pas facile de distinguer entre les types sauvages et mutants. Il se peut même que la forme la plus rare soit la forme ancestrale et de nouveau on préférera parler de polymorphisme ou variant génétique.

III-2/ Applications

Les 2 applications principales des études de polymorphismes sont la génétique des populations correspondant à l'étude de la répartition des variants génétiques et la génétique quantitative correspondant à l'étude des relations entre SNPs et variations phénotypiques. Selon la théorie neutraliste de l'évolution moléculaire, la plupart des SNPs se maintiennent

dans les populations naturelles grâce à l'équilibre entre mutations et dérive génétique. Cela veut dire que le taux d'apparition des mutations dans la population est en équilibre avec le taux de perte de polymorphisme par un effet d'échantillonnage aléatoire. La plupart des mutations, qu'elles aient un effet délétère, favorable ou neutre, sont perdues après quelques générations, mais certaines d'entre elles atteignent des fréquences non négligeables et peuvent même être fixées de façon aléatoire. La structure des populations est également un déterminant crucial de la fréquence des allèles au sein d'une population et entre populations. Alors que les mouvements de population constituent une source potentielle de diversité, l'isolement affecte la vitesse de perte de ces variations par dérive génétique et une croissance rapide de la population change le spectre des fréquences de répartition des haplotypes.

III-2-1/ Biais liés aux caractéristiques des polymorphismes

Il y a 3 concepts importants dans la caractérisation des variations de type SNP:

La répartition de la fréquence des allèles

La grande majorité des SNPs sont rares. Seul le tiers à la moitié de tous les SNPs sont « communément répandus », en ce sens que l'allèle le plus rare est présent chez plus de 5% des individus. La structure de la population a un effet sur la fréquence relative des allèles parmi les populations. Tandis que certains allèles « propres » à une population donnée se révèlent utiles dans de nombreux cas, les différences de fréquence des allèles compliquent beaucoup les déductions. Le deuxième aspect important des fréquences de distribution concerne la diversité des nucléotides, c'est à dire la proportion moyenne de nucléotides qui sont différents pour une paire d'allèles prise au hasard dans une population. L'être humain présente une diversité de nucléotide relativement faible, avec une moyenne d'1 SNP par kilobase entre 2 chromosomes pour un individu donné.

Le déséquilibre de liaison (DL)

Le DL qualifie l'association non aléatoire entre allèles. Lorsque des allèles situés à 2 loci ou davantage ne sont pas transmis de façon indépendante, on parle de DL. En effet, lorsque 2 SNPs sont associés par hasard, la proportion attendue pour chacun des 4 génotypes possibles correspondant aux 2 loci peut être calculée en multipliant simplement les fréquences respectives des SNP pour chaque allèle. Si la proportion des doubles homozygotes, par exemple, dépasse celle prédite, il y a alors déséquilibre de liaison entre les SNPs. Ce DL peut empêcher de conclure correctement quant au sens de l'association entre 1 SNP, au niveau du génotype, et le phénotype correspondant. C'est pourquoi la caractérisation de l'importance du DL est essentielle dans la plupart des applications quantitatives de la génomique.

La stratification de la population

Ce terme désigne la répartition de la variation génétique entre les populations d'une même espèce. L'espèce humaine présente une variabilité géographique limitée. La plupart des SNPs humains se retrouve dans les principaux groupes raciaux. Une étude de la diversité de séquence sur au moins 2kb pour 313 loci chez 82 personnes non apparentées a montré que seuls 8% de tous les haplotypes étaient spécifiques de l'un des 4 groupes ethniques étudiés, et que 71% étaient communs à tous les groupes, même en se basant sur un aussi faible échantillon (**Stephens CA et al. 2001**). En admettant que les SNPs ayant des effets quantitatifs sur les caractères, notamment sur la sensibilité aux maladies soient pris en compte dans cette structure haplotypique, la variation des fréquences des haplotypes entre sous-population pourrait également avoir une grande influence sur les conclusions d'association entre génotype et phénotype.

III-2-2/ Ecueils des études d'association (Figure 17)

L'héritabilité de la maladie

Si la contribution génétique à la maladie est trop faible, aucun échantillon étudié n'aura une taille suffisante. Ainsi plus la physiopathologie de la maladie est complexe et fait intervenir de déterminants différents, plus il sera difficile d'identifier le rôle d'un facteur génétique. La non prise en compte de cet aspect, souvent couplée à un échantillon de population étudié insuffisant, peut faire conclure à tort à l'absence d'effet du variant génétique sur le phénotype observé.

Le nombre de gènes affectant la maladie

Plus le nombre de gènes est grand, plus la contribution moyenne de chacun est faible, et plus leur détection est ardue. Par ailleurs, les variants de chaque gène peuvent interagir avec les autres gènes impliqués.

La pénétrance et l'expressivité

Dans le cas de maladie humaine, la pénétrance peut dépendre par exemple de l'âge et conduire à des conclusions erronées. L'expressivité peut, elle, être modulée par l'environnement, pouvant alors entraîner de faux diagnostics ou une fausse classification du degré de gravité.

Le degré et l'uniformité de déséquilibre de liaison entre les marqueurs SNP

La variabilité de DL peut faire qu'une grande partie du génome ne puisse pas être évaluée.

L'hétérogénéité génétique

Ce terme décrit le fait couramment observé que différents loci ont une influence sur une même maladie. Il existe par exemple plus d'une douzaine de loci dont la mutation est la cause

de la rétinite pigmentaire. L'hétérogénéité allélique au sein d'un locus est un autre type d'hétérogénéité source de problèmes lors des études d'association. Par exemple, il existe près de 100 mutations différentes dans le gène CFTR responsables de la mucoviscidose.

La stratification de la population (Figure 16)

Des différences de fréquence des allèles et des haplotypes entre populations peuvent conduire à des associations positives incorrectes, ou dans le cas de transmission associée à des facteurs culturels ou environnementaux, à l'identification erronée d'une association comme cause vraisemblable.

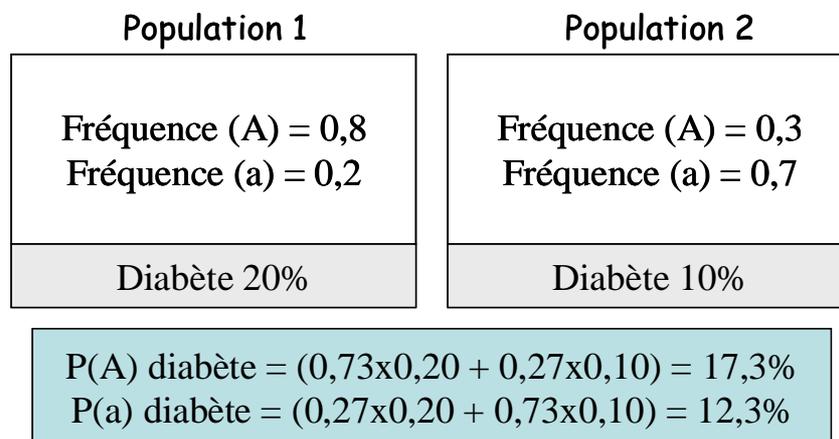


Figure 16 : Cet exemple illustre le biais de stratification. Du fait que 73% [$0,8 / (0,8 + 0,3) = 0,73$] des allèles A sont dans la population 1 où la maladie a une plus grande prévalence, l'allèle semblerait être associé à la maladie, mais il n'est pas nécessairement lié à un site ayant un véritable effet causal. Les facteurs environnementaux, culturels ou génétiques peuvent contribuer à une association apparente, même lorsque la structure de population n'est pas évidente pour l'observateur.

Flux génique

Un contact récent entre des populations précédemment séparées, peut entraîner un DL temporaire et de nouvelles structures de population qui passent souvent inaperçue. Les effets d'un tel flux génique vont évoluer au cours des générations, tandis que le taux d'hétérozygotie revient à la normale et que les fréquences des allèles atteignent un nouvel équilibre.

L'effet structurel non détectable de l'environnement

Cela est particulièrement important dans le cas de l'évaluation du facteur de risque pour des maladies comme l'obésité, le diabète et les maladies cardio-vasculaires.

Les interactions entre génotype et environnement et celles imputables uniquement au génotype

L'importance de telles interactions est largement inconnue, elles sont statistiquement extrêmement difficile à détecter et peuvent gêner la détection d'effets majeurs des loci de susceptibilité. Ces effets peuvent être particulièrement importants dans le cas de caractères spécifiques d'un groupe ainsi que dans certains cas de cancer.

Génotypage incomplet

Cela concerne les défauts d'information lorsque des individus manquent ou sont décédés.

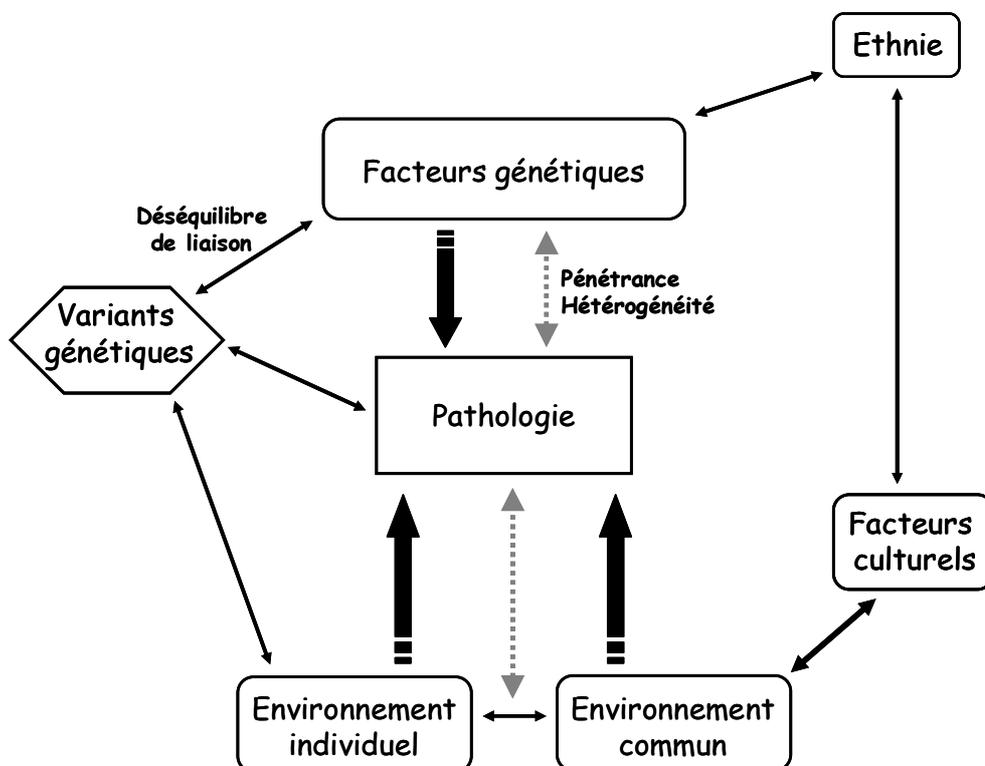


Figure 17: Interactions entre gènes et environnements contribuant au développement de phénotypes pathologiques

III-2-3/ Quelles conséquences pour les études cliniques de polymorphisme ?

Les études concernant la recherche de corrélation entre un polymorphisme allélique particulier et leur associations à diverses pathologies, sont actuellement nombreuses. Leur réalisation nécessite, pour être adaptée, des conditions de réalisations adéquates (**Editorial Freely associating 1999**).

Qualité de l'hypothèse initiale

Il est nécessaire dans les études d'association que le gène candidat étudié soit pertinent du point de vue physiopathologique. L'hypothèse doit donc se baser sur le fait que la mutation affecte une protéine dont l'altération d'une ou des fonctions est raisonnablement susceptible d'avoir les conséquences recherchées. Nous pouvons citer l'exemple, dans le domaine de l'infectiologie, de l'identification des récepteurs TLRs. La plupart des 10 récepteurs TLRs ont des polymorphismes fonctionnels dont 3 de ces récepteurs variants ont été associé à des sepsis sévères. Il s'agit de TLR4 qui reconnaît le LPS et les bactéries à gram négatif, TLR2 qui permet la détection des bactéries à gram positif, des mycobactéries et des levures et de TLR5 qui reconnaît la flagelline, protéine essentielle du flagelle bactérien. L'activation des récepteurs TLRs conduit à l'activation du facteur NF- κ B et est indispensable à l'induction de la réponse inflammatoire nécessaire à l'élimination des bactéries et au développement de la réponse immunitaire adaptative. On peut alors facilement concevoir qu'un polymorphisme de TLR4, TLR2 ou TLR5 puisse être associé à une augmentation de la sensibilité aux infections chez l'homme. Concernant le polymorphisme de TLR4 en position -299, notre équipe a précédemment validé cette hypothèse au sein d'une population de patients transplantés rénaux objectivant que les patients transplantés ayant un TLR4 muté et donc moins fonctionnel

étaient plus sujets aux infections bactériennes avec un risque relatif (RR) de 1,33, ainsi qu'aux infections opportunistes avec un RR de 3,03 (**Ducloux D et al. 2004**).

A noter, qu'un résultat positif peut être dû à un effet direct du SNP testé, cependant il est important de caractériser l'importance du DL comme cité ci-dessus. En effet, en présence d'une association entre un polymorphisme et une maladie il est possible que le polymorphisme associé ne soit pas le variant fonctionnel, mais qu'il soit en déséquilibre de liaison avec celui-ci. Réciproquement, si l'on ne trouve pas d'association, une explication peut être que le polymorphisme étudié n'est pas en déséquilibre de liaison avec le variant fonctionnel et donc l'absence d'association n'exclut pas le rôle du gène candidat considéré. Un résultat positif peut également être dû à une stratification de la population avec une association fortuite due à des différences de fréquences alléliques entre des cas et des témoins mal appariés et éventuellement à des différences ethniques.

Fonction biologique de la mutation

Une validation fonctionnelle confirmant que la variation de séquence nucléotidique a une conséquence sur l'activité de la protéine est également indispensable. Cette étape est loin d'être simple car l'effet des polymorphismes au niveau biologique est parfois difficile à établir. Les validations fonctionnelles peuvent être établies par dosage sérique dans le cadre, par exemple, d'étude de polymorphisme de cytokines dont le taux sérique est corrélé à la production. C'est le cas, par exemple de l'IL-6. Notre groupe a ainsi montré que le taux sérique d'IL-6 variait avec un polymorphisme du promoteur du gène de l'IL-6 en position -174 (**Bamoulid J et al. 2006**). De la même manière, l'étude de polymorphisme concernant un système enzymatique peut être validée grâce à la mesure de son activité biologique (mesure de la production de prostaglandine E2 lors de la validation fonctionnelle du polymorphisme de la COX-2 (**Courivaud C et al. 2009**)). Cela peut être plus complexe pour des études de polymorphisme, par exemple, lorsque la mutation affecte l'affinité d'un récepteur pour son

ligand. Une autre difficulté est rencontrée lorsque le dosage direct dans un liquide est impossible ou non pertinent et que la capacité de production doit être mesurée *in vitro* après stimulation plus ou moins spécifique. Dans ce cas, la pertinence du test est difficile à apprécier et l'interprétation de tels résultats est sujette à caution.

La taille de l'effectif

La plupart des tests statistiques utilisés dans le cadre de ces études requièrent en général des tailles d'échantillons dépassant 500 individus pour avoir une chance de plus de 80% de détecter un locus responsable d'au moins 5% de susceptibilité à la maladie. Peu d'études à ce jour font état d'échantillons de cette taille et des erreurs de second type (non détection de l'association alors qu'elle existe) sont donc probablement fréquente. Déterminer de façon adéquate la taille de l'échantillon dépend de plusieurs paramètres dont la fréquence de l'allèle mineur, la différence attendue entre cas-témoins, la complexité de la pathologie. Une étude récente sur les études de polymorphismes présentées à l'EDTA et à l'ASN illustre tout particulièrement cette insuffisance d'échantillonnage des études génétiques (**Figure 18**) (**Mondry A et al. 2006**).

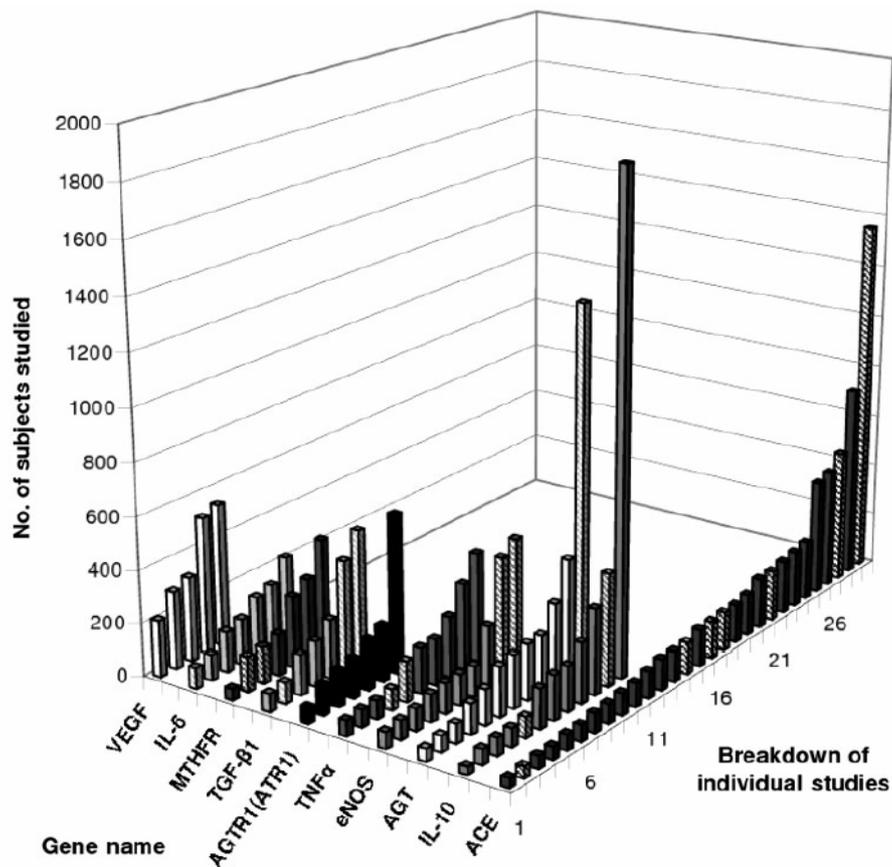


Figure 18: Distribution de la taille des effectifs des études de polymorphisme publiées en 2004 et 2005 Cette analyse est restreinte aux 10 gènes les plus étudiés (Mondry A et al. 2006).

Une taille inadaptée de l'échantillon peut conduire à un autre type de biais. Lorsque des études incluant un faible nombre de patients sont réalisées, leur probabilité de publication augmente si le résultat est positif, c'est-à-dire lorsqu'une association est retrouvée entre le variant génétique et le phénotype. Ceci induit un biais de publication. Un exemple est donné dans le **Tableau 2** concernant l'association entre le polymorphisme insertion/délétion du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et la progression des néphropathies à IgA.

Yorioka	Clin Nephrol 1995	48	progression	Oui
Hunley	KI 1996	64	progression	Oui
Stratta	AJKD 1999	81	progression	Oui
Tanaka	AJKD 1998	97	progression	Oui
Harden	Lancet 1995	100	progression	Oui
Syrjänen	Nephron 2000	168	progression	Oui
Schmidt	AJKD 1995	204	progression	Non
Schena	KI 2001	247	progression	Non
Frimat	JASN 2000	274	progression	Non
Narita	Hypertension 2003	276	progression	Non
Suzuki	AJKD 2000	527	progression	Non

Tableau 2: Illustration de l'influence de la taille de l'échantillon de population étudiée sur les conclusions au sein d'études d'association concernant le polymorphisme insertion/délétion du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et son influence potentielle sur l'évolutivité de la néphropathie à IgA. Les études ayant les effectifs les plus importants ne retrouvent pas d'effet tandis que les petites études rapportent une association. Ceci illustre le biais de publication.

La cohorte de répliation

La répliation des études est indispensable. Cependant, compte tenu des différences de fréquence alléliques/haplotypiques pouvant exister entre populations différentes, l'association n'est pas nécessairement retrouvées, sans pour autant exclure l'implication du gène.

Ajustement pour les comparaisons multiples

Malgré tous ces obstacles potentiels, les études d'association offrent la meilleure perspective de cartographie des loci de maladies complexes. Le type le plus direct et le plus efficace dans les études d'association consiste à utiliser un échantillon témoin dans une population contenant des personnes touchées. Trois problèmes majeurs se posent pour établir la

signification statistique, car il faut effectuer des comparaisons multiples, vérifier l'indépendance entre les tests effectués et tenir compte du fait que la puissance d'un test est fonction des fréquences du marqueur. La correction habituelle de Bonferroni dans le cas de comparaison multiple consiste à diviser le seuil nominal de signification par le nombre de comparaison effectuée pour obtenir un taux de faux-positifs acceptable dans le cadre de l'expérience effectuée.

III-3/ Approche gènes-candidats versus approche genome-wide

III-3-1/ Approche gènes-candidats

Les approches gènes-candidats consistent à sélectionner un ensemble de gènes dont les fonctions pourraient intervenir dans l'étiologie de la maladie étudiée, et à les tester directement par association. Le choix des gènes peut être guidé par des *a priori* biologiques tels que la fonction ou l'appartenance à une voie métabolique associée à une maladie, ou encore sur la base de la localisation dans une région chromosomique d'intérêt, suggérée par une précédente étude de liaison ou d'association. Même lorsque les connaissances *a priori* sont larges et que la physiopathologie de la maladie est relativement bien comprise, l'approche gènes-candidats n'identifiera qu'une fraction des déterminants génétiques. Dans le cas contraire, elle est alors inadaptée pour appréhender de façon exhaustive les causes génétiques des maladies.

III-3-2/ Approche genome-wide

Une étude d'association genome-wide (ou systématique) investit une grande partie du génome sans aucun *a priori* sur l'identité des locus impliqués. Cette approche représente une stratégie

impartiale, non dirigée et assez complète pouvant être mise en place en l'absence d'indices sur la fonction ou la position des locus de susceptibilité. Elle a d'abord été utilisée pour des études de liaison utilisant des microsatellites et a permis de mettre en évidence la plupart des gènes responsables des maladies monogéniques connues. Malheureusement, cette approche a eu des difficultés à s'étendre aux maladies multifactorielles, l'excès de transmission chez des apparentés atteints étant plus faible pour des effets modérés.

Du choix de l'approche va donc dépendre la sélection des marqueurs.

Mettre en évidence des facteurs influençant la réponse immunitaire innée et particulièrement la réponse inflammatoire pourrait permettre d'améliorer la prise en charge des patients. L'importance de facteurs génétiques pouvant influencer la survenue de pathologies en association avec des facteurs environnementaux est actuellement bien établie. Le polymorphisme génétique est un bon exemple de ce type de facteurs car, au même titre que les facteurs environnementaux, il est une cause importante de variabilité interindividuelle affectant le niveau d'expression d'un gène. Il s'agit d'une variation dans la séquence génomique qui peut être silencieuse, ou qui affecte l'expression d'un gène provoquant la synthèse d'une protéine dont la séquence en acides aminés est différente (mutation dans la région codante du gène), ou encore modifie la dynamique d'expression du gène en agissant sur la régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Le polymorphisme génétique a un impact sur la survenue d'un grand nombre de pathologies humaines. De plus, il influence la nature de la réponse innée, inflammatoire, et joue un rôle en transplantation d'organes et de tissus. Une bonne connaissance des polymorphismes influençant le devenir des patients pourrait permettre de stratifier les patients selon leur risque de présenter une pathologie et ainsi moduler les stratégies thérapeutiques en vue d'améliorer à l'échelle individuelle la prise en charge des patients transplantés et par là la survie globale des patients.

1^{er} gène candidat :
INTERLEUKINE-6 (IL-6)

I/ Description du gène de l'IL-6

Le gène humain de l'IL-6 est situé sur le chromosome 7 (7p21). Le promoteur du gène de l'IL-6 se comporte comme un senseur biologique sophistiqué qui répond au stress environnemental et à l'homéostasie immunologique. Il est induit par de nombreux composés chimiques ou physiologiques incluant les endotoxines bactériennes, les virus ou encore les cytokines inflammatoires (**Zhang Y et al. 1994, Dendorfer U et al. 1994, Yee CS et al. 1991, Shimizu et al. 1990**). L'analyse des séquences du promoteur, régulant l'expression du gène de l'IL-6, a permis de mettre en évidence la présence et l'implication fonctionnelle d'un élément liant le facteur de transcription NF- κ B, un élément de réponse à l'AMPc et un site liant le facteur de transcription AP-1 (**Vanden Berghe W et al. 1999**). Par ailleurs, l'expression d'IL-6 est finement régulée pour éviter que la protéine ne soit produite en quantité excessive durant un « stress » et pour empêcher sa synthèse dans des circonstances qui ne l'exigent pas. Le récepteur des glucocorticoïdes a en revanche un effet répresseur sur le gène de l'IL-6 (**Stein B et al. 1995**). Cette configuration promoteur / répresseur suggère donc un rôle de l'IL-6 dans les pathologies inflammatoires.

L'IL-6 est produite par de nombreux types cellulaires différents dont les monocytes activés, les macrophages, les LcT et B, les fibroblastes et les cellules endothéliales. La production d'IL-6 n'est pas spontanée, mais induite par des stimuli inflammatoires tels que le lipopolysaccharide (LPS, ligand du TLR4), l'IL-1 β , le TNF- α et l'IFN- γ . La seule exception est la production basale d'IL-6 par les adipocytes qui concourt à la détection chez le sujet sain de faibles concentrations d'IL-6 à l'aide des dosages ultrasensibles (**Fantuzzi G 2005**).

Le récepteur de l'IL-6 (CD126) est exprimé de façon constitutive sur les monocytes et les macrophages (**Mackiewicz A. 1992**). CD126 est exprimé par certaines sous-populations de Lc. L'acquisition du CD126 après activation s'observe pour certains Lc, notamment les LcB.

Le complexe formé entre l'IL-6 et son récepteur s'associe à une glycoprotéine transmembranaire, gp130, qui est impliquée dans la transduction des signaux. La fixation de l'IL-6 à son récepteur conduit à l'homodimérisation liée aux disulfides de gp130, à l'activation associée de la tyrosine kinase et à la cascade JAK (Janus kinases)/STAT1/3 (Signal transducer and activator of transcription) (**Figure 19**). Le récepteur de l'IL-6 peut être sécrété/clivé en une forme soluble (**Rose-John S et al. 2006**). Cette forme soluble est présente dans le sérum humain normal. Complexée avec l'IL-6, la forme soluble de CD126 agit comme un agoniste de gp130. La molécule gp130 existe également sous forme soluble et agit alors comme un antagoniste de la bio-activité de l'IL-6.

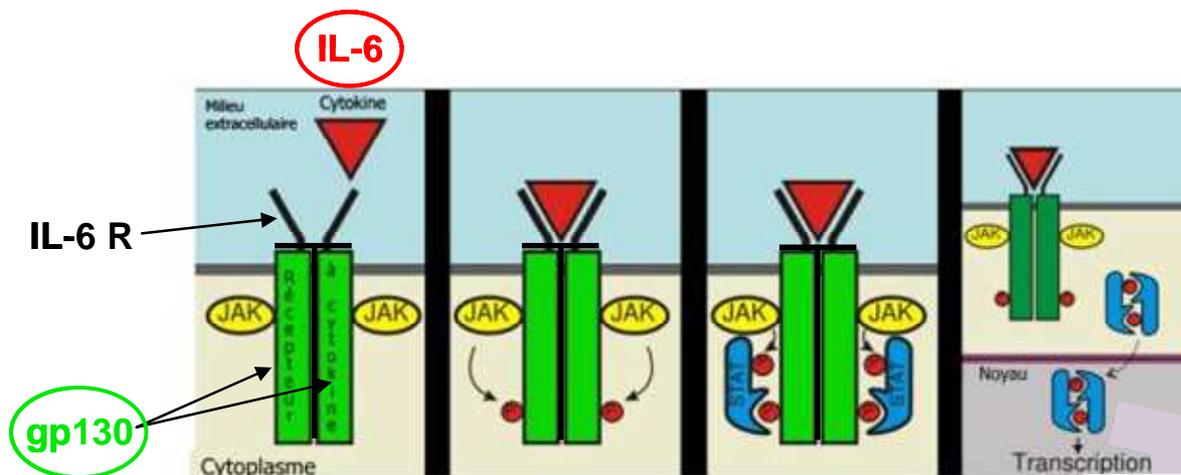


Figure 19: Interactions entre l'IL-6 et son récepteur. Le complexe formé entre l'IL-6 et son récepteur s'associe à une glycoprotéine transmembranaire, gp130, qui est impliquée dans la transduction des signaux. La fixation de l'IL-6 à son récepteur conduit à l'homodimérisation liée aux disulfides de gp130, à l'activation associée de la tyrosine kinase et à la cascade JAK (Janus kinases)/STAT1/3 (Signal transducer and activator of transcription).

L'IL-6 est une cytokine pleiotrope influençant les réactions inflammatoires. C'est un des médiateurs physiologiques majeurs des réactions de la phase aiguë de l'inflammation. L'IL-6 est connue pour stimuler la production de protéines de la phase aiguë dans les hépatocytes, comme la PCR ou la protéine amyloïde A sérique (**Gauldie J et al. 1987**). L'IL-6 est une

cytokine pro-inflammatoire clé qui régule la production de molécules d'adhésion et de facteurs chémo-attractifs, représentant ainsi un important médiateur dans la synthèse d'autres cytokines, telles que le TNF- α et l'IL-1 β en cause dans l'amplification de la réponse inflammatoire (**Heinrich PC et al. 1990**).

II/ Polymorphisme du promoteur du gène de l'IL-6 en position -174 G/C

II-1/ Etat de la littérature

Le polymorphisme étudié dans nos travaux est situé au niveau du promoteur du gène de l'*IL-6* où la guanine en position -174 est remplacée par une cytosine [-174G/C]. Cette substitution est associée à un taux réduit de transcription du gène de l'*IL-6*. Les patients porteurs du génotype GG, homozygotes sauvages, sont donc considérés comme des « forts sécréteurs » d'*IL-6*, les patients GC, hétérozygotes, comme des « sécréteurs modérés » d'*IL-6* et les patients CC, double mutés ou homozygotes pour l'allèle mineur, comme de « faibles sécréteurs » d'*IL-6* (**Fishman D et al. 1998**).

Cependant, la validation fonctionnelle de ce polymorphisme a fait l'objet de résultats discordants au sein de la littérature. Brull et al ont montré qu'après une intervention telle qu'un pontage aorto-coronarien, il existe une élévation des mesures sériques d'*IL-6* plus importante chez les patients CC (**Brull DJ et al. 2001**). Fishman et al. ont observé des résultats contraires avec des valeurs d'*IL-6* sériques plus élevées chez les patients GG au sein d'une population saine (**Fishman D et al. 1998**). Qi et al. n'ont quant à eux objectivé aucune association significative entre les différents génotypes et les taux sériques d'*IL-6* au sein, à la fois, d'une cohorte de patients diabétiques de type 2 et d'une cohorte de sujets sains (**Qi L et**

al. 2006). Enfin, Bennermo et al ont démontré, *in vivo*, la fonctionnalité de ce polymorphisme après réalisation d'une vaccination par *Salmonelle Typhii*, au sein d'une population saine. Les auteurs ont observé une réponse inflammatoire exacerbée chez les patients GG, comme en témoigne une sécrétion d'IL-6 plasmatique plus élevée (Bennermo M et al. 2004) (Figure 20).

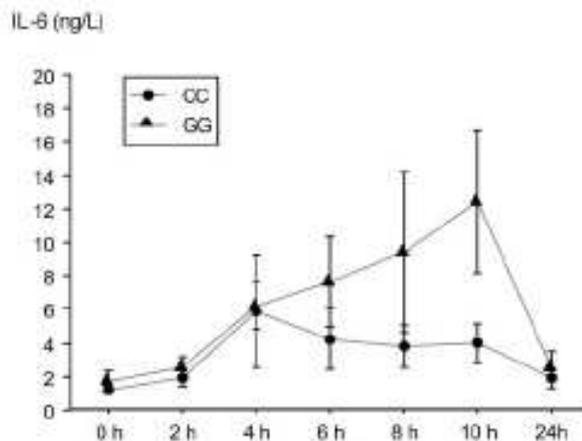


Figure 20: Validation fonctionnelle *in vivo* du polymorphisme du promoteur du gène de l'IL-6 en position -174 G/C. Concentrations plasmatiques d'IL-6 des patients (GG versus CC), selon le génotype, avant vaccination et jusqu'à 24 heures après vaccination par *Salmonelle Typhii*, au sein d'une population saine.

Les explications possibles que l'on peut avancer pour expliquer ces résultats discordants sont les suivantes :

- Les études ayant tenté de valider la fonctionnalité de ce polymorphisme sont très hétérogènes en terme de méthodes de validation (*in vitro* pour la plupart versus *in vivo*) et de populations (population saine et population avec maladies inflammatoires chroniques).
- La physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques implique différents médiateurs de l'immunité, au sein d'un système hautement redondant. Il est donc important de considérer cette validation au sein d'une balance pro- et anti-inflammatoire et notamment des

interactions probables avec d'autres polymorphismes de molécules pro- et anti-inflammatoires tels que ceux de la PCR, du fibrinogène et de l'IL-10 par exemple.

- Il faut noter par ailleurs que depuis 1998, date de découverte de ce polymorphisme, d'autres sites de polymorphisme ont été découverts au niveau du promoteur du gène de l'*IL-6* (-572 G/C et -597 G/A) pouvant probablement influencer la transcription et la fonctionnalité de celui-ci.

II-2/ Etat de la littérature en transplantation rénale (population caucasienne)

Ci-dessous sont résumées les différentes études (n=20) réalisées dans le domaine de la transplantation rénale (**Tableau 3**).

Cette revue de la littérature met en évidence le manque quasi-constant de cohorte de validation ainsi que l'absence fréquente de validation fonctionnelle, conditions nécessaires à l'interprétation des études de polymorphismes.

Tableau 3: Tableau résumant les différentes publications sur polymorphisme du gène de l'*IL-6* et de son promoteur en transplantation rénale. DCG : Dysfonction Chronique du Greffon. DGF : Delayed graft function.

VF :validation fonctionnelle

Evénement(s) étudié(s)	Polymorphisme(s) étudié(s)	cohorte(s) (n)	V F	conclusions	Références
Rejet aigu	-174 G/C	1 cohorte (n=169)	-	Pas d'influence	Poli et al. 2001
Rejet aigu	-174 G/C	1 cohorte (n=43)	-	Allèle G: incidence plus élevée de rejets aigus (NS)	Reviron et al. 2001
Rejet aigu	-174 G/C	1 cohorte (n=35)	-	GG: incidence plus élevée de rejets aigus (NS)	Neumann et al. 2001
Rejet aigu	-174 G/C	1 cohorte (n=49)	X	Pas d'influence	Cartwright et al. 2001
Rejet aigu	-174 G/C	1 cohorte (n=120)	-	Pas d'influence	Hahn et al. 2001
Rejet aigu Survie du greffon à 3 ans	-174 G/C	1 cohorte (n=158)	-	Pas d'influence sur le rejet aigu GG: meilleure survie à 3 ans versus allèle C	Muller-Steinhardt et al. 2002
Survie du greffon à 3 ans	-174 G/C -572 G/C -597 G/A	1 cohorte (n=158)	-	GGG /GGG: meilleure survie à 3 ans	Muller-Steinhardt et al. 2004
Sarcome de Kaposi (SK)	-174 G/C	15 SK versus 40 non-SK	-	GG: incidence plus élevée de SK	Gazouli et al. 2004
HTA Dyslipidémie Diabète type 2 / NODAT Hyperuricémie	-174 G/C	1 cohorte (n=278)	-	Pas d'influence	Babel et al. 2004
DCG	-174 G/C	64 DCG- versus 62 DCG+	-	CC: plus nombreux dans le groupe DCG+	Pawlik et al. 2005
Rejet aigu DGF	-174 G/C	Cohorte D/R (n=191)	-	Pas d'influence	Alakulppi et al. 2004
Rejet aigu DGF Perte de greffon	-174 G/C	Cohorte D/R (n=91)	-	Pas d'influence	Loucaidou et al. 2005
Rejet aigu Survie du greffon à 3 ans	-174 G/C	1 cohorte (n=63)	-	Pas d'influence	Gendzekhadze et al. 2006
Infection(s) lors de la première année	-174 G/C -565 A/G	1 cohorte (n=255)	-	Pas d'influence	Rodrigo et al. 2007
DCG	-174 G/C	1 cohorte (n=66)	-	Pas d'influence	Nikolova et al. 2008
Rejet aigu	-174 G/C	1 cohorte (n=100)	-	Pas d'influence	Manchanda et al. 2008.
Survie du greffon	-174 G/C	1 cohorte (n=197)	-	GG: meilleure survie du greffon versus allèle C	Pawlik et al. 2008
Evénements athéromateux Rejet aigu DGF Survie greffon	-174 G/C 1888 G/T Asp162Val Pro32Ser	1 cohorte (n=352)	-	Pas d'influence	Kruger et al. 2009
Fonction rénale à 1an	-174 G/C	1 cohorte (n=125)	X	Pas d'influence	Krajewska et al. 2009
Evénements athéromateux (EA)	-174 G/C	2 cohortes (n=478/n=320)	-	Allèle G: incidence élevée d'EA dans 1 seule cohorte	La Manna et al. 2010

Article n°1

IL-6 promoter polymorphism -174 is associated with new-onset diabetes after transplantation

JASN 2006

Comme décrit précédemment, l'inflammation joue un rôle dans la pathogénie du diabète de type 2 (**Pickup JC et al. 1998**). Nous avons également décrit le rôle probable de l'IL-6 dans la physiopathogénie de l'insulino-résistance et ses complications, notamment chez le patient obèse. Certaines études suggèrent que le polymorphisme -174 G/C du promoteur du gène de l'*IL-6*, qui est associé à un taux réduit de transcription, prévient le risque de diabète de type 2 dans la population générale (**Kubaszek A et al. 2003, Herbert A et al. 2005, Vozarova B et al. 2003**).

Néanmoins, la relation entre inflammation et survenue d'un NODAT n'a été étudiée que par Babel et al. Ces auteurs n'ont observé aucune corrélation entre ce polymorphisme et le diabète chez des patients transplantés rénaux (**Babel N et al. 2004**). A noter que leurs travaux n'excluent pas les patients diabétiques de type 2 au moment de la transplantation rénale. Nous présentons ici nos travaux sur l'influence du polymorphisme -174 G/C du promoteur du gène de l'*IL-6* sur la survenue d'un diabète *de novo* après transplantation.

IL-6 Promoter Polymorphism -174 Is Associated with New-Onset Diabetes after Transplantation

Jamal Bamoulid,^{*†} Cécile Courivaud,^{*†} Marina Deschamps,^{*‡} Patricia Mercier,^{*‡} Christophe Ferrand,^{*‡} Alfred Penfornis,[§] Pierre Tiberghien,^{*‡||} Jean-Marc Chalopin,^{*||} Philippe Saas,^{*‡} and Didier Ducloux^{*||}

^{*}INSERM, U645, University Besançon, and IFR133, [†]CHU Saint Jacques, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, [‡]EFS Bourgogne Franche-Comté, Plateforme de Biomonitoring, [§]CHU Jean Minjot, Department of Endocrinology, and ^{||}CHU Saint Jacques, CIC Biothérapie, Besançon, France

New-onset diabetes after transplantation (NODAT) is a serious complication of transplantation. This study tested whether IL-6 production capacity may influence the development of NODAT in two different groups of patients. The occurrence of NODAT was analyzed with respect to *IL-6* gene promoter polymorphism at position -174 (G→C) and other relevant risk factors retrospectively in 217 renal transplant recipients and prospectively in 132. A linear increase in both circulating IL-6 ($P = 0.09$) and C-reactive protein (an indicator of basal IL-6 secretion; $P = 0.03$) concentrations from the CC genotype to the GG genotype was observed. In the multivariate model, the CC genotype was associated with a decreased risk for NODAT compared with the GG genotype in the two cohorts. Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance also revealed lesser insulin sensitivity in the GG carriers than in the CC carriers (2.15 ± 2 versus 1.32 ± 1.03 ; $P = 0.03$). Subgroup analysis showed that the influence of *IL-6* gene promoter polymorphism on the development of NODAT was restricted mostly to overweight patients. These results highly suggest that IL-6 production capacity influences the development of NODAT and that diabetes-inducing drug administration should be limited in overweight patients who carry the GG genotype.

J Am Soc Nephrol 17: 2333–2340, 2006. doi: 10.1681/ASN.2006010066

New-onset diabetes after transplantation (NODAT) is a known serious long-term complication of transplantation. A number of risk factors for development of NODAT have been established (1); age, body mass index (BMI), ethnicity, hepatitis C infection, and immunosuppressive therapy are among the most important (1). Chronic inflammation now is supposed to play a pivotal role in the pathogenesis of type 2 diabetes (2). Indeed, the results of both cross-sectional and prospective studies suggest a contributory role for low-grade activation of the immune system in the development of type 2 diabetes, and both C-reactive protein (CRP) and IL-6 levels have been identified as risk factors for the future development of type 2 diabetes (3–6). Moreover, despite some controversial data (7,8), the *IL-6* gene promoter polymorphism at position -174 (G→C), which is associated with different transcription rates, seems to predict type 2 diabetes (9). Nevertheless, whether chronic inflammation may promote NODAT is unknown. Babel *et al.* (10) previously reported no association between diabetes and the *IL-6* gene promoter polymorphism at position -174 (G→C) in long-term renal transplant recipients

(RTR). Nevertheless, the relevance of this study is seriously hampered by selection bias, lack of definition of diabetes, and confusion between type 2 diabetes and NODAT.

In this study, we tested whether the *IL-6* gene promoter polymorphism at position -174 may influence the later development of NODAT in two separate cohorts of RTR. This hypothesis first was generated by the exploratory analysis of a retrospective cohort and then validated in a second, prospectively established, verification cohort.

Materials and Methods

Study Design and Populations

We analyzed two groups of patients to assess whether the *IL-6* gene promoter polymorphism at position -174 (G→C) may be a risk factor for the later development of NODAT independent of the effects of age, obesity, and maintenance immunosuppressive regimens. First, we conducted a nested genetic study in a retrospective cohort of patients who were participants in a previously reported study that assessed the association between lymphopenia and atherosclerotic outcomes after renal transplantation (11). A total of 302 consecutive RTR had been enrolled consecutively in this trial. We included participants in this study when their pretransplantation baseline examination showed no previous diagnosis of diabetes and recorded a fasting plasma glucose (FPG) of <6.1 mmol/L. DNA was available from 224 (74%) of the 302 patients. These patients received a transplant between January 1990 and June 2001. Reasons for DNA unavailability were death (12%) and loss to follow-up, primarily as a result of return to dialysis (14%). Seven patients had pretransplantation diabetes and were excluded. The remaining 217 individuals did not differ significantly from the 85 patients who were not evaluated in any relevant baseline parameter (age, gen-

Received January 29, 2006. Accepted May 29, 2006.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

J.B. and C.C. contributed equally to this work.

Address correspondence to: Dr. Didier Ducloux, CHU St. Jacques, 2 Place Saint Jacques, Besançon 25000, France. Phone: +33-38-121-8782; Fax: +33-38-121-8781; E-mail: dducloux@chu-besancon.fr

Copyright © 2006 by the American Society of Nephrology

ISSN: 1046-6673/1708-2333

der, pretransplantation BMI [weight (kg)/height² (m²)], and primary renal disease), but they were marginally less prone to atherosclerotic events, graft loss, and death after transplantation (data not shown).

Second, we studied a prospective cohort of 144 consecutive patients who received a transplant between July 2001 and December 2004 in our center. All of these patients received tacrolimus-based immunosuppression. Twelve patients had pretransplantation diabetes and were excluded.

Age, gender, BMI, history of cardiovascular disease, hypertension, previous renal transplantation, cytomegalovirus donor/recipient status, hepatitis C virus (HCV) status, HLA compatibility, and panel-reactive antibodies were analyzed as covariates. Dialysis mode (none, hemodialysis, or peritoneal dialysis) and its duration before transplantation were recorded. All parameters were collected at the transplant time. Immunosuppressive regimens were assessed. The cumulative dose of steroids in the first year after transplantation, the use of calcineurin inhibitors, and the use of tacrolimus *versus* cyclosporin A were considered as a potential covariate.

Approval was obtained from the Besançon ethical committee for these studies. Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki.

NODAT

NODAT was defined according to the 2003 International Consensus Guidelines on Diabetes Mellitus in Transplantation (1), and its definition was applied to our database that existed from 1996. This definition is based on the currently accepted criteria proposed by the Canadian Diabetes Association. In summary, diabetes is defined by a casual glucose value of 11.1 mmol/L, or an FPG value of ≥ 7 mmol/L, or a plasma glucose value of ≥ 11.1 mmol/L 2 h after a 75-g glucose load. In our cohort, all of the patients with NODAT were identified using FPG. Patients with FPG ≥ 7 mmol/L or antidiabetic treatment (oral antidiabetic drugs or insulin) were considered to have NODAT.

DNA Extraction and Analysis of the IL-6 Gene Promoter Polymorphism at Position -174 (G→C)

Genomic DNA (gDNA) was extracted from white blood cells using standard salting out procedure (12). Analysis of the IL-6 gene promoter locus then was studied using a PCR-based genotyping assay (13). Briefly, in this assay, primers were designed to amplify a fragment that contained an additional enzyme recognition site in the mutant C allele, allowing the discrimination of mutant and wild-type alleles by 2% standard agarose gel electrophoresis. Primer sequences were the following (sense primer is indicated first): 5'-TTGTCAAGACATGCCAAAGTG-3' and 5'-TCAGACATCTCCAGTCTATA-3' (13). After PCR amplification of the polymorphic regions of interest, PCR products were digested overnight with Nla III enzyme (New England Biolabs, Beverly, MA), according to the supplier's recommendations. For each PCR, negative (PCR amplification without gDNA) and positive (plasmid DNA carrying mutated allele) controls were included. Sequencing of undigested PCR products confirmed restriction fragment length polymorphism-PCR electrophoresis profiles for representative samples. Researchers and laboratory personnel had no access to identifiable information and could identify samples by number only.

Functional Validation of the IL-6 Gene Promoter Polymorphism

The functional effects of IL-6 gene promoter polymorphism were analyzed by measuring serum levels of IL-6 6 mo after transplantation. IL-6 was measured with high-sensitivity ELISA kits (Quantikine HS IL-6 Immunoassay, #HS600B; R&D Systems, Lille, France) according to

the manufacturer's instructions. Briefly, the profile of IL-6 secretion was determined according to the genotype of the promoter. Three different possible genotypes at the -174 position of the IL-6 gene promoter then could be defined and associated with a high (G/G), medium (G/C), or low (CC) secretion profile (14). CRP (high-sensitivity determination) serum levels were measured by nephelometry (Beckman Coulter, Villepinte, France), because IL-6 is known as the main inducer for hepatic CRP synthesis (15).

Insulin Resistance and Secretion Status of Patients

Insulin resistance and secretion were evaluated in 45 RTR who did not have diabetes and had normal FPG and different genotypes (GG; $n = 15$, GC; $n = 15$, and CC; $n = 15$) for IL-6 gene promoter polymorphism by appropriate Homeostasis Model Assessment (HOMA) index. Serum fasting insulin (normal range 6 to 20 μ U/ml) was measured with an enzyme immunoassay (AIA-PACK IRI; Tosoh Corp., Minato-Ku, Japan). The HOMA for insulin resistance (HOMA-IR), used as a marker of insulin resistance, was calculated as described previously (16): [fasting insulin (μ U/ml) \times fasting glucose (mmol/L)/22.5]. The HOMA for insulin secretion (HOMA- β) was calculated as described previously (16) to study the possible role of β cell dysfunction: [$20 \times$ fasting insulin (μ U/ml)/fasting glucose (mmol/L) - 3.5].

Statistical Analyses

Arithmetic means were calculated and expressed \pm SD. Circulating IL-6 concentrations were not normally distributed, and their values in the three different genotypes were compared using the Kruskal-Wallis test. Differences in circulating IL-6 values between CC and G carriers were evaluated by the Mann-Whitney test. For normally distributed variables, G carriers and CC carriers were compared using the χ^2 test for dichotomous variables and the t test for continuous variables. Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for the genotype distribution. A one-way ANOVA was performed to exclude potential differences among the three genotype groups. Relationships between numerical variables were evaluated with the Spearman/Pearson rank test. Using log-rank tests on Kaplan-Meier nonparametric estimates of the survival without NODAT distribution, we selected variables with a $P \leq 0.20$. The selected variables were included into a Cox proportional hazard model, and a backward stepwise selection process was performed, this time at a classical $\alpha = 0.05$. Patient baseline characteristics were assessed on the transplant day. Age was split into two classes separated by its median (45 yr); BMI was separated into two classes (< 25 or ≥ 25 kg/m²). Results are expressed as hazard ratio (HR) and 95% confidence interval (CI), with a P value testing the null hypothesis: HR = 1. Therefore at $P < 0.05$, HR is significantly different from 1. Assumptions of Cox models (log linearity and proportionality of risk in time) were met in this analysis. Analysis was performed on Statview 5 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Results

Study Population

Retrospective Cohort. The cohort of 217 patients was followed for a mean duration of 98 ± 21 mo after transplantation. Mean follow-up was similar in patients with the different genotypes. There were no differences in transplant timing between the different genotypes (data not shown). Mean age was 43 ± 13 yr, and 139 RTR (64%) were men. Hypertension was present in 156 (72%) RTR. Mean dialysis duration was 20 ± 17 mo. Three patients were HCV positive. All patients but five were white.

Prospective Cohort. A total of 132 patients were studied with a mean follow-up of 33 ± 11 mo. Five patients died during follow-up, and four lost their graft. There were no differences in transplant timing between the different genotypes (data not shown). Mean age was 47 ± 14 yr, and 86 (65%) RTR were men. Hypertension was present in 99 (75%) RTR. Mean dialysis duration was 19 ± 13 mo. Two patients were HCV positive. All patients but four were white.

Analysis of the IL-6 Gene Promoter Polymorphism

Reverse transcription-PCR reactions were performed, and a PCR product of 300 bp was obtained. Digestion with NlaIII enzyme and agarose gel electrophoresis allowed identification of two bands (a 233- and a 54-bp band) for the wild-type G allele and three bands (with 122, 111, and 54 bp length, respectively) for the C allele (Figure 1A). This contrasts with data reported by Depboylu *et al.* (13), who used the same primers and the same restriction enzyme. To confirm our results, we first sequenced undigested PCR products from wild-type, heterozygote, and homozygote RTR. Sequence analysis confirmed restriction fragment length polymorphism-PCR analysis (Figure 1B). Then, we analyzed the sequence of the IL-6 gene promoter using online software provided by New England Biolabs (www.neb.com). Again, we confirmed our results and found, in addition to position -174, two other NlaIII restriction sites in the PCR product. The first one, located within the sense primer, generated a 13-bp product that was not discriminated by electrophoresis. The second one, at position -63, generated

a 54-bp product (Figure 1A) in all 361 RTR, excluding the presence of a polymorphism at this position.

IL-6 Gene Promoter -174 Genotype Frequencies in RTR

Retrospective Study. Ninety-five (43.8%) patients were GG homozygotes (wild type), 92 (42.4%) were GC heterozygotes, and 30 (13.8%) were CC homozygotes (mutant; Table 1). There were no differences in pretransplantation characteristics, acute graft rejection episodes, and cumulative steroid dose in the first year after transplant between patients with the different genotypes (Table 2). The observed allele frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Prospective Study. Genotype frequencies were similar in the prospective cohort (GG 42.7%; GC 45.9%; CC 11.4%; Table 1). Nevertheless, in this cohort, CC patients were older than patients with the G allele (53 ± 13 versus 46 ± 14 ; $P = 0.04$; Table 2). Gender ratio also was different, with more women being CC carriers than G allele carriers (60 versus 33%; $P = 0.03$; Table 2). The observed allele frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Relation between the IL-6 Promoter -174 Genotype and Both Serum IL-6 and CRP Levels

Serum IL-6 concentrations were measured in 36 RTR (CC genotype 12; GC genotype 12; and GG genotype 12). Serum samples were selected as follows: Frozen serum samples from 12 patients with the CC genotype and absence of acute rejection or infection at 6 mo after transplant were available in our serum library. We selected an equal number of patients with the GC and GG genotypes after matching for age and BMI. None of these patients experienced either acute rejection or infection at the date of serum collection. Circulating IL-6 concentrations were closely related to BMI ($r = 0.55$, $P = 0.0005$). There was a trend toward a linear increase in serum IL-6 concentrations from the CC genotype to the GG genotype (median values and ranges were, respectively, 2.77 [sq]1.02 to 9.26], 3.48 [1.11 to 76.85], and 4.19 pg/ml [2.02 to 100] in CC, GC, and GG carriers; $P = 0.09$; Figure 2A). When analysis was restricted to patients who were overweight, serum IL-6 concentration was found to be significantly lower in CC patients than in G carriers (4.2 [1.02 to 5.1] versus 7.3 pg/ml [4.4 to 100]; $P = 0.025$). By contrast, in patients who were not overweight, IL-6 levels were similar in CC and G carriers (2.2 [1.4 to 9.3] versus 2.7 pg/ml [1.1 to 17.8]; $P = 0.27$).

CRP levels were assessed in the 217 patients of the retrospec-

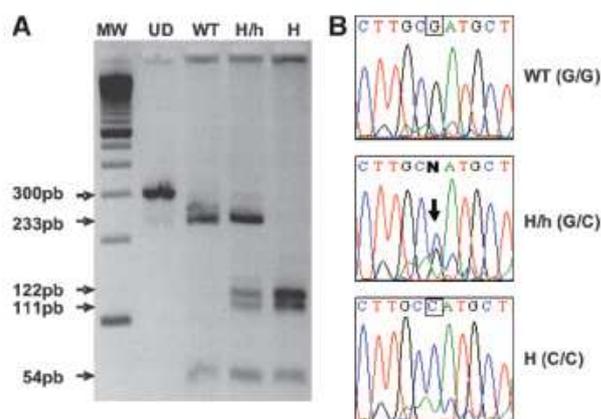


Figure 1. Analysis of the IL-6 gene promoter polymorphism -174 (G/C) in four representative samples: Undigested (UD), wild-type (WT), heterozygote (H/h), and homozygote mute (H). (A) Agarose gel electrophoresis of restriction fragment length polymorphism-PCR (RFLP-PCR) after NlaIII overnight restriction digest. MW represents the molecular weight marker. (B) Sequencing analysis of undigested PCR products, confirming RFLP-PCR analysis. N in the sequence determined by the sequence analysis software (Applied Biosystems, Foster City, CA), and arrows in H/h samples depict overlay of two different allele-specific nucleotides.

Table 1. Genotype frequencies of the IL-6 gene promoter -174 (G/C) polymorphism in the two cohorts

Genotype	Retrospective Cohort (n [%])	Prospective Cohort (n [%])
GG	95 (43.8)	55 (42.7)
GC	92 (42.4)	62 (45.9)
CC	30 (13.8)	15 (11.4)
Total	217 (100)	132 (100)

Table 2. Characteristics of patients with the different *IL-6* gene promoter -174 genotypes^a

	Retrospective Cohort			Prospective Cohort		
	GG (n = 95)	GC (n = 92)	CC (n = 30)	GG (n = 55)	GC (n = 62)	CC (n = 15)
Age	45 ± 12	44 ± 13	45 ± 11	47 ± 14	45 ± 12	53 ± 13 ^b
Gender ratio (% male)	64	65	63	72	65	40 ^c
Pretransplantation BMI (kg/m ²)	23.7 ± 4.1	23.3 ± 4.4	23.5 ± 4.7	23.9 ± 4.4	23.8 ± 4.5	24.2 ± 4.5
History of cardiovascular disease (%)	4.0	3.9	3.8	10.0	11.1	13.3
ADPKD (%)	14	15	15	13	13	20
Tacrolimus (%)	12	15	14	100	100	100
Acute rejection (%)	22	20	20	18	15	16
Cumulative dose of steroids (mg) in the first year after transplantation	1815 ± 876	1902 ± 921	1867 ± 888	1702 ± 783	1604 ± 871	1667 ± 691
Nonwhite (%)	2.1	2.2	3.3	3.6	1.6	6.6
HCV+ (%)	2.1	0	3.3	0	1.6	6.6

^aADPKD, autosomal dominant polycystic kidney disease; HCV, hepatitis C virus.

^b*P* = 0.04 (CC versus G).

^c*P* = 0.03 (CC versus G).

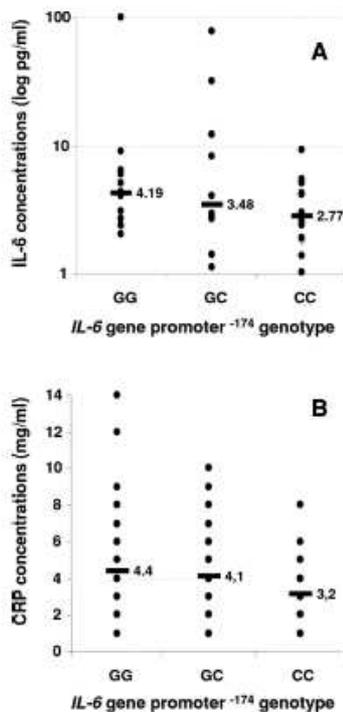


Figure 2. Functional validation of the *IL-6* gene promoter polymorphism -174 (G/C) in renal transplant recipients. (A) Circulating *IL-6* concentrations were determined by ELISA in the sera of 36 renal transplant recipients (RTR; 12 with the CC genotype, 12 with the GC genotype, and 14 with the GG genotype). Results are given in pg/ml on a logarithm scale. Solid black bars represent median values. (B) C-reactive protein concentrations were determined as described in Materials and Methods in the sera of 217 RTR (30 with the CC genotype, 92 with the GC genotype, and 95 with the GG genotype). Results are given in mg/ml. Solid black bars represent mean values.

retrospective cohort. Posttransplantation CRP concentrations increased gradually from the CC genotype to the GG genotype (mean values and SD: 3.2 ± 1.6 , 4.1 ± 2.2 , and 4.4 ± 2.1 mg/L in 30 CC, 92 GC, and 95 GG patients, respectively; *P* = 0.03). Similar results were observed in the prospective cohort (3.0 ± 1.5 , 4.2 ± 2.3 , and 4.7 ± 2.4 mg/L in CC, GC, and GG patients, respectively; *P* = 0.02; Figure 2B).

Relation between the *IL-6* Promoter Polymorphism -174 and NODAT

Retrospective Cohort. Thirty-three (15.2%) patients experienced NODAT. The distribution of *IL-6* genotypes was significantly different between patients with and without diabetes. The CC genotype was less common in patients with (3%) than without (16.4%) diabetes (*P* = 0.025). The incidence of NODAT was significantly higher in patients with the GG genotype than in patients with the CC genotype (19 versus 3%; *P* = 0.02). We observed a linear increase in the incidence of NODAT from the CC genotype to the GG genotype (3, 14, and 19% in CC, GC, and GG carriers, respectively; *P* = 0.001).

CC carriers developed NODAT less frequently than G carriers (3 versus 17.1%; *P* = 0.032). In the subgroup analysis, we observed that in overweight patients (*n* = 58), CC carriers had a reduced risk for NODAT compared with G carriers (0 versus 47%; *P* = 0.015), whereas an effect of the C allele could not be demonstrated in other than overweight patients (4.3 versus 5.9%; *P* = 0.31).

In the multivariate analysis, age, BMI, autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), cumulative steroid dose, and CC genotype (mutant type) were associated with NODAT. In the multivariate model (Table 3), age (HR 4.54; 95% CI 1.53 to 13.45; *P* = 0.006) and BMI (HR 8.79; 95% CI 3.58 to 21.61; *P* < 0.0001) were independent risk factors for the later development of NODAT. The CC genotype also conferred a reduced risk for NODAT compared with the GG genotype (HR 0.08; 95% CI 0.01 to 0.71; *P* = 0.023; Table 3). The risk for NODAT was marginally lower in GC carriers than in GG carriers (HR 0.15; 95% CI 0.02 to 1.17; *P* = 0.074; Table 3). There was a clear interaction

Table 3. Cox model: HR of NODAT and 95% CI (retrospective cohort)^a

Variable	HR	95% CI	P
Age (yr)			
<45	1	—	—
≥45	4.54	1.53 to 13.45	0.006
BMI (kg/m ²)			
<25	1	—	—
≥25	8.79	3.58 to 21.61	<0.0001
IL-6 -174 genotype			
GG	1	—	—
GC	0.15	0.02 to 1.17	0.074
CC	0.08	0.01 to 0.71	0.023

^aBMI, body mass index; CI, confidence intervals; HR, hazard ratio; NODAT, new-onset diabetes after transplantation.

between the IL-6 genotype and BMI. Indeed, individual adjustment for this variable was shown to modify significantly the HR of the IL-6 genotype for NODAT. When the BMI variable was entered in the model, we observed an increased effect of the IL-6 genotype on the risk for NODAT. This suggests a higher influence of high IL-6 production capacity on NODAT in overweight patients. A marginally higher risk for NODAT was observed in patients with ADPKD (HR 3.37; 95% CI 0.92 to 12.27; *P* = 0.07).

Prospective Cohort. Twenty-six (19.7%) patients experienced NODAT. The incidence of NODAT was marginally higher in patients with the GG genotype than in patients with the CC genotype (28.3 versus 13.3%; *P* = 0.12).

In the monovariate analysis, as previously shown for the retrospective cohort, age, BMI, ADPKD, cumulative steroid dose, and GG (wild type) genotype were associated with NODAT. In the multivariate model (Table 4), age (HR 5.49; 95% CI 1.70 to 17.75; *P* = 0.005), BMI (HR 6.70; 95% CI 1.65 to 27.25; *P* = 0.008), and ADPKD (HR 3.89; 95% CI 1.08 to 13.08; *P* = 0.037) were independent risk factors for the later development of NODAT. The CC genotype conferred an independent lower risk for NODAT than did the GG genotype (HR 0.15; 95% CI 0.03 to 0.99; *P* = 0.049; Table 4). Most of the data that were obtained from the prospective cohort confirmed the data that were obtained from the retrospective cohort.

HOMA Indexes in Patients without Diabetes According to Their IL-6 Promoter -174 Genotype

Insulin resistance and secretion were evaluated in 45 patients in the retrospective cohort. The anthropometric characteristics of these 45 patients are shown in Table 5. Patient age, gender, and BMI were similar in the three genotype groups. FPG levels increased gradually from the CC to the GG genotype and were significantly higher in GG carriers than in CC carriers (4.8 ± 0.4 versus 5.5 ± 0.7 mmol/L; *P* = 0.02). We also observed a trend toward an increase in fasting insulin levels from the CC to the GG genotype. HOMA-IR index revealed reduced insulin sensitivity in the GG genotype carriers than in the CC genotype

Table 4. Cox model: HR of NODAT and 95% CI (prospective cohort)

Variable	HR	95% CI	P
Age (yr)			
<45	1	—	—
≥45	5.49	1.70 to 17.75	0.005
BMI (kg/m ²)			
<25	1	—	—
≥25	6.70	1.65 to 27.25	0.008
IL-6 -174 genotype			
GG	1	—	—
GC	0.36	0.05 to 2.56	0.311
CC	0.15	0.03 to 0.99	0.049
ADPKD			
No	1	—	—
Yes	3.89	1.08 to 13.08	0.037

BMI, body mass index; ADPKD, autosomal dominant polycystic kidney disease

carriers (2.15 ± 2 versus 1.32 ± 0.91; *P* = 0.03). By contrast, HOMA-β index was similar in all genotypes (Table 5). This suggests that IL-6 gene promoter genotype at position -174 is associated with insulin resistance rather than with β cell function.

Discussion

The IL-6 gene promoter polymorphism at position -174 (G→C) has been associated previously with type 2 diabetes (7) and insulin resistance (17,18). In this study, we demonstrate that such polymorphism in the IL-6 promoter region is associated with the later development of NODAT. More precise, we found the risk for NODAT to be significantly higher in homozygous (GG) wild-type patients than in homozygous (CC) mutant patients independent of age, BMI, and other confounding factors. The incidence of NODAT increased linearly from low to intermediate and high IL-6 production capacity. Moreover, insulin sensitivity as assessed by HOMA-IR index was lower in homozygous wild-type GG RTR without diabetes than in homozygous CC mutant RTR without diabetes, suggesting a role for IL-6 in insulin resistance.

It is interesting that the IL-6 G/C promoter polymorphism at position -174 has functional significance (14,19). A previous study using *in vitro* reporter gene assay reported that transcription of IL-6 gene is more strongly activated by the G allele in both unstimulated and LPS/IL-1-stimulated HeLa cells (14). The functional effect of the IL-6 gene -174G/C promoter polymorphism on IL-6 levels also was examined *in vivo* after coronary artery bypass graft surgery, a widely known inflammatory stimulus for IL-6 production (19). We also tested the functionality of the IL-6 gene promoter polymorphism at position -174 in our transplant population and showed that the G allele is associated with higher IL-6 serum levels. Whereas some studies previously reported the significance of this IL-6 gene promoter polymorphism in transplant patients, none of

them evaluated its functionality in the settings of immunosuppression (20,21). Our study is the first to confirm the influence of the *IL-6* promoter polymorphism at position –174 on the *IL-6* production capacity in patients who receive immunosuppressive drugs. This result is in accordance with recent findings indicating that only high steroid doses influence *IL-6* production in RTR (22). Our results also suggest that the impact of such *IL-6* gene promoter polymorphism on circulating *IL-6* levels is higher in overweight patients. This effect probably is because white adipose tissue, which contains adipocytes, is an important source of basal *IL-6* secretion (23). It is interesting that we also showed an interaction between the *IL-6* promoter polymorphism at position –174 and overweight in predicting NODAT. Indeed, the increased risk for NODAT in G carriers seems to be restricted to overweight patients. Finally, we also found higher posttransplantation CRP concentrations in patients with the *IL-6* promoter GG genotype. Collectively, these data are consistent with a role for genetic determinants of inflammation in the development of NODAT, especially in overweight patients.

NODAT has become a major challenge facing transplant clinicians. A number of clinical studies have shown that NODAT is associated with lower overall graft and patient survival (1,24,25).

Our group also recently demonstrated that NODAT was associated with an increased risk for atherosclerotic events (26). In this setting, a better definition of patients who are at risk for NODAT is relevant and may serve to reduce the rate of this serious complication. Nevertheless, for a genetic test to be relevant in clinical management, it obviously is critical that the test have additional predictive power over and above the currently available and easily assessable risk factors. Our study takes into account the major risk factors for NODAT and demonstrates that the *IL-6* gene promoter polymorphism at position –174 independently contributes to this serious complication. The CC genotype is associated with a reduced risk for NODAT, and its negative predictive value reaches 85%, suggesting that it may serve to characterize independently a low-risk population. By contrast, the G allele increases the risk for NODAT, but its predictive positive value remains low (20%) in the overall population. Therefore, the presence of the G allele should be

interpreted with respect to other risk factors to eventually guide preventive measures. For instance, the predictive positive value of the G allele for the development of NODAT reaches 50% in overweight patients. In such patients who carry the G allele, prevention of NODAT can be achieved by reducing diabetes-inducing drugs (*e.g.*, tacrolimus, high steroid doses).

Although several *in vitro* and *in vivo* studies have examined the effects of *IL-6* on insulin resistance, the underlying mechanism that links *IL-6* and insulin resistance still is unclear. Data from animal models indicate a complex involvement of *IL-6* in body composition and glucose metabolism (27–29). Some studies have shown that *IL-6* alters hepatic glucose metabolism (30). In addition, Senn *et al.* (31) found that *IL-6* pretreatment inhibited insulin receptor signal transduction in primary mouse hepatocytes as well as in a human hepatoma cell line. More recently, Kim *et al.* (32) reported that *IL-6* induced defects in hepatic insulin action and signaling activity both in liver and in skeletal muscles. Taken together, these findings suggest that *IL-6* interacts with insulin metabolism and contributes to insulin resistance. In our study, reduced insulin sensitivity, assessed by the HOMA-IR index in GG carriers without diabetes compared with RTR who carry the CC genotype and do not have diabetes, also suggests that *IL-6* interferes with insulin signaling.

The retrospective study might suffer from a selection bias. All of the results indicate that we included low-risk patients regarding the risks for cardiovascular disease, graft failure, and death. As a consequence, a survival bias cannot be totally excluded. A differential rate of graft and patient survival or DNA availability between patients with the C or the G allele also may have influenced our results. Nevertheless, all of these limitations should favor the null hypothesis and not contribute to a false-positive result. Moreover, NODAT is an early posttransplantation event, and a differential rate of later events should not influence our results. The incidence of NODAT was similar in untested patients, and these patients did not differ in age and BMI, the major predictive factors of NODAT, from those who were included in the study. We also observed that the prevalence and impact of the *IL-6* gene promoter polymorphism at position –174 was similar in patients with available

Table 5. Insulin resistance and secretion according to the different *IL-6* gene promoter –174 genotypes^a

Genotype Variable	GG (n = 15)	GC (n = 15)	CC (n = 15)
Age	44 ± 15	46 ± 11	45 ± 13
Gender ratio (% male)	66	66	60
Pretransplantation BMI (kg/m ²)	23.5 ± 4.3	23.7 ± 4.2	23.3 ± 4.9
Fasting plasma glucose (mmol/L)	5.5 ± 0.7	5.1 ± 0.7	4.8 ± 0.4 ^b
Insulin (μU/ml)	8.3 ± 6.2	6.2 ± 5.5	6.1 ± 3.6
HOMA-IR	2.15 ± 2 ^c	1.43 ± 1.3	1.32 ± 0.91
HOMA-β	93 ± 52	76 ± 63	82 ± 41

^aHOMA, Homeostasis Model Assessment; -IR, insulin resistance; -β, insulin secretion.

^bP = 0.02, GG versus CC carriers.

^cP = 0.03, GG versus CC carriers.

pretransplantation DNA and in those who were investigated after transplantation. Because a bias related to DNA availability is improbable, our results are likely to be applicable to the whole transplant population. By the nature of the recruitment process, clinical information that is obtained prospectively usually is of higher quality than retrospective data, and our retrospective study can be used only to generate hypotheses that have to be validated in a prospective cohort. Analysis of our prospective cohort confirmed the results that were obtained in the retrospective cohort. The *IL-6* gene promoter polymorphism at position -174 (G→C) was not significantly associated with NODAT in the monovariate analysis because of age distribution discrepancies in the different genotypes. Nevertheless, the correlation became significant after adjustment for age. Allele frequencies were comparable between the two cohorts and with previous studies in white individuals (9,33). Alternatively, although this seems improbable, the association of the *IL-6* genotype with NODAT could be explained by linkage disequilibrium of the G allele with a nearby causative polymorphism or by confounding as a result of population stratification.

Finally, our results highly suggest that *IL-6* production capacity modifies sensitivity and influences the development of NODAT, especially in overweight patients. The *IL-6* gene promoter polymorphism at position -174 may serve as a genetic marker to help physicians in determining recipient risk profiles and in optimizing pre- and posttransplantation treatment strategies.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Fondation Transplantation and the Etablissement Français du Sang (Appel d'offres 2003). J.B. and C.C. received financial support from the Fondation transplantation (ET-031211 and ET-050320, respectively).

We thank Prof. Claude Férec (INSERM U613, EFS Bretagne, Brest, France) for helpful discussion and Jackie Kerveillant for help in preparing this manuscript.

References

- Davidson J, Wilkison A, Dantal J, Dotta F, Haller H, Hernandez D, Kasiske BL, Kiberd B, Krentz A, Legendre C, Marchetti P, Markell M, van der Woude FJ, Wheeler DC; International Expert Panel: New-onset diabetes after transplantation: 2003 International consensus guidelines. Proceedings of an international expert panel meeting. Barcelona, Spain, 19 February 2003. *Transplantation* 75[Suppl]: SS3–SS24, 2003
- Pickup JC, Crook MA: Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41: 1241–1248, 1998
- Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF: Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: Results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 52: 812–817, 2003
- Hu FB, Meigs JB, Li TY, Rifai N, Manson JE: Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. *Diabetes* 53: 693–700, 2004
- Nakanishi S, Yamane K, Kamei N, Okubo M, Kohno N: Elevated C-reactive protein is a risk factor for the development of type 2 diabetes in Japanese Americans. *Diabetes Care* 26: 2754–2757, 2003
- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM: C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286: 327–334, 2001
- Kubaszek A, Pihlajamaki J, Komarovski V, Lindi V, Lindstrom J, Eriksson J, Valle TT, Hamalainen H, Hanne-Parikka P, Keinanen-Kinkaanniemi S, Tuomilehto J, Uusitupa M, Laakso M: Promoter polymorphisms of the TNF-alpha (G-308A) and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: The Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes* 52: 1872–1876, 2003
- Herbert A, Lin C, Karamohamed S, Schiller J, Lin J, Yang Q, Wilson PW, Cupples LA, Meigs JB: The -174 IL-6 GG genotype is associated with a reduced risk of type 2 diabetes mellitus in a family sample from the National Heart, Lung and Blood Institute's Framingham Heart Study. *Diabetologia* 48: 1492–1495, 2005
- Vozarova B, Fernandez-Real J-M, Knowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD, Ricart W, Vendrelli J, Richart C, Tataranni PA, Wolford JK: The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in native Americans and Caucasians. *Hum Genet* 112: 409–413, 2003
- Babel N, Cherepnev G, Kowalenko A, Horstrup J, Volk H-D, Reinke P: Nonimmunologic complications and gene polymorphisms of immunoregulatory cytokines in long-term renal transplants. *Kidney Int* 66: 428–432, 2004
- Ducloux D, Challier B, Saas P, Tiberghien P, Chalopin JM: CD4 cell lymphopenia and atherosclerosis in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 14: 767–772, 2003
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215, 1988
- Depboylu C, Lohmuller F, Gocke P, Du Y, Zimmer R, Gasser T, Klockgether T, Dodel RC: An interleukin-6 promoter variant is not associated with an increased risk for Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 17: 170–173, 2004
- Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P: The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102: 1369–1376, 1998
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T: Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265: 621–636, 1990
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC: Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia* 28: 412–419, 1985
- Hamid YH, Rose CS, Urhammer SA, Glumer C, Nolsoe R, Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Hansen T, Pedersen O: Variations of the interleukin-6 promoter are associated with features

- of the metabolic syndrome in Caucasian Danes. *Diabetologia* 48: 251–260, 2005
18. Fernandez-Real J-M, Broch M, Vendrell J, Gutierrez C, Casamitjana R, Pugeat M, Richart C, Ricart W: Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity. *Diabetes* 49: 517–520, 2000
 19. Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, Dhamrait S, Luong L, Rumley A, Lowe GD, Humphries SE: Interleukin-6 gene –174G>C and –572G>C promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1458–1463, 2001
 20. Pawlik A, Domanski L, Rozanski J, Florczak M, Wrzesniewska J, Dutkiewicz G, Dabrowska-Zamojcin E, Gawronska-Szklarz B: The cytokine gene polymorphisms in patients with chronic kidney graft rejection. *Transpl Immunol* 14: 49–52, 2005
 21. Muller-Steinhardt M, Fricke L, Muller B, Ebel B, Kirchner H, Hartel C: Cooperative influence of the interleukin-6 promoter polymorphisms –597, –572 and –174 on long-term kidney allograft survival. *Am J Transplant* 4: 402–406, 2004
 22. Weimer R, Mytilineos J, Feustel A, Preiss A, Daniel V, Grimm H, Wiesel M, Opelz G: Mycophenolate mofetil-based immunosuppression and cytokine genotypes: Effects on monokines secretion and antigen presentation in long-term renal transplant recipients. *Transplantation* 75: 2090–2099, 2005
 23. Fantuzzi G: Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115: 911–919, 2005
 24. Montori VM, Basu A, Erwin PJ, Velosa JA, Gabriel SE, Kudva YC: Posttransplantation diabetes: A systematic review of the literature. *Diabetes Care* 25: 583–592, 2002
 25. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D, Matas AJ: Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 3: 178–185, 2003
 26. Ducloux D, Kazory A, Chalopin JM: Posttransplant diabetes mellitus and atherosclerotic events in renal transplant recipients: A prospective study. *Transplantation* 79: 438–443, 2005
 27. Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO: Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 8: 75–79, 2002
 28. Di Gregorio GB, Hensley L, Lu T, Ranganathan G, Kern PA: Lipid and carbohydrate metabolism in mice with a targeted mutation in the IL-6 gene: Absence of development of age-related obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E182–E187, 2004
 29. Stith RD, Luo J: Endocrine and carbohydrate responses to interleukin-6 in vivo. *Circ Shock* 44: 210–215, 1994
 30. Ritchie DG: Interleukin-6 stimulates hepatic glucose release from prelabeled glycogen pools. *Am J Physiol* 258: E57–E64, 1990
 31. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA: Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 51: 3391–3399, 2002
 32. Kim H-J, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim Y-J, Noh H-L, Cho Y-R, Cline G, Kim Y-B, Kim JK: Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 53: 1060–1067, 2004
 33. Muller-Steinhardt M, Hartel C, Muller B, Kirchner H, Fricke L: The interleukin-6 –174 promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival. *Kidney Int* 62: 1824–1827, 2002

Access to UpToDate on-line is available for additional clinical information
at <http://www.jasn.org/>

Article n°2

The interleukin-6 gene promoter polymorphism -174 is predictive of atherosclerotic events in overweight transplanted patients

En cours de soumission : Clinical Transplantation

Comme décrit précédemment, l'inflammation joue un rôle dans la pathogénie de l'athérosclérose. Il est actuellement bien décrit dans la littérature une élévation de la PCR chez les patients ayant fait un événement athéromateux à la fois dans la population générale et nous l'avons également montré au sein d'une population de patients transplantés rénaux (**Ridker PM et al. 1997, Ducloux D et al. 2004**). L'ARNm de l'IL-6 est présent à des taux 10 à 40 fois plus élevés au niveau d'artères athéromateuses par rapport à des artères saines. De plus, des études prospectives démontrent que des taux sériques élevés d'IL-6 ayant des conséquences pro-inflammatoires et pro-thrombotiques sont prédictifs d'une survenue accrue d'événements cardio-vasculaires tels que l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs et l'angor instable, suggérant ainsi un rôle majeur de l'IL-6 dans la physiopathogénie de l'athérosclérose (**Tuomisto K et al. 2006**). En transplantation rénale, seuls les travaux récents de La Manna et al. s'intéressant à l'influence du polymorphisme du promoteur du gène de l'IL-6, retrouvent une incidence plus élevée d'événements athéromateux chez les patients transplantés rénaux porteurs de l'allèle G. Cependant, ceux-ci ne confirment pas ces données dans leur 2^{ème} cohorte de validation (**La Manna G et al. 2010**).

L'article précédent observe une capacité de sécrétion d'IL-6 exacerbée chez les patients à la fois porteur du génotype GG, homozygotes sauvages, et tout particulièrement chez les patients présentant un surpoids, le tissu adipeux étant un réservoir majeur de la synthèse d'IL-6. Utilisant les 2 cohortes précédemment décrites, nous nous sommes donc posés la question

suivante : existe-t-il un risque accru de survenue d'événements athéromateux chez les patients transplantés, porteurs du génotype GG et présentant un surpoids ? Pour essayer de mieux établir le lien de cause à effet, nous avons également souhaité observer la présence ou non, chez ces patients hypothétiquement à sur-risque, de niveaux de PCR et d'IL-6 plus élevés.

**The *interleukin-6* gene promoter polymorphism -174 is
predictive of atherosclerotic events in overweight transplanted
patients**

**Jamal Bamoulid^{a,b}, Cécile Courivaud^{a,b}, Marina Deschamps^{a,c}, Béatrice Gaugler^{a,c},
Pierre Tiberghien^{a,c,d}, Jean-Marc Chalopin^{a,b,d}, Philippe Saas^{a,c,d}, Didier Ducloux^{a,b,d}**

^aINSERM, UMR645, Besançon, F-25020 France; Univ Besançon, Besançon, F-25020 France;
IFR133, Besançon, F-25000 France

^bCHU Saint Jacques, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, F-
25030, Besançon, France

^cEFS Bourgogne Franche-Comté, Plateforme de Biomonitoring, CIC-BT506, Besançon, F-
25020 France.

^dCHU Saint Jacques, CIC Biothérapie, CIC-BT 506, F-25030 Besançon, France

This study is supported by grants from the Fondation Transplantation and the Etablissement Français du Sang (Appel d'offres 2003), the PHRC 2005 (to DD), the Fondation de France (Appel d'offre "Maladies Cardiovasculaires" 2007 to PS), the DHOS/INSERM/INCa (Appel d'offre Recherche Translationnelle 2008 to DD and PS). JB and CC received financial support from the Fondation transplantation (#ET-031211 and #ET-050320, respectively).

This work is a part of the RIALTO (Research in Immunology of Atherosclerosis after Transplantation) program.

Corresponding author: Dr Jamal Bamoulid

Tel: 33381218782; Fax: 33381218781; e-mail: jbamoulid@chu-besancon.fr

Running title: IL-6, overweight and atherosclerotic events after transplantation

Abstract

We hypothesized that combining overweight and a greater genetic capacity to produce IL-6 predicted by *IL-6* gene promoter polymorphism at position -174 (G→C) may allow to identify individuals exhibiting higher IL-6 and C-reactive protein (CRP) concentrations and carrying a higher risk of atherosclerotic events (AE).

The occurrence of AE was analyzed with respect to body mass index, *IL-6* gene promoter polymorphism at position -174 (G→C) and other relevant risk factors, retrospectively in 217 renal transplant recipients, and, prospectively, in 132.

In overweight patients, serum IL-6 concentration was found to be significantly lower in C carriers than in GG patients (4.2 [1.0-5.1] vs 7.3 pg/ml [4.4-100]; p= 0.025). Overweight GG patients also had higher CRP levels than other categories of patients (4.9 ± 2.3 vs 3.8 ± 2.7 ; p=0.015). The incidence of AE was higher in overweight GG patients than in other individuals (29.5% vs 10.1%; p=0.0003). In multivariate analysis, overweight-GG had an increased risk to develop AE (HR 2.96 [95% CI 1.09-8.04], p=0.034 in the retrospective cohort, and HR 2.99 [95% CI 0.92-9.33], p=0.069 in the prospective).

All these data are consistent with a role for both genetic (*IL-6* gene promoter polymorphism) and environmental determinants of inflammation (white adipose tissue mass) in the development of AE in renal transplanted patients.

Introduction

Chronic inflammation plays a pivotal role in the pathogenesis of atherosclerosis. For instance, elevated plasma concentrations of C-reactive protein (CRP), a sensitive marker of underlying inflammation, have been shown to predict an increased risk of future cardiovascular (CV) outcomes in the general population (1). Our group recently reported that high CRP levels were also predictive of coronary heart disease in renal transplant recipients (RTR) (2). Circulating CRP levels are under the control of IL-6 secretion (3). As a result, the capacity to produce CRP, and subsequently inflammation, depends at least in part from the capacity to produce IL-6. We recently demonstrated that IL-6 concentrations is in part genetically determined and varied with *IL-6* gene promoter polymorphism at position -174 (G→C) in renal transplant recipients (4). Moreover, it has been demonstrated that white adipose tissue—that contains adipocytes—is an important source of basal IL-6 secretion (5).

We hypothesized that combining overweight and a greater genetic capacity to produce IL-6 predicted by *IL-6* gene promoter polymorphism at position -174 (G→C) may allow to identify a population exhibiting higher IL-6 and CRP concentrations and carrying a higher risk of atherosclerotic events (AE).

Materials and Methods

Study design and populations

We analyzed two groups of patients to assess whether *IL-6* gene promoter polymorphism at position -174 (G→C) may be a risk factor for the later development of AE independently of other risk factors.

The two cohorts have been previously described (4). Briefly, we first conducted a nested genetic study in a retrospective cohort of 217 patients. These patients were transplanted between January 1990 and June 2001.

Second, we studied a prospective cohort of 132 consecutive patients transplanted between July 2001 and December 2004 in our center.

Age, gender, BMI (weight [Kg] / size² [m²]), past history of cardiovascular disease (CVD), hypertension, prior renal transplantation, CMV donor/recipient status, HLA compatibility, and panel-reactive antibodies (PRA) were analyzed as covariates. Dialysis mode (none, hemodialysis, or peritoneal dialysis) and its duration prior to transplantation were recorded. All parameters were collected at the transplant time. Due to the design of the first study (4), patients with pre-transplant diabetes had been excluded.

Approval was obtained from the Besançon ethical committee for these studies. Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki.

Cardiovascular risk factors

Age, gender, weight, size, blood pressure, hemodialysis duration before transplantation, smoking status, past history of AE, immunosuppressive treatment (use of calcineurin inhibitors), and different biologic parameters were assessed upon inclusion.

Definition of atherosclerotic events

Coronary heart disease: myocardial infarction; coronary revascularization including coronary artery bypass surgery or percutaneous transluminal coronary angioplasty; typical history of angina with abdominal coronarography or myocardial scintigraphy

Stroke/Cerebrovascular disease: both non-hemorrhagic and hemorrhagic strokes; carotid endarterectomy

Abdominal aortic or lower extremity arterial disease: abdominal aortic repair; lower extremity amputation; intermittent claudication confirmed by Doppler or arteriography findings.

DNA extraction and analysis of *IL-6* gene promoter polymorphism at position -174 (G→C)

Genomic DNA (gDNA) was extracted from white blood cells using standard salting out procedure (6). Analysis of the *IL-6* gene promoter loci was then study using a PCR-based genotyping assay (7). Methods have been previously described in details (4).

Functional validation of the *IL-6* gene promoter polymorphism

The functional effects of *IL-6* gene promoter polymorphism were analyzed by measuring serum levels of IL-6, 6 months post-transplant in 36 RTR (12 carrying the CC genotype, 12 the GC genotype and 12 the GG genotype). None of the patients experienced either acute rejection or infections at time of serum collection. Interleukin-6 was measured with high-sensitivity ELISA kits (Quantikine HS IL-6 Immunoassay, #HS600B, R&D Systems, Lille, France) according to manufacturer's instructions. Briefly, the profile of IL-6 secretion was determined according to the genotype of the promoter. Three different possible genotypes at the -174 position of the *IL-6* gene promoter can then be defined and associated with a high (G/G), medium (G/C) or low (CC) secretion profile (8). Because IL-6 is recognized as the main inducer for hepatic CRP synthesis (15), CRP (high sensitivity determination) serum levels were measured by nephelometry (Beckman Coulter, Villepinte, France) in all patients.

Statistical analysis

Arithmetic mean was calculated and expressed as \pm standard deviation (SD). Circulating IL-6 concentrations were not normally distributed and their values in the three different genotypes were compared using the Kruskal-Wallis test. Differences in circulating IL-6

values between GG and C carriers were evaluated by the Mann-Whitney test. For normally distributed variables, C carriers and GG patients were compared using the χ^2 test for dichotomic variables and the Student t test for continuous variables. Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for the genotype distribution. Relationships between numerical variables were evaluated with the Spearman/Pearson rank test. Using log-rank tests on Kaplan Meier nonparametric estimates of the survival without atherosclerotic events distribution, we selected variables with a p value lower than, or equal to, 0.20. The selected variables were included into a Cox proportional hazard model, and a backward stepwise selection process was performed, this time at a classical $\alpha = 0.05$. All baseline data were assessed on the transplant day. BMI was separated into two classes (<25 or ≥ 25 Kg/m² corresponding to overweight patients). Results are expressed as Hazard ratio (HR) and 95 % confidence interval (CI), with a p value testing the null hypothesis: HR = 1. Therefore when p value is less than 0.05, HR is significantly different from 1. Assumptions of Cox models (log-linearity and proportionality of risk in time) were met in this analysis. Analysis was performed on Statview 5 (SAS institute Inc.).

RESULTS

Study population

Retrospective cohort

The cohort of 217 patients was followed for a mean duration of 11.8 ± 5.8 years post-transplant. Mean follow up was similar in patients with the different genotypes. There was no difference in the timing of transplants between the different genotypes (data not shown). Mean age was 43 ± 13 years and 139 RTR (64%) were men. Hypertension was present in 156

RTR (72%). Mean dialysis duration was 20 ± 17 months. All the patients but five were Caucasians.

Prospective cohort

One hundred and thirty two patients were studied with a mean follow-up of 6.1 ± 2.8 years. Five patients died during follow-up and four lost their graft. There was no difference in the timing of transplants between the different genotypes (data not shown). Mean age was 47 ± 14 years and 86 RTR (65%) were men. Hypertension was present in 99 RTR (75%). Mean dialysis duration was 19 ± 13 months.

Interleukin-6 gene promoter⁻¹⁷⁴ genotype frequencies in renal transplant recipients

Retrospective study

Ninety five patients (43.8%) were GG homozygotes (wild type), 92 GC heterozygotes (42.4%), and 30 (13.8%) CC homozygotes (mutant) (Table 1). There was no difference in pretransplant characteristics, acute graft rejection episodes and cumulative dose of steroid during first year of transplant between patients with the different genotypes (Table 2). The proportion of GG homozygotes was similar in patients with and without overweight (46% vs 43%). The observed allele frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Prospective study

The allele frequencies were similar in the prospective cohort (GG, 42.7%; GC, 45.9%; CC, 11.4%) (Table 1). Nevertheless, in this cohort, C carriers patients were older than patients with the G allele (49 ± 13 vs 47 ± 14 ; $p=0.037$) (table 2). Sex ratio was also different with more females in C carriers than in GG allele carriers (47% vs 33%; $p=0.042$) (Table 2). The proportion of GG homozygotes was similar in patients with and without overweight (40% vs 44%). The observed allele frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Relationship between the *IL-6* gene promoter⁻¹⁷⁴ genotype, circulating IL-6 and body mass index in renal transplant recipients

Circulating IL-6 concentrations were closely related to BMI ($r=0.55$, $p=0.0005$). There was a trend toward a linear increase in serum IL-6 concentrations from the CC genotype to the GG genotype (median values and ranges were, respectively, 2.77 [1.02 to 9.26], 3.48 [1.11 to 76.85], and 4.19 pg/ml [2.02 to 100] in CC, GC, and GG carriers; $p=0.09$). When analysis was restricted to patients with overweight, serum IL-6 concentration was found to be significantly lower in C carriers than in GG patients (4.2 [1.0-5.1] vs 7.3 pg/ml [4.4-100]; $p=0.025$). By contrast, in patients without overweight, IL-6 levels were quite similar in C carriers than in GG patients (2.2 [1.4-9.3] vs 2.7 pg/ml [1.1-17.8]; $p=0.27$).

CRP levels were assessed in the 217 patients of the retrospective study. Post-transplant CRP concentrations were lower in C carriers ($n=122$) than in GG patients ($n=95$) (3.2 ± 1.6 , 4.1 ± 2.2 , and 4.4 ± 2.1 mg/l in CC, GC, and GG patients, respectively; $p=0.03$). Similar results were observed in the prospective cohort ($n=77$ C carriers and $n=55$ GG patients) (3.0 ± 1.5 , 4.2 ± 2.3 , and 4.7 ± 2.4 mg/l in CC, GC, and GG patients, respectively; $p=0.02$).

Overweight GG patients ($n=27$ and 17, respectively in retrospective and prospective cohorts) had higher CRP levels than other categories of patients (4.9 ± 2.3 vs 3.8 ± 2.7 ; $p=0.015$).

These results confirmed a greater degree of inflammation in overweight GG patients. As a consequence, we compared the incidence of AE between overweight GG patients and the rest of the population.

Relation between *IL-6* gene promoter polymorphism -174, body mass index and cardiovascular events

Retrospective cohort

Mean follow-up was 11.8 ± 5.8 years.

Thirty two patients (14.7%) experienced atherosclerotic complications during the study period (Coronary Heart Disease, 24; CerebroVascular Disease, 3; Peripheral Vascular Disease, 5).

The cumulated incidence of AE was higher in patients in overweight GG patients (33% vs 12%; $p=0.006$) (Table 3 and figure 1).

In univariate analysis, older age ($p=0.002$), male gender ($p=0.031$) and a past history of AE ($p=0.004$) were also associated with AE.

GG patients did not carry an increased risk of AE ($p=0.251$).

In multivariate analysis, older patients (HR 1.07 [95% CI 1.03-1.12] with each one year increase in age, $p=0.001$), and overweight-GG patients (HR 2.96 [95% CI 1.09-8.04], $p=0.034$) had an increased risk of AE (Table 4).

Prospective cohort

Mean follow-up was 6.1 ± 2.8 years.

Seventeen patients (11.8%) experienced atherosclerotic complications during the study period (Coronary Heart Disease, 9; CerebroVascular Disease, 3; Peripheral Vascular Disease, 5).

The cumulated incidence of AE was higher in patients in overweight GG patients (33% vs 9%; $p=0.031$) (Table 3 and figure 1).

In univariate analysis, older age ($p=0.026$), male gender ($p=0.053$), and a past history of AE ($p=0.004$) were also associated with AE. GG patients did not carry an increased risk of AE ($p=0.251$).

In multivariate analysis, older patients (HR 1.07 [95% CI 1.03-1.12] with each one year increase in age, $p=0.001$), and those with a past history of AE (HR 3.88 [95% CI 1.09-11.35], $p=0.042$) had an increased risk of AE. There was a trend towards an increased risk of AE in overweight GG patients (HR 2.99 [95% CI 0.92-9.33], $p=0.069$) (Table 4).

Overall cohort

The cumulated incidence of AE was higher in patients in overweight GG patients (29.5% vs 10.1%; $p=0.0003$) (Table 3).

In univariate analysis, older age ($p<0.0001$), male gender ($p=0.005$), and a past history of AE ($p<0.0001$) were also associated with AE. GG patients did not carry an increased risk of AE ($p=0.251$).

In multivariate analysis, older age (HR 1.06 [95% CI 1.02-1.09] with each one year increase in age, $p=0.0005$), male gender (HR 2.83 [95% CI 1.22-6.55], $p=0.016$), and a past history of AE (HR 6.34 [95% CI 1.61-18.35], $p=0.008$) were independent risk factors for AE. Overweight GG patients had also an increased risk of AE (HR 3.08 [95% CI 1.33-7.13], $p=0.009$) (Table 4).

Discussion

Here, we reported that the GG genotype of the *IL-6* gene promoter -174, associated with a higher capacity to produce IL-6, is an independent risk factor for AE in overweight transplanted patients, but not in patients with standard weight. We also showed that IL-6 concentrations were increased only in the same subset of patients with overweight and

carrying the GG genotype of the *IL-6* gene promoter at position -174. This result is probably due to the fact that white adipose tissue is a major source of basal IL-6 secretion (5). Thus, only the combination of a greater genetically determined capacity to produce IL-6 and of an increased mass of IL-6-producing tissues seems to result in higher circulating IL-6 levels. Concordant with this result, we also found higher post-transplant CRP concentrations in overweight patients with the *IL-6* gene promoter GG genotype. Methodological standardization is mandatory in SNPs studies: a plausible hypothesis, the biological relevance of the polymorphism, and a confirmation of the results in a separate independent cohort are indispensable prerequisites in such studies (9). All these essential conditions are met in this study. Collectively, all these data are consistent with a role for both genetic and environmental determinants of inflammation in the development of AE.

The relationship between obesity, metabolic syndrome and inflammation has already been described. Riikola and al recently reported a statistical link between *IL-6* gene promoter polymorphism -174 G/C and several metabolic risk factors in men. Indeed GG genotype is associated with higher serum total cholesterol and LDL cholesterol in male (10). This could be explained by an impaired reverse cholesterol transport *in vivo* due to inflammation as described in the study by McGillicuddy FC and al (11). Wajchenberg et al demonstrated that low grade inflammation is the cause of developing insulin resistance, metabolic syndrome and endothelial dysfunction in obesity, through a chronically activated inflammatory state of the adipose tissue (12). Moreover, we recently showed that the *IL-6* gene promoter polymorphism -174 was associated with new-onset diabetes after transplantation (4). All these findings add to the recent notion of adipose tissue as playing a central role in lipid and glucose metabolism. Adipose tissue produces a large number of cytokines such as *IL-6* and this endocrine capacity is enhanced in obese subjects (13). This could explain low grade inflammation in this population which is the angular stone of metabolic syndrome and

cardiovascular diseases associated with obesity. Our results are in concordance with this phenomenon. In regards of these studies, we could hypothesize that the relationship between obesity and atherosclerotic events in transplanted patients is mediated by the individual degree of inflammation at least in part genetically determined.

Our work highlights the need to take into account plausible interactions between genetic background and environmental conditions in genetic association studies. Genetic factors are likely to affect the occurrence of numerous common diseases. Nevertheless, genes operate in complex pathways with not only gene to gene but also gene to environmental factor interactions (14). In the specific case of IL-6, we showed that even when we showed that the IL-6 gene promoter polymorphism influences IL-6 levels in the whole RTR population, the difference is mainly explained by the difference observed in overweight patients. When considering both the GG genotype of *IL-6* gene promoter at position -174 and overweight, we defined a phenotype-genotype association with both biological and clinical relevance. Thus, we believe that an integrative approach associating both genetic and non genetic factors is required to predict the ability to generate variable amounts of a specific gene-product and study its effects.

A selection bias is likely in the retrospective study. All the results indicate that we included low-risk patients regarding risks of AE, graft failure, and death. As a consequence, a survival bias could not be totally excluded. A differential rate of graft and patient survival or DNA availability between patients with the C or G alleles may also have influenced our results. Nevertheless, all these limitations should favor the null hypothesis, and not contribute to a false positive result. Moreover, due to the design of the initial study, patients with pre-transplant diabetes were excluded. Whether our results are applicable to diabetic patients remain to be determined. By the nature of the recruitment process, clinical information obtained prospectively is usually of higher quality than retrospective data and

our retrospective study can only be used to generate hypotheses that have to be validated in a prospective cohort. Analysis of our prospective cohort confirmed the results obtained in the retrospective cohort.

Finally, our results highly suggest that IL-6 production capacity influences the development of AE after kidney transplantation in overweight patients. The *IL-6* gene promoter polymorphism at position -174 may serve as a genetic marker to help physicians in determining recipient risk profile and in optimizing pre-and post-transplant treatment strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the staff of the nephrology unit of the Saint Jacques Hospital Besançon, the technicians of the Plateforme de Biomonitoring (CIC BT506), Besancon, France.

References

1. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336: 973-979.
2. Ducloux D, Kazory A, Chalopin JM. Predicting coronary heart disease in renal transplant recipients: a prospective study. *Kidney Int.* 2004; 66: 441-447.
3. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, et al. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286: 327-334.
4. Bamoulid J, Courivaud C, Deschamps M, Mercier P, Ferrand C, Penfornis A, Tiberghien P, Chalopin JM, Saas P, Ducloux D. IL-6 promoter polymorphism -174 is associated with new-onset diabetes after transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 2333-2340.
5. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 115: 911-919.
6. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
7. Ducloux D, Challier B, Saas P, Tiberghien P, Chalopin JM. CD4 cell lymphopenia and atherosclerosis in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 767-772.
8. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1369-1376.
9. Freely associating. *Nature Genetics* 1999; 22: 1-2.
10. Riikola A, Sipilä K, Kähönen M, Jula A, Nieminen MS, Moilanen L, Kesäniemi YA, Lehtimäki T, Hulkkonen J. Interleukin-6 promoter polymorphism and cardiovascular risk factors: The Health 2000 Survey. *Atherosclerosis.* 2009; 207: 466-70.

11. McGillicuddy FC, de la Llera Moya M, Hinkle CC, Joshi MR, Chiquoine EH, Billheimer JT, Rothblat GH, Reilly MP. Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* 2009; 119: 1135-1145.
12. Wajchenberg BL, Nery M, Cunha MR, Silva ME. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009; 53:145-150.
13. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 2008; 29: 2959-2971.
14. Khoury MJ, Little J, Gwinn M, Ioannidis JP. On the synthesis and interpretation of consistent but weak gene-disease associations in the era of genome-wide association studies. *Int.J.Epidemiol.* 2007; 36: 439-445.

Table 1: IL-6⁻¹⁷⁴ genotype frequencies in renal transplant recipients

Genotype	Retrospective cohort		Prospective cohort	
	Number	[%]	Number	[%]
GG	95	43.8%	55	42.7%
C carriers	122	56.2%	77	67.3%
Total	217	100%	132	100%

Table 2: Characteristics of patients with the different IL-6⁻¹⁷⁴ gene promoter genotypes

	Retrospective cohort		Prospective cohort	
	GG	C carriers	GG	C carriers
	n = 95	N = 122	n = 55	N = 77
Age	45 ± 12	45 ± 12	47 ± 14	49 ± 13
Sex ratio (% male)	64%	64%	72%	53%
Pre-transplant BMI (kg/m²)	23.7 ± 4.1	23.4 ± 4.6	23.9 ± 4.0	24.0 ± 4.5
Past history of cardiovascular disease	4.0%	3.9%	10.0%	12.7%
Acute rejection	22%	20%	18%	16%

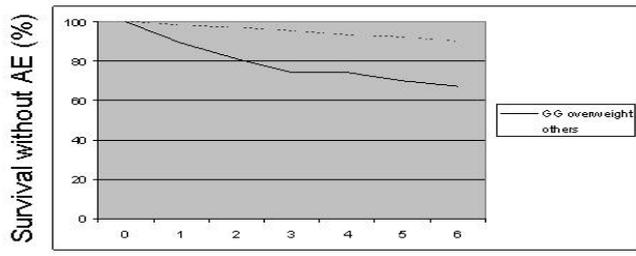
BMI, body mass index

Table 3: Incidence of atherosclerotic events (AE) in the retrospective, prospective and overall cohort according to *IL-6*⁻¹⁷⁴ genotype and body mass index (BMI).

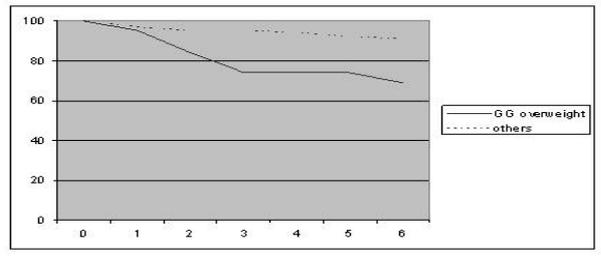
	All patients	Overweight patients carrying the GG genotype	Other patients	p
Retrospective cohort (n= 217)	14.7% (n=32)	33% (n=9)	12% (n= 23)	0.006
Prospective cohort (n= 132)	11.8% (n=17)	33% (n=3)	9% (n=12)	0.031
Overall cohort (n=349)	14% (n=49)	29.5% (n=12)	10.1% (n=35)	0.0003

Table 4: Risk factors of cardiovascular events in the retrospective, prospective and overall cohort (multivariate analysis expressed in Hazard Ratio).

	HR	IC 95%	p
Retrospective cohort			
Age > 45 y.o	1.07	[1.03-1.12]	0.001
Overweight+<i>IL-6</i> GG genotype	2.96	[1.09-8.04]	0.034
Prospective cohort			
Age > 45 y.o	1.07	[1.03-1.12]	0.001
Past history of CVE	3.88	[1.09-11.35]	0.042
Overweight+<i>IL-6</i> GG genotype	2.99	[0.92-9.33]	0.069
Overall cohort			
Age >45 y.o	1.06	[1.03-1.09]	0.0005
Male gender	2.83	[1.22-6.55]	0.016
Overweight+<i>IL-6</i> GG genotype	3.08	[1.33-7.13]	0.009



Retrospective cohort



Prospective cohort

III/ Discussion concernant ces 2 articles

La 1^{ère} étude montre une relation entre la capacité de production d'IL-6 prédite par le polymorphisme -174 G/C du promoteur du gène de l'*IL-6* et la survenue d'un NODAT. Le génotype CC est associé à un plus faible risque de diabète *de novo* et sa valeur prédictive négative atteint 85% ce qui permet de caractériser une population à très faible risque. L'allèle G augmente le risque de diabète *de novo* et sa valeur prédictive positive est faible (20%). La présence de l'allèle G doit être combinée à celle d'autres facteurs de risque. Le surpoids isolé a également une valeur prédictive positive de 20%, mais l'association d'un surpoids et de la présence de l'allèle G porte cette valeur prédictive à 50%, ce qui compte tenu de la gravité de la complication est un seuil raisonnable pour établir des choix thérapeutiques. En effet, « l'effet diabétogène » des protocoles immunosuppresseurs est variable selon les associations utilisées. L'utilisation du tacrolimus est associée à une plus grande fréquence de diabète *de novo* que la ciclosporine (**Davidson J et al. 2003**). Des méta-analyses ont montré que l'utilisation de la ciclosporine à la place du tacrolimus chez 9 patients évitait un diabète, mais au prix de davantage de rejet et de perte de greffon (**Davidson J et al. 2003**). La connaissance du génotype du polymorphisme -174 G/C pourrait permettre de guider ce choix de l'anti-calcineurine en affinant la définition de la population qui en bénéficierait le plus. Les mêmes réflexions pourraient être menées sur l'utilisation des stéroïdes ou des inhibiteurs de mTOR. Néanmoins, la valeur prédictive dépendant de l'incidence, le bénéfice attendu de ces choix pourrait être modifié selon le taux de diabète *de novo* observé dans la population étudiée.

La 2^{nde} étude montre, elle, une relation entre la capacité de production de l'IL-6 prédite par le polymorphisme -174 G/C du promoteur de l'*IL-6* et la survenue d'événements athéromateux

dans une population restreinte correspondante aux patients transplantés rénaux présentant un surpoids.

L'intérêt de ce polymorphisme est donc réel pour stratifier le risque de NODAT au sein de la population des transplantés rénaux et par ce biais, le risque de survenue accrue d'événements athéromateux chez certains d'entre eux. Le NODAT est un facteur de risque d'athérosclérose et mieux dépister les patients à risque pour leur proposer une prise en charge à la fois thérapeutique efficace du NODAT et préventive systématique de l'athérosclérose pourrait présenter un atout en terme de morbi-mortalité chez ces patients.

A noter que nous sommes la première équipe à valider de manière fonctionnelle le polymorphisme du promoteur du gène de l'*IL-6* au sein d'une cohorte de patients transplantés.

IV/ Polymorphisme du promoteur du gène de l'IL-6 et autres maladies inflammatoires chroniques (cancer et DCG)

Nous n'avons pas observé de corrélation entre le polymorphisme du promoteur du gène de l'*IL-6* et la survenue de cancers au sein de la cohorte de transplantés rénaux. L'*IL-6* est à l'heure actuelle considéré comme un acteur clé à la fois au sein des interactions entre immunité innée et adaptative ainsi qu'entre inflammation aiguë et chronique (Hoebe K et al. 2004). Un des modèles utilisé fréquemment pour étudier l'oncogenèse comme maladie inflammatoire est celui des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). L'*IL-6* module l'expression de chimiokines et de molécules d'adhésion, ainsi que les phénomènes d'apoptose et favorise l'infiltration des sites tumoraux par les monocytes/macrophages dont l'activation va influencer la réponse adaptative (McLoughlin RM et al. 2003, Mantovani A 2005). Dans des études cliniques, des concentrations sériques élevées d'*IL-6* et de la forme soluble de son récepteur ont été observées chez les patients avec une MICI (Atreya R et al.

2000, McLoughlin RM et al. 2003). Il a également été démontré que l'IL-6 a un rôle important dans la différenciation de type Th17. Les Lc Th17 sont d'ailleurs retrouvés en grand nombre au niveau de la muqueuse digestive des patients atteints de maladie de Crohn (**Mangan PR et al. 2006**). De la même manière, en cancérologie, des concentrations élevées d'IL-6 ont été mesurées à la fois dans le sérum des patients, ainsi qu'au sein de biopsies tumorales (**Chung YC et al. 2003, Kai H et al. 2005**). L'association du polymorphisme du promoteur du gène de l'IL-6 avec un risque supérieur de développer un cancer a déjà été rapportée (cancer du sein, de l'œsophage, de l'ovaire...). Cependant, les résultats sont discordants d'une étude à l'autre. Les difficultés de comparaison entre ces différentes études proviennent essentiellement des cohortes souvent non homogènes en terme de gravité (stade de la maladie, localisation métastatiques...). Dans la littérature relative à la transplantation rénale, ce polymorphisme a été associé uniquement à un risque accru de développer un sarcome de Kaposi (**Gazouli M et al. 2004**).

Nous n'observons pas de corrélation entre le polymorphisme du promoteur du gène de l'*IL-6* et la DCG après transplantation rénale. La DCG correspond à une maladie ayant une polarisation plutôt de Type 1. L'IL-6 pourrait donc être déterminante dans sa physiopathologie. Muller et al ont observé un rôle protecteur de l'allèle G sur la survie du greffon à 3 ans après transplantation rénale (**Müller-Steinhardt M et al. 2002**). Pawlik et al comparant des patients transplantés rénaux ayant une fonction rénale stable à des patients présentant une DCG, observent au sein de ce dernier groupe un nombre de patients porteurs du génotype CC significativement plus élevé ($p < 0.01$) (**Pawlik A et al. 2005**). Cette même équipe confirme ces données 3 ans plus tard observant de nouveau un rôle « protecteur » de l'allèle G (**Pawlik A et al. 2008**). Ces données peuvent paraître étonnantes et en désaccord avec les observations faites à plusieurs reprises d'une tendance à une survenue accrue

d'épisodes de rejet aigu chez les patients porteurs de l'allèle G. D'autres études sont nécessaires pour confirmer ou infirmer les résultats faisant état d'un risque accru de DCG chez les patients « faible sécréteur d'IL-6 », porteurs de l'allèle C.

2^{ème} gène candidat :

CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2)

I/ Description du gène de COX-2

Le gène humain de COX-2 est situé sur le chromosome 1 (1q25). COX-2 est le produit d'un gène rapidement induit au cours des phases précoces de l'inflammation et de la progression tumorale. Ce type de réponse immédiate est révélateur des mécanismes d'adaptation au stress cellulaire. COX-2 est sous le contrôle de régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles complexes. Plusieurs facteurs incluant entre autres des cytokines, des agents pro-inflammatoires, des facteurs de croissance, des oncogènes, des promoteurs de tumeurs (acides biliaires : promoteur endogène de cancers digestifs) et les UVA et UVB, sont connus pour induire COX-2 et la production de PG pro-inflammatoires dans différents types cellulaires, notamment dans les cellules épithéliales, les fibroblastes, les kératinocytes, les monocytes/macrophages et les cellules endothéliales. Ces voies de transduction convergent vers l'activation de facteurs transcriptionnels régulateurs susceptibles de se fixer au niveau de la région promotrice du gène codant COX-2 tel que AP-1 ou NF- κ B. L'induction de COX-2 est sous la dépendance des MAPK incluant les cascades ERK1/2, JNK/SAPK et p38 (**Figure 21**).

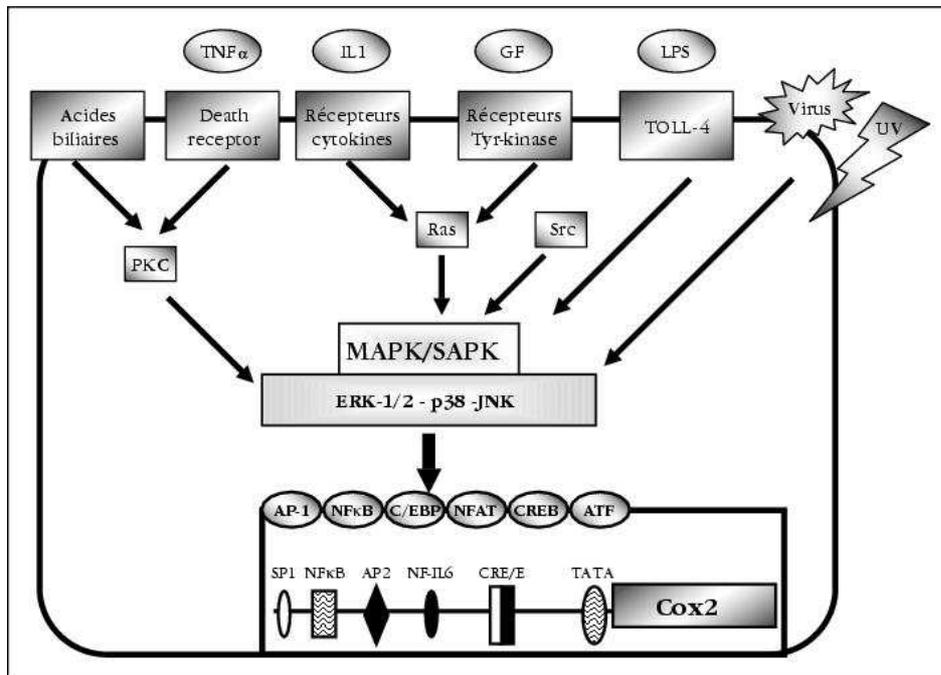


Figure 21: Induction transcriptionnelle de COX-2 (cyclooxygénase-2). Régulation du promoteur de COX-2 (pCOX-2) par l'infection virale, les UV, la signalisation des récepteurs ancrés dans la membrane plasmique et les oncogènes Src et Ras. Le premier relais de signalisation cytoplasmique mobilise la voie des MAPK/SAPK et des protéines kinases de type C (PKC). Le second relais nucléaire recrute différentes familles de facteurs de transcription qui vont se fixer sur les éléments de réponse du pCOX-2. GF : growth factors.

Le promoteur de COX-2 est régulé négativement par les glucocorticoïdes, les cytokines anti-inflammatoires et l'acide rétinoïque (Niuro H et al. 1997, Subbaramaiah K et al. 2002). Les ligands des récepteurs nucléaires PPAR α et PPAR γ interfèrent également avec l'activation transcriptionnelle de COX-2 en bloquant NF- κ B et AP-1 (Subbaramaiah K et al. 2001). Les produits de COX-2, en se fixant sur les récepteurs PPAR, exercent donc un rétrocontrôle négatif sur COX-2. La demi-vie de la protéine COX-2 est courte (entre 13 et 50mn) et est donc très minoritaire dans les tissus normaux. Dans les cancers, l'expression de COX-2 résulte non seulement de l'activation de la transcription, mais aussi des régulations post-transcriptionnelles caractérisées par la stabilisation du message de COX-2. Ainsi dans les

cellules tumorales, la durée de vie de la protéine COX-2 est augmentée et comprise entre 3 et 8 heures (**Shao J et al. 2000**). La COX catalyse la première étape d'oxydation de l'acide arachidonique aboutissant à la synthèse des prostanoides qui regroupent le thromboxane A₂, les PG et la prostacycline. Les prostanoides interviennent dans des processus physiologiques tels que la coagulation sanguine, le métabolisme osseux, la croissance et le développement neuronal, la cicatrisation, la régulation de la microcirculation et du transport tubulaire hydro-sodée au niveau rénal et les réponses immunitaires. Par ailleurs, COX-2 est associée à l'inflammation vasculaire et à la prolifération cellulaire. D'ailleurs, le taux d'expression de COX-2 augmente fortement dans les pathologies néoplasiques (digestives, ORL, pulmonaires, cutanées et urologiques) et athéromateuses (syndrome coronarien aigu, AOMI et AVC) (**Chan CM et al. 2007, Lim JW et al. 2002, Khuri FR et al. 2001, Denkert C et al. 2001, Cipollone F et al. 2001**).

II/ Polymorphisme du promoteur du gène de la COX-2 en position -765 G/C

II-1/ Etat de la littérature

Le polymorphisme étudié dans nos travaux est situé au niveau du promoteur du gène de COX-2 où la guanine en position -765 est remplacée par une cytosine [-765G/C]. Cette substitution est associée à un taux réduit de transcription du gène de la COX-2. Les patients porteurs du génotype GG, homozygotes sauvages sont donc considérés comme « forts inducteurs » de cette voie enzymatique, les patients GC, hétérozygotes, comme des « inducteurs modérés » et les patients CC, double mutés ou homozygotes pour l'allèle mineur, comme de « faibles inducteurs » (**Papafili A et al. 2002**).

La validation fonctionnelle de ce polymorphisme a été réalisée pour la première fois en 2002, par Papafili et al. en mesurant l'activité luciférase de cellules co-transfectées (cellules HLF1 : Human fetal lung fibroblast) par des constructions plasmidiques ADN comportant la séquence soit -765G, soit -765C du promoteur du gène de *COX-2*. Une activité luciférase significativement moindre pour les constructions comprenant -765C, sans ou après stimulation par du sérum, était observée, comparativement aux constructions comprenant -765G (**Figure 22**). Dans cet article, les auteurs considéraient comme une preuve de la validation fonctionnelle, *in vivo*, la démonstration de niveaux de PCR significativement moindres chez les patients porteurs de l'allèle C après pontage aorto-coronarien. Cette validation fonctionnelle est bien sur sujette à discussion car la PCR n'est pas un marqueur spécifique de la voie enzymatique *COX-2* et que son élévation après ce type d'intervention chirurgicale est largement décrite dans la littérature.

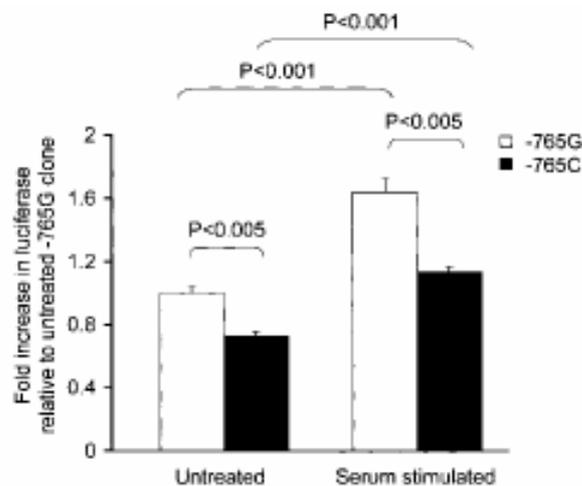


Figure 22: Validation fonctionnelle *in vitro* du polymorphisme du promoteur du gène de *COX-2* (cyclooxygénase-2) en position -765 G/C. Mesure de l'activité luciférase de cellules co-transfectées (cellules HLF1 : Human fetal lung fibroblast) par des constructions plasmidiques ADN comportant la séquence soit -765G, soit -765C du promoteur du gène de *COX-2*. Une activité luciférase significativement moindre pour les constructions comprenant -765C, sans ou après stimulation par du sérum, était observée, comparativement aux constructions comprenant -765G.

En revanche, l'année précédant la description de ce polymorphisme et de sa validation fonctionnelle, Cipollone et al. ont objectivé chez des patients ayant bénéficié d'une endartériectomie, soit pour sténose carotidienne symptomatique, soit asymptomatique, une expression significativement plus élevée de COX-2, mais aussi de MMP-2, MMP-9 et PGES (PGE synthétase) (résultant de l'induction de COX-2), au sein des plaques athéromateuses de patients symptomatiques (**Cipollone F et al. 2001**). Cependant, ce n'est qu'en 2004 que Cipollone et al ont confirmé l'association entre le polymorphisme -765G→C du promoteur du gène *COX-2* et une expression significativement abaissée de COX-2, sur des pièces d'endartériectomie. les auteurs ont par ailleurs observé dans cette même étude que le polymorphisme -765G→C du promoteur du gène *COX-2* est associé à une réduction du risque d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) (**Cipollone F et al. 2004**). Depuis d'autres équipes ont publié des résultats contradictoires. Une méta-analyse récente (2009) de Li et al, incluant 8 études sélectionnées sur leur rigueur méthodologique, a permis d'inclure 4930 patients porteurs de coronaropathies ischémiques symptomatiques associés à 17997 contrôles, ainsi que 1628 patients ayant fait un AVC associés à 17653 contrôles. L' OR (Odds Ratio) retrouvé pour les cardiopathies ischémiques est de 0,80 [IC 95% :0,65-0,98, p=0,03] pour l'allèle C par rapport à l'allèle G, l'OR pour les AVC est, en revanche, de 1,11 [IC 95% :0,88-1,42, p=0,38] (**Li W et al. 2009**).

En oncologie la sur-expression de COX-2 au niveau des lésions tumorales est largement décrite, néanmoins, rares sont les études de polymorphisme associées une validation fonctionnelle, celle-ci s'avérant le plus souvent non concluantes (**Chan CM et al. 2007, Lim JW et al. 2002, Denkert C et al. 2001, Khuri FR et al. 2001, Sitarz R et al. 2008, Brosens LA et al. 2005**).

II-2/ Etat de la littérature en transplantation rénale (population caucasienne)

Une seule étude est publiée dans ce domaine, s'intéressant à l'influence du polymorphisme du promoteur en position -765 G/C de *COX-2* sur la survenue de tumeurs cutanées (hors mélanome), sur une population de patients transplantés rénaux, cardiaques et hépatiques (n=107 dont 72 transplantés rénaux) appariés à des patients transplantés indemnes de lésions cancéreuses (n=133 dont 102 transplantés rénaux). Lira et al n'ont pas objectivé d'association significative, mais une tendance à un rôle protecteur de l'allèle C sur le risque de cancers cutanés pour les patients de moins de 50 ans (**Lira MG et al. 2007**).

Article n°3

G-765C COX-2 gene promoter polymorphism and risk of atherosclerosis after kidney transplantation

Transplantation 2009

La rupture de la plaque d'athérome est la complication responsable d'environ 70% des épisodes ischémiques aigus (**Falk E et al. 1995**). Il est maintenant admis que la composition de la plaque d'athérome plus que sa taille, est le réel déterminant de l'évolution de la plaque vers la rupture (**Davies MJ et al. 1985, Hackett D et al. 1988**). MMP-2 et MMP-9 sont 2 enzymes fortement exprimées au niveau des plaques athéromateuses carotidiennes des patients symptomatiques, suggérant leur rôle crucial dans l'instabilité de la plaque (**Cipollone F et al. 2001**). La production de MMP-2 et MMP-9 par les macrophages se fait via la synthèse de PGE2 sous la dépendance de COX-2 (**Cipollone F et al. 2001**). Nous avons exposés précédemment les travaux de Cipollone et al dans la population générale, mettant en évidence une association entre le polymorphisme auquel nous nous sommes intéressé et une diminution du risque d'infarctus du myocarde et d'AVC (**Ciplone F et al. 2004**).

Dans l'article suivant nous avons donc étudié l'influence de ce même polymorphisme sur la survenue d'événements athéromateux après transplantation rénale.

Q:1 G-765C COX-2 Gene Promoter Polymorphism and Risk of Atherosclerosis After Kidney Transplantation

Renal transplant recipients have disproportionately high rates of atherosclerotic outcomes. Although traditional cardiovascular risk factors are frequent in this population, our group has emphasized the importance of inflammatory processes in the atherogenesis after renal transplantation (1). It has been proposed that COX-2-mediated prostaglandin (PG) production by activated macrophages may promote atherosclerosis through a number of mechanisms (2). A functional G→C polymorphism has been identified in the human COX-2 gene promoter at position -765 with C allele leading to a decreased promoter activity with low prostaglandin E2 (PGE2) production (3). Cipollone et al. (4) found an association between patients carrying the -765 C allele and lower risk of myocardial infarction and stroke.

We conducted a retrospective genetic study to assess whether COX-2 gene promoter polymorphism may be a risk factor for atherosclerotic events (AE) in two independent cohorts. The first cohort comprised 378 patients transplanted in the Department of Renal Transplantation in Saint-Jacques Hospital (Besançon), followed up for a mean duration of 9.3±8.8 years. The second cohort enrolled 256 patients transplanted in the Department of Renal

Transplantation in Necker Hospital (Paris), with a mean follow-up of 8.5±3.7 years. Characteristics of the study population are summarized in Table 1. Analysis of the COX-2 gene promoter loci was a study by PCR-RFLP as previously described (3). The functional effects of COX-2 gene promoter polymorphism were analyzed by measuring serum levels of PGE2 with high-sensitivity ELISA kits in 62 patients (GG, 33; GC, 17; and CC, 12). Posttransplant AE were diagnosed according to published criteria (5). Differences in circulating PGE2 values between GG and C carriers were evaluated by the Mann-Whitney U test. Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for the genotype distribution. Using log-rank tests on Kaplan-Meier nonparametric estimates of the survival without AE distribution, variables with a P value lower than, or equal to, 0.20 were selected. The selected variables were included into a Cox proportional hazards model and a backward stepwise selection process was performed, this time with a $\alpha=0.05$.

Frequencies of different genotypes are depicted in Table 1. Patients with the GG genotype had significantly higher serum PGE2 concentrations than patients with the C allele (median values and range were, respectively, 1111 pg/mL

[441–3787], 1026 pg/mL [518–6868], 2541 pg/mL [483–10327] in CC, GC, and GG carriers; $P=0.0003$). Because the C allele seemed to have dominant effect, we then compared C carriers to patients with the GG genotype. Annual incidences in Besançon and Necker cohort were 2% and 1.4%, respectively (Table 1). In univariate analysis, older age, male gender, and a history of AE and diabetes mellitus were directly associated with AE in the two cohorts. In Besançon cohort, we observed a trend towards a protective effect of the GG genotype ($P=0.062$), whereas in Necker cohort, GG genotype was directly associated with AE ($P=0.03$). Cox regression analysis revealed that COX-2 gene promoter polymorphism at position -765 was not associated with AE in any cohort.

Whereas, some authors have reported that the C allele might provide protective effects against AE, others studies found no evidence for an association between the COX-2 gene promoter polymorphism and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke (6, 7). Moreover, Rofecoxib, a COX-2 inhibitor, was shown to increase the risk of cardiovascular events and withdrew from the market for this reason (8). These conflicting results are

TABLE 1. Characteristics of patients and atherosclerotic events according to the different -765 COX-2 gene promoter genotypes in the two cohorts

	Cohort 1 (Besançon), n=378		Cohort 2 (Paris) n=256	
	GC (29.9%)+CC (4.5%); n=130 (34.4%)	GG; n=248 (65.6%)	GC (29%) +CC (1.9%); n=79 (30.9%)	GG; n=177 (69.1%)
Age (yr)	47±14.3	46±13.8	42±12.4	45±12.8
BMI (kg/m ²)	22.9±4.7	22.9±4.2	—	—
Gender ratio (% male)	61.5	62.9	53	57.6
Diabetes (%)/PTDM (%)	7.7/14.6	4.8/12.1	12.6/3.8	14.7/10.2
History of CV events	17 (13.1%)	26 (10.5%)	9 (11.4%)	25 (14.1%)
Atherosclerotic events	30 (23.1%)	41 (16.5%)	6 (7.6%)	24 (13.5%)

BMI, body mass index; CV, cardiovascular.

possibly explained by the complex role of COX-2 in atherogenesis. COX-2 is only an intermediate enzyme in the metabolic pathway of arachidonic acid, and the COX bio-product PGH₂ is further metabolized by other isomerases to various prostanoids (PGE₂, PGD₂, PGI₂, and 15dPGJ₂). Many PG produced by the COX-2 pathway contribute to formation of atherosclerosis and thrombosis, but PG as PGD₂ and 15dPGJ₂ also possess anti-inflammatory properties (9, 10). Thus, it is likely that COX-2 exerts beneficial or detrimental effects depending on the ability of specific cells to metabolize PGH₂ into cytoprotective or proinflammatory prostanoids. The discrepancies between studies may be also in part related to methodological reasons. In our study, we analyzed the effect of the COX-2 gene promoter polymorphism in two independent cohorts, and we found contradictory results. Restricting analysis to only one of these cohorts could have led to incorrect interpretations and conclusions. So, our study emphasizes the requirement for methodological standardization in single nucleotide polymorphism studies (11).

In conclusion, no effect of the -765G→C COX-2 gene promoter polymorphism was observed on the occurrence of AE in renal transplant recipients. Future studies should determine the complex role of COX-2 pathway in

atherogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Marina Deschamps, Christine Colombain, and Eléonore Gravelin for their excellent technical assistance and Christophe Ferrand for his advices.

Cécile Courivaud
Jamal Bamouli
Inserm, UMR645
Université de Franche-Comté, IFR133
Besançon, France
CHU Saint Jacques, Department of
Nephrology, Dialysis, and Renal
Transplantation
Besançon, France

Pierre Tiberghien
Philippe Saas
Inserm, UMR645
Université de Franche-Comté, IFR133
Besançon, France
EFS Bourgogne Franche-Comté
Plateforme de Biomonitoring
Besançon, France
CHU Saint Jacques, CIC intégré en
Biothérapies
Besançon, France

Jean-Marc Chalopin
Didier Ducloux
Inserm, UMR645
Université de Franche-Comté, IFR133
Besançon, France
CHU Saint Jacques, Department of
Nephrology, Dialysis, and Renal
Transplantation
Besançon, France
CHU Saint Jacques, CIC intégré en
Biothérapies
Besançon, France

Christophe Legendre
Eric Thervet
Université Paris Descartes
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,
Hôpital Necker
Paris Cedex 15, France

This work was supported by the Fondation Transplantation, the Fondation de France (Appel d'offre maladies cardiovasculaires 2007; P.S.), the DHOS/INSERM/INCa (Appel d'offre Recherche Translationnelle 2008; D.D. and P.S.), and the Fondation transplantation grant ET-031211 and ET-050320 (C.C.).

Address correspondence to: Cécile Courivaud, Department of Nephrology, Dialysis and Renal

transplantation, CHU Saint-Jacques, F-25030, Besançon, France.

E-mail: ccourivaud@chu-besancon.fr

Received June 8, 2009.

Accepted June 17, 2009.

Copyright © 2009 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/09/8806-1

DOI: 10.1097/TP.0b013e3181b4e938

REFERENCES

1. Kasiske BL, Maclean JR, Snyder JJ. Acute myocardial infarction and kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 900.
2. Linton MF, Fazio S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 116.
3. Papafili A, Hill MR, Brull DJ, et al. Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: Evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1631.
4. Cipollone F, Toniato E, Martinotti S, et al. A polymorphism in the cyclooxygenase-2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke. *JAMA* 2004; 291: 2221.
5. Ducloux D, Challier B, Saas P, et al. CD4 cell lymphopenia and atherosclerosis in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 767.
6. Huuskonen KH, Kunnas TA, Tanner MM, et al. COX-2 gene promoter polymorphism and coronary artery disease in middle-aged men: The Helsinki sudden death study. *Mediators Inflamm* 2008; 2008: 289453.
7. Kohsaka S, Volcik KA, Folsom R, et al. Increased risk of incident stroke associated with the cyclooxygenase-2 (COX-2) G-765C polymorphism in African-Americans: The atherosclerosis risk in communities study. *Atherosclerosis* 2008; 196: 926.
8. Bombardier C, Laine L, Reicin A, et al. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343: 1520.
9. Inoue T, Takayanagi K, Morooka S, et al. Serum prostaglandin D synthase level after coronary angioplasty may predict occurrence of restenosis. *Thromb Haemost* 2001; 85: 165.
10. Brash AR. Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J Clin Invest* 2001; 107: 1339.
11. Editorial. Freely associating. *Nat genet* 1999; 22: 1.

Article n°4

Influence of *Cyclooxygenase-2 (COX-2)* gene promoter polymorphism -765 on graft loss after renal transplantation

AJT 2009

Nous avons décrit dans l'introduction les propriétés immunomodulatrices de PGE2 en cause dans la polarisation de la réponse immunitaire de type 2. Chez l'homme, en transplantation rénale, une diminution du nombre d'épisodes de rejet est rapportée suite à un traitement par analogue de la PGE2 (**Moran M et al. 1990**).

Dans l'article suivant nous avons donc étudié l'influence du polymorphisme du promoteur en position -765 G/C de *COX-2* sur la perte du greffon après transplantation rénale.

Influence of *Cyclooxygenase-2 (COX-2)* Gene Promoter Polymorphism –765 on Graft Loss After Renal Transplantation

C. Courivaud^{a,b,c,d}, J. Bamoulid^{a,b,c,d}, A. Loupy^e,
M. Deschamps^{a,b,c,f}, C. Ferrand^{a,b,c,f},
D. Le Corre^{g,h}, P. Tiberghien^{a,b,c,f,i},
J.-M. Chalopin^{a,b,c,d,i}, C. Legendre^e,
E. Therivet^e, P. Saas^{a,b,c,f} and D. Ducloux^{a,b,c,d,i,*}

^aINSERM, UMR645, F-25020, Besançon, France

^bUniversité de Franche-Comté, IFR133, F-25020, Besançon, France

^cEtablissement Français du Sang, Besançon, F-25020, France

^dCHU Saint Jacques, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, F-25030, Besançon, France

^eCHU Necker, Department of Renal Transplantation, 149 rue de Sèvres 75743 Paris cedex 15, France

^fEtablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté, Plateforme de Biomonitoring, CIC Biothérapie 506, F-25020, Besançon, France

^gUniversité Paris Descartes, Paris, France

^hINSERM UMR-S 775 Centre Universitaire des Saints-Pères, 45 rue des Saints-Pères, 75006, Paris, France

ⁱCHU Saint Jacques, CIC Biothérapies 506, F-25030, Besançon, France

* Corresponding author: Didier Ducloux, dducloux@chu-besancon.fr

A G→C polymorphism has been identified in the human *cyclooxygenase-2 (COX-2)* gene promoter at position –765 with C allele leading to a decreased promoter activity with low prostaglandin E2 (PGE2) production. PGE2 has strong immunomodulatory properties that could influence graft survival. We studied the association between this polymorphism and allograft failure in two independent cohorts of renal transplant recipients (RTRs) including a total of 603 patients. The functional effect of *COX-2* gene promoter polymorphism was analyzed by measuring serum levels of PGE2. Median follow-up was 8.7 and 7.9 years for the first and second cohort, respectively. Analysis of 603 patients identified 20 CC (3.3%), 179 GC (29.7%) and 404 GG (67%) carriers. Patients with the GG genotype had significantly higher serum PGE2 concentrations than patients with the C allele. Carriers with a C allele have an independent increased risk of graft loss (hazard ratio (HR) 2.43 [95% CI 1.19–4.97], $p = 0.015$ for cohort 1; HR 1.72 [95% CI 0.99–3.77], $p = 0.051$ for cohort 2) compared to GG patients. *COX-2* gene promoter polymorphism at position –765 (G→C) is associated with a

higher rate of graft loss in RTRs. Such findings may be used to influence immunosuppressive strategies and optimize patient management.

Key words: Kidney allograft, gene polymorphism, graft failure

Received 30 April 2009, revised 08 July 2009 and accepted for publication 22 July 2009

Introduction

Despite advances in the prevention of acute rejection, long-term outcomes after kidney transplantation have only modestly improved during the last years. Indeed, survival rates remain quite stable with only 50% of kidney from deceased donor still functioning 10-year posttransplant (1). The leading cause of allograft failures is chronic allograft nephropathy (CAN), a complex phenomenon characterized by progressive renal dysfunction, chronic interstitial fibrosis, tubular atrophy, vascular occlusive changes and glomerulosclerosis (2,3).

Although the precise nature that initiates and maintains CAN is not fully understood, recent studies suggest that persistent inflammation in sequential biopsies may be a major determinant for the subsequent development of CAN and the worse outcome of the graft (3,4). As a consequence, the propensity to induce an antiinflammatory response after the cumulative burden of sequential injuries to the renal allograft (ischemia-reperfusion, acute rejection) could be associated with a better graft survival.

The cyclooxygenase-2 (*COX-2*) enzymatic pathway is induced during inflammatory responses (5). A frequently occurring functional G→C polymorphism has been identified in the human *COX-2* gene promoter at position –765 with C allele leading to a decreased promoter activity with low prostaglandin E2 (PGE2) production (6). PGE2 has a strong immunomodulatory activity (5) and previous studies have shown that it significantly inhibited allograft rejection in animal transplantation (7–9). We postulated that a greater capacity to produce PGE2 may redirect the inflammatory process toward a regulatory process leading to tissue repair.

Here, we studied the association between *COX-2* gene promoter polymorphism and allograft failure. Our working hypothesis was that a renal transplant recipient (RTR) carrying the C allele and consequently reduced PGE2 production could experience more graft failure due to the loss of the beneficial immunomodulatory activity of PGE2.

Methods

Study design and population

We conducted a genetic study to assess whether the *COX-2* gene promoter polymorphism at position -765 (G→C) may be a risk factor for graft loss.

This hypothesis was first generated by the exploratory analysis of a first cohort of RTRs from the Saint Jacques University Hospital in Besançon (France), and then validated in a second verification cohort of RTRs from the Necker Hospital in Paris (France).

Between June 1988 and December 2004, 597 adults underwent renal transplantation at Saint Jacques Hospital in Besançon. DNA was available in 365 patients (61%). These 365 individuals did not differ significantly from the not evaluated patients transplanted during the same period and for whom DNA was not available (data not shown).

A duplicate independent cohort was subsequently assembled and comprised 238 patients with DNA available from the 1080 adult recipients having received a renal transplant at Necker University Hospital in Paris between April 1986 and July 2003. These 238 individuals did not differ significantly from the nonevaluated patients transplanted during the same period and for whom DNA samples were not available (data not shown).

The study design was approved by the Research Ethics Committee of Saint Jacques Hospital and all patients have received written information for DNA studies. Patients were not required to give consent, because their anonymity was maintained but could deny participation after having received written information. The authors were responsible for the study design, data collection and analysis and manuscript preparation.

Immunological and nonimmunological risk factors for graft loss such as donor age, number of HLA mismatches, pretransplant panel reactive antibodies (0 vs. positive panel reactive antibodies (PRA) at any level), transplant number (first vs. second or more) dialysis duration before transplantation, delayed graft function (DGF) (defined by the need of at least one dialysis after transplantation) and acute rejection episodes were analyzed as covariates. Only Caucasian individuals were included in the study. RTRs who had received a kidney from a living donor were excluded from the study. A large majority of patients in the two cohorts received a sequential quadruple immunosuppression with antibody induction, steroids, anticalcineurin and either azathioprine (AZA) or mycophenolate mofetil (MMF).

DNA extraction and analysis of *COX-2* gene promoter polymorphism at position -765 (G→C)

Genomic DNA (gDNA) was obtained by standard salting out method from peripheral blood leukocytes of patients studied. Analysis of the *COX-2* gene promoter loci was then studied using a PCR-based genotyping assay (10). Briefly, in this assay, primers were designed to create a restriction enzyme recognition site only in the wild-type allele. Primer sequences are the following (sense primers are indicated first): 5'-CCGCTTCCTTTGTCCATCAG-3' and 5'-GGCTGTATATCTGCTCTATATGC-3'. Thus, after PCR amplification of the polymorphism regions of interest (306 bp in length), PCR products were overnight digested with *Acl*I restriction endonuclease (New Eng-

land Biolabs, Beverly, MA), according to the conditions recommended by the supplier. Digestion products were then separated by a 2% standard agarose gel electrophoresis. Digested PCR products of homozygous wild-type DNA were 188 and 118 bp in length (GG). Three sizes of band (digested and undigested) were present in heterozygous DNA (GC). One size of band (undigested) was present in muted homozygous DNA (CC). For each PCR, negative control (PCR amplification without gDNA) was included. Researchers and laboratory personnel had no access to identifiable information and could identify samples by number only.

Relation between the *COX-2* gene promoter polymorphism and serum PGE2 levels

The functional validation of *COX-2* gene promoter polymorphism was studied only in the first cohort (n = 62 patients) due to available frozen serum in this cohort. The functional effect of *COX-2* gene promoter polymorphism was analyzed by measuring serum levels of PGE2. PGE2 was measured with high-sensitivity ELISA kits (R&D Systems, Lille, France) according to the manufacturer's instructions. PGE2 secretion profile was determined according to the genotype of the promoter (GG, GC, CC). Serums of 62 patients obtained in the first 6 months of transplantation were thawed. After thawing, patient serums were plated and read at 405 nm by spectrophotometer (ELx800UV; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT).

Statistical analysis

Arithmetic means were calculated and expressed \pm standard deviation (SD). Circulating PGE2 concentrations were not normally distributed and their values in the three different genotypes were compared using the Kruskal-Wallis test. Differences in circulating PGE2 values between GG and C carriers were evaluated by the Mann-Whitney test. For normally distributed variables, C carriers and GG carriers were compared using the χ^2 -test for dichotomic variables and the Student's *t*-test for continuous variables. Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for the genotype distribution. Relationships between numerical variables were evaluated with the Spearman/Pearson rank test.

Using log-rank tests on Kaplan-Meier nonparametric estimates of the survival without death-censored graft loss distribution, variables with a *p*-value lower than, or equal to, 0.20 were selected. Time of transplant (1988-1995) or (1996-2002) was used as a covariate. The selected variables were included into a Cox proportional hazards model and a backward stepwise selection process was performed, this time with $\alpha = 0.05$. Results are expressed as relative risk (RR) and 95% confidence interval (CI), with a *p*-value testing the null hypothesis: RR = 1. Therefore, when *p*-value is less than 0.05, RR is significantly different from 1, either greater than 1 (i.e., risk of graft loss is increased) or less than 1 (i.e., risk of graft loss is decreased). Assumptions of Cox models (log-linearity, proportionality of risk in time) were met in this analysis.

Results

Study population

Characteristics of both cohorts are summarized in Table 1.

Cohort 1: Three hundred and sixty-five patients were followed for a median duration of 8.7 years after transplantation. Mean age was 47 ± 13.5 years, and 228 RTR (62.5%) were men. Mean dialysis duration was 17.7 ± 23.6 months. Mean number of HLA mismatches was 3.6 ± 1.1 . Eighty-eight percent of the patients were recipients of a first transplant and 11% exhibited a positive PRA. There

Table 1: Clinical characteristics of the two cohorts

	Cohort 1			Cohort 2		
	CC + GC	GG	p	CC + GC	GG	p
Age (years)	47 ± 14	47 ± 14	NS	43 ± 13	46 ± 13	NS
Gender (%)	62	63	NS	54	57	NS
Dialysis duration (months)	18 ± 16	18 ± 17	NS	34 ± 19	29 ± 21	NS
Donor age (years)	43 ± 15	44 ± 16	NS	45 ± 14	44 ± 15	NS
HLA mismatches	3.6 ± 1	3.7 ± 1.1	NS	2.6 ± 1.1	2.5 ± 1.1	NS
PRA (% patients with positive PRA)	11	12	NS	14	16	NS
First transplant (%)	87	89	NS	77	84	NS
DGF (%)	20.1	16.9	NS	23.3	22.3	NS
Acute rejection (%)	23.2	19.2	NS	25.7	25.2	NS
Graft failure (%)	16.9	8.5	0.005	20.3	15.2	0.042

DGF = delayed graft function; PRA = panel reactive antibodies.

was no difference in the timing of transplant between the wild-type group and those with the C allele.

Cohort 2: Two hundred and thirty-eight patients were followed for a median duration of 7.9 years after transplantation. Mean age was 45 ± 12.5 years, and 134 (56.3%) were men. Compared to cohort 1, mean dialysis duration was longer in cohort 2 (31.2 ± 43.7 months; $p = 0.017$) and mean number of HLA mismatches was lower (2.6 ± 1.1; $p = 0.028$). Eighty-two percent of the patients were recipients of a first transplant and 15% exhibited a positive PRA. The rate of first transplant was lower in the second cohort ($p = 0.052$). There was no difference in the timing of transplant between the wild-type group and those with the C allele.

In the two cohorts, mean follow-up was similar in patients with the different genotypes (data not shown).

Analysis of the COX-2 gene promoter polymorphism frequencies in RTR

The frequencies of the different genotypes are described in Table 2. Briefly, there was no difference in the distribution of the three genotypes in the two cohorts. The observed allele frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium.

We analyzed the ratio (C carriers/C carriers + GG patients) in early grafts (1988–1995) and late grafts (1996–2002). In the first cohort, the ratios were 36% and 34%, respectively. The ratios were 31% and 31% in the second cohort.

Table 2: COX-2 gene promoter polymorphism frequencies in the two cohorts

Genotype	Cohort 1 n (%)	Cohort 2 n (%)
CC	15 (4.1)	5 (2.2)
GC	110 (30.2)	69 (28.9)
GG	240 (65.7)	164 (68.9)
Total	365 (100)	238 (100)

Relation between the COX-2 gene promoter polymorphism and serum PGE2 levels

Serum PGE2 concentrations were measured in 62 RTR (GG genotype 33; GC genotype 17; CC genotype 12). Serum samples collected during the first 6 months posttransplant were selected with the aim to test the maximum of RTR with CC genotype (in relation with the low frequency of this genotype). Characteristics of these patients are depicted in Table 3. Patients with the GG genotype had significantly higher serum PGE2 concentrations than patients with the C allele (median values and range were 1111 pg/mL [441–3787], 1026 pg/mL [518–6868], 2541 pg/mL [483–10327] in CC, GC and GG carriers, respectively; $p = 0.0003$). Because the C allele appeared to have a dominant effect, C carriers (both CC and CG) were subsequently compared to GG carriers. Because MMF has been reported to diminish PGE2 levels (11), we also analyzed PGE2 according to MMF administration. We did not observe any difference in PGE2 levels between patients receiving or not receiving MMF (data not shown).

Relation between the COX-2 gene promoter polymorphism and death-censored graft lost

Cohort 1: Graft loss occurred in 43 patients (11.8%); 21 (16.9%) in C carriers and 22 (8.5%) in GG patients. This corresponds to 16 graft losses for 1000 patients/year in C carriers and 9 for 1000 patients/year in GG patients. Median time to graft loss was marginally shorter in C carriers (1550 days (2–9228) vs. 2050 days (0–6118); $p = 0.125$). Survival according to COX-2 gene promoter polymorphism is depicted in Figure 1.

In univariate analysis, DGF ($p = 0.001$) and acute rejection ($p = 0.005$) as well as the C allele ($p = 0.005$) were associated with graft loss.

Cox regression analysis revealed that DGF (hazard ratio (HR) 2.85 [95% CI 1.33–6.12], $p = 0.007$), acute rejection (HR 2.34 [95% CI 1.09–4.99], $p = 0.029$) and C allele (HR 2.43 [95% CI 1.19–4.97], $p = 0.015$) were independent risk factors for graft loss (Table 4).

Table 3: Clinical characteristics of patients with PGE2 levels determinations

	CC (n = 12)	GC (n = 17)	GG (n = 33)	p
Age (years)	48 ± 14	46 ± 14	47 ± 14	NS
Gender (%)	59	65	67	NS
Dialysis duration (months)	19 ± 15	18 ± 16	18 ± 17	NS
Donor age (years)	44 ± 19	45 ± 18	42 ± 17	NS
HLA mismatches	3.5 ± 1.4	3.2 ± 1.3	3.6 ± 1.2	NS
DGF (%)	25	24	21	NS
Acute rejection (%)	17	24	21	NS
Graft failure (%)	17	18	9	NS

PGE2 = prostaglandin E2; DGF = delayed graft function.

Cohort 2: Graft lost occurred in 42 patients (17.6%) of RTR during follow-up: 15 (20.3%) in C carriers and 27 (15.2%) in GG patients. This corresponds to 26 graft losses for 1000 patients/year in C carriers and 19 for 1000 patients/year in GG patients. Median time to graft loss was shorter in C carriers (1412 days (1–3615) vs. 2373 days (0–7233); $p = 0.045$). Survival according to *COX-2* gene promoter polymorphism is depicted in Figure 2.

In univariate analysis, DGF ($p = 0.037$), iterative transplant ($p = 0.079$), positive PRA ($p = 0.162$) and acute rejection episodes ($p = 0.008$) were associated with graft lost. C carriers also have an increased risk of graft loss ($p = 0.042$).

Cox regression analysis revealed that DGF (HR 2.22 [95% CI 1.09–4.80], $p = 0.041$) and acute rejection (HR 2.48 [95% CI 1.14–4.27], $p = 0.025$) were independent risk factors for graft lost. There was a strong trend toward an increased risk of graft loss in patients carrying the C allele (HR 1.72 [95% CI 0.99–3.77], $p = 0.051$) (Table 4).

In the whole study population (cohort 1 + 2), the C allele conferred an independent increased risk of graft loss (HR 2.17 [95% CI 1.21–4.63], $p = 0.008$).

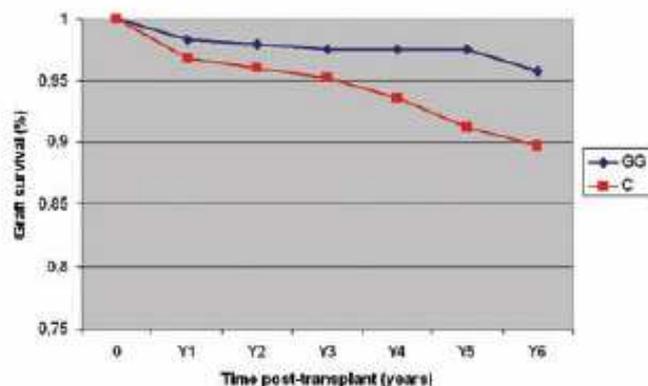


Figure 1: Death-censored graft survival according to the *COX-2* gene promoter polymorphism (cohort 1).

Discussion

Our study establishes that a *COX-2* gene promoter polymorphism at position -765 (G→C) is associated with a higher rate of graft loss in RTRs. More precisely, we demonstrate that C carriers have lower serum PGE2 levels in a transplantation setting and, most importantly, a decreased graft survival. The effect of the mutation on graft survival was observed in two independent cohorts. Indeed, even when the association between *COX-2* polymorphism and graft loss is not statistically significant in the second cohort, we observed a very strong trend toward significance ($p = 0.051$). So, we believe that the results obtained in the second cohort are clinically significant and do confirm those of the first cohort. Methodological standardization is mandatory in single nucleotide polymorphism studies. A plausible hypothesis, the biological relevance of the polymorphism and a confirmation of the results in a separate independent cohort are indispensable prerequisite in such studies (12). All these essential conditions are met in this study.

Prostaglandin E2 is one of the major products of cyclooxygenase-initiated arachidonic acid metabolism.

Prostaglandin E2 has immunomodulatory activity within the immune system and can have both systemic, paracrine, and autocrine effects (5). PGE2 binds to the G protein-coupled receptor EP2 and EP4 and effectively suppresses T-cell immune responses by eliciting a cAMP/Csk inhibitory pathway (13,14). Thus, PGE2 is one of the most Treg-promoting factors and has been described as a potent modulator of both inflammation and immune responses. PGE2 is a strong inhibitor of IL-12, IL-18 and IFN- γ production (15,16) and a potent inducer of IL-10 synthesis (17,18). With regard to the role of IL-10, it is known that IL-10 is an antiinflammatory cytokine and exhibits a potent suppressor effect against *COX-2* expression which is a proinflammatory signal. In these contexts, it is likely that IL-10 enhanced by high levels of PGE2 stimulation negatively modulates inflammation when *COX-2* is overexpressed at the inflammatory site. Moreover, *in situ* processing of *COX-2* overexpressing dendritic cells induces a

Table 4: Cox model: hazard ratio (HR) of graft loss and 95% confidence intervals (CIs)

	Cohort 1			Cohort 2		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Acute rejection	2.34	1.09–4.99	0.029	2.48	1.14–4.27	0.025
DGF	2.85	1.33–6.12	0.007	2.22	1.09–4.80	0.041
C allele ¹	2.43	1.19–4.97	0.015	1.72	0.99–3.77	0.051

¹Versus GG patients.
DGF = delayed graft function.

tolerogenic T-cell response by means of generating a Tr1 response (18).

More recently, it has been shown that inhibition of the COX-2/PGE2 axis suppresses regulatory T-cell (Treg) activity and enhances antitumor responses (19,20). Finally, a subset of FOXP3+CD4+CD25+ Treg expresses COX-2 and is able to suppress effector T cells by a PGE2-dependent mechanism (21). Thus, we speculated that during acute rejection, COX-2-dependent production of PGE2 by infiltrating dendritic cells could induce a suppressive T-cell response with subsequent resolution of the inflammatory process. The limiting factor of this reaction would be the ability to produce high amounts of PGE2. Additionally, PGE2 could modulate dendritic cells to initiate tolerance against the inciting antigen (22,23).

In animal models, PGE2 may delay or prevent allograft rejection. Both PGE2 and a combination of PGE2 receptors agonists (EP2 to EP4) prolonged skin allograft survival in rats (7). It has also been reported that PGE2 dramatically suppressed kidney and heart rejections in other animal models (8). Interestingly, previous studies have focused on the effects of PGEs in human transplantation settings (24). Moran et al. (24) reported that a PGE1 analog reduced the incidence of acute rejection and improved renal function. We did not find any difference in the rate of acute rejection between C allele carriers and GG patients. In our opinion, PGE2 is essential to control the inflammatory pro-

cess during and after acute rejection, but is not directly implicated in the occurrence of acute rejection.

For a genetic test to be relevant in clinical management, it is obviously critical that the test has additional predictive power over and above the presently available and easily assessable risk factors. We found that COX-2 promoter genotype significantly adds significantly to the power of some of the strongest predictors of graft loss. Because approximately one third of RTR carries the allele C, it is likely that the pretransplant determination of COX-2 promoter genotype might offer the opportunity to modulate the immunosuppressive treatment and optimize the monitoring in a substantial proportion of the transplant population.

The design of the study may have introduced a selection bias. Even though no significant differences could be identified between included and nonincluded patient, we cannot exclude a preferential selection of low-risk recipients regarding graft failure. Indeed, the main causes of DNA unavailability are death and graft loss. Nevertheless, if true, such limitation should favor the null hypothesis, and not contribute to a false positive result. It should be noted that the observed frequency of the C allele is quite similar to those observed in other studies including Caucasian people (6,10). However, because significance is not reached in the second cohort, results should probably be confirmed in a larger study. Several factors may explain why the results are less significant in the second cohort than in the first cohort. First, the number of patients is lower (because of DNA availability and restriction of the analysis to Caucasians) and the follow-up slightly shorter in the second cohort. Second, the frequency of the C allele is lower in the second cohort. All these points may have contributed to reducing the power of the study in the second cohort.

Overall, COX-2 gene promoter polymorphism at position –765 (G→C) is associated with a higher rate of graft loss in RTRs. Future studies should examine the exact mechanism of this association and determine whether intensification of immunosuppression or use of EP2/EP4 agonists may be useful in C allele carriers.

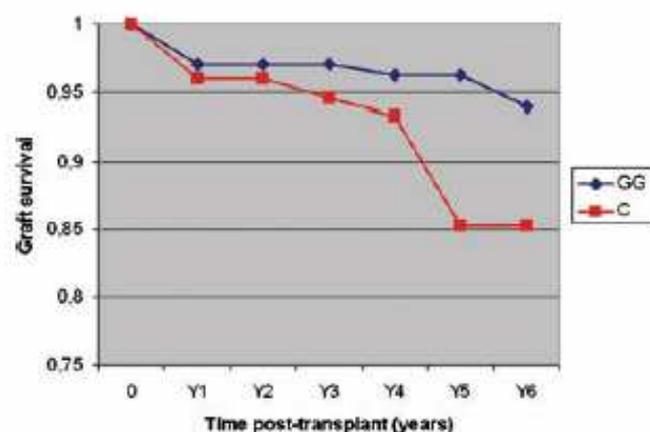


Figure 2: Death-censored graft survival according to the COX-2 gene promoter polymorphism (cohort 2).

Acknowledgments

The authors thank Christine Colombain, Cédric Didier and Eléonore Gravelin for patient sample collection and technical assistance.

This study is supported by grants from the Fondation Transplantation, the Etablissement Français du Sang (Appel d'offres 2003), the Fondation de France (Appel d'offre Maladies Cardiovasculaires 2007, to P.S.) and the DHOS/INSERM/INCa (Appel d'offre Recherche Translationnelle 2008, to D.D. and P.S.). C.C. received financial support from the Fondation Transplantation (#ET031211 and #ET050320, respectively).

References

- 2004 annual report of the U.S. organ procurement and transplantation network and the scientific registry of transplant recipients. Transplant data 1994–2003. Rockville, MD. Health Resources and Services Administration, Division of Transplantation, 2004.
- Jevnikar AM, Mannon RB. Late kidney allograft loss: What we know about it, and what we can do about it. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: S56–S67.
- Bosmans JL, Ysebaert DK, Verpooten GA. Chronic allograft nephropathy: What have we learned from protocol biopsies? *Transplantation* 2008; 85: S38–S41.
- Mengel M, Gwinner W, Schwarz A et al. Infiltrates in protocol biopsies from renal allografts. *Am J Transplant* 2007; 7: 356–365.
- Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: Modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* 2001; 108: 15–23.
- Cipollone F, Tonisto E, Martinotti S, Fazio M, Iezzi A, Cuccurullo C. A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke. *JAMA* 2004; 291: 2221–2228.
- Fujimoto Y, Iwagaki H, Ozaki M et al. Involvement of prostaglandin receptors (EP2–4) in in vivo immunosuppression of PGE2 in rat skin transplant model. *Int Immunol* 2005; 5: 1131–1139.
- Strom TB, Carpenter CB. Prostaglandin as an effective antirejection therapy in rat renal allograft recipients. *Transplantation* 1983; 35: 279–281.
- Kamei TM, Callery P, Flye MW. Intra-graft delivery of 16, 16-dimethyl PGE2 induces donor-specific tolerance in rat cardiac allograft recipients. *Transplantation* 1991; 51: 242–246.
- Papafili A, Hill MR, Brull DJ et al. Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: Evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1631–1636.
- Blaheta RA, Nelson K, Oppermann E et al. Mycophenolate mofetil decreases endothelial prostaglandin E2 in response to allogeneic T cells or cytokines. *Transplantation* 2000; 69: 1977–1981.
- Freely associating. *Nat Genet* 1999; 22: 1–3.
- Nataraj C, Thomas DW, Tilley SL et al. Receptors for prostaglandin E2 that regulate cellular immune responses in the mouse. *J Clin Invest* 2001; 108: 1229–1235.
- Vang T, Abrahamsen H, Myklebust S, Horejsi V, Tasken K. Combined spatial and enzymatic regulation of Csk by cAMP and protein kinase A inhibits T cell receptor signalling. *J Biol Chem* 2003; 278: 17597–17600.
- Van Der Pouw Kraan TC, Boeijs LC, Smeenk RJ, Wijdens J, Arden LA. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin-12 production. *J Exp Med* 1995; 181: 775.
- Takahashi HK, Iwagaki H, Yoshino T, Mori S, Morichika T et al. Prostaglandin E2 inhibits IL-18-induced ICAM-1 and B7.2 expression through EP2/EP4 receptors in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 2002; 168: 4446–4454.
- Straussmann GV, Koota P, Finkelman F, Fong M, Kambayashi T. Evidence for the involvement of interleukin-10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by PGE2. *J Exp Med* 1994; 180: 2365.
- Harizi H, Juzan M, Pitard V, Moreau JF, Gualde N. Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin E2 enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J Immunol* 2002; 168: 2255–2263.
- Sharma S, Yang S-C, Zhu L et al. Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of Foxp3 expression and CD4+CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 5211–5218.
- Baratelli F, Lin Y, Zhu L et al. Prostaglandin E2 induces FoxP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J Immunol* 2005; 175: 1483–1490.
- Yaqub S, Johansson CC, Tasken K, Aandahl EM. FOXP3+ CD4+ CD25+ adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *J Immunol* 2006; 177: 246–254.
- Akasaki Y, Liu G, Chung NHC, Ehtesham M, Black KL, Yu JS. Induction of a CD4+ T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma. *J Immunol* 2004; 173: 4352–4359.
- Okano M, Sugata Y, Fujiwara T et al. E prostanoicid 2 (EP2)/EP4-mediated suppression of antigen-specific human T-cell responses by prostaglandin E2. *Immunology* 2006; 118: 343–352.
- Moran M, Mozes MF, Maddux MS et al. Prevention of acute graft rejection by the prostaglandin E1 analogue misoprostol in renal-transplant recipients treated with cyclosporine and prednisone. *N Engl J Med* 1990; 322: 1183–1188.

Article n°5

Influence of *Cyclooxygenase-2 (COX-2)* gene promoter polymorphism at position -765 on skin cancer after renal transplantation

2009

La sur-expression de COX-2 représente une voie signalétique majeure de la carcinogenèse cutanée (**Einspahr JG et al. 2002**). A l'état physiologique, COX-2 est détectée à des taux faibles uniquement au niveau des zones de différenciation de l'épiderme. En revanche, elle est fortement exprimée dans les kératoses actiniques et les carcinomes baso- et spinocellulaires. Le celecoxib (anti-inflammatoire non stéroïdien [AINS], inhibiteur spécifique de COX-2) et l'indométacine (AINS non spécifique) exercent un effet inhibiteur sur la carcinogenèse cutanée induite par les rayons UV chez l'animal (**Fischer SM et al. 1999, Pentland AP et al. 1999**). Le flosulide et le NS398, inhibiteurs de COX-2, inhibent la croissance des lignées cellulaires de carcinomes spinocellulaires humains (**Higashi Y et al. 2000**).

La seule étude en transplantation rénale s'étant intéressée à ce polymorphisme est celle de Lira et al n'objectivant qu'une tendance à un rôle protecteur de l'allèle C sur le risque de cancers cutanés (baso- et spinocellulaires uniquement) pour les patients transplantés rénaux de moins de 50 ans (**Lira MG et al. 2007**).

Dans l'article suivant nous avons donc étudié l'influence du polymorphisme du promoteur en position -765 G/C de COX-2 sur la survenue de cancers cutanés après transplantation rénale.

Influence of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Gene Promoter Polymorphism at Position –765 on Skin Cancer after Renal Transplantation

Journal of Investigative Dermatology advance online publication, 6 May 2010; doi:10.1038/jid.2010.116

TO THE EDITOR

Skin cancer is the most prevalent cancer in humans, and its incidence is 4–20 times higher in renal transplant recipients (RTRs; Grulich *et al.*, 2007) than in immunocompetent subjects, reaching an estimated incidence of 40–75% 20 years after transplantation (Moloney *et al.*, 2006). Hyperexpression of cyclooxygenase 2 (COX-2) catalyzes the first step in the synthesis of prostaglandins, which may then function as tumor promoters or enhance initiation as oxidants (Rundhaug and Fischer, 2008). Furthermore, prostaglandin E2 (PGE2) induces *FOXP3* gene expression and T regulatory cell function in human CD4⁺ T cells (Baratelli *et al.*, 2005), which may contribute to the immune escape of UV-mutated clones and ultimately lead to skin cancer (Beisert and Schwarz, 2009). A frequently occurring functional G→C polymorphism has been identified in the human COX-2 gene promoter at position –765, with the C allele leading to a decreased promoter activity with low PGE2 production (Papafili *et al.*, 2002; Müller-Decker and Fürstenberger, 2007).

We conducted a study to investigate the association of the COX-2 gene promoter polymorphism at position –765 with skin cancers in RTRs. Our working hypothesis was that RTRs carrying the C allele and consequently exhibiting reduced PGE2 production could experience less skin cancer due to the loss of the PGE2-promoting activity.

STUDY DESIGN AND POPULATION

Two cohorts of RTRs were investigated, including 365 patients from Besançon and 238 patients from Paris. The study design was approved by the research ethics committee of Besançon University Hospital, and all patients provided written informed consent before enrollment. The study adhered to the Declaration of Helsinki protocols. Skin cancer history was analyzed as a covariate.

DNA EXTRACTION AND ANALYSIS OF COX-2 GENE PROMOTER POLYMORPHISM AT POSITION –765 (G→C)

Genomic DNA (gDNA) was obtained from peripheral blood leukocytes. Analysis of the COX-2 gene promoter loci was done using a PCR-based genotyping assay (Papafili *et al.*, 2002; Courivaud *et al.*, 2009). Primer sequences used were 5'-CCGCTTCCTTGTCCATCAG-3' and 5'-GGCTGTATCTGCTCTATATGC-3'. After PCR amplification of the polymorphism regions of interest (306 bp in length), the products were digested overnight with *Acil* restriction endonuclease (New England Biolabs, Beverly, CA). After separation by a 2% standard agarose gel electrophoresis, the digested PCR products of homozygous wild-type DNA were 188 and 118 bp in length (GG). Bands of three sizes (digested and undigested) were present in heterozygous DNA (GC). One band size (undigested) was present in muted homozygous DNA (CC). For each PCR, a negative control (PCR amplification without gDNA) was included.

The functional characterization of this COX-2 gene promoter polymorphism was validated in 62 RTRs in a previous study (Courivaud *et al.*, 2009) by measuring circulating PGE2 levels using a highly sensitive ELISA kit (R&D Systems, Lille, France).

STATISTICAL ANALYSIS

For normally distributed variables, C carriers and GG carriers were compared using the χ^2 test for dichotomic variables and Student's *t* test for continuous variables. Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for the genotype distribution.

STUDY POPULATION

Three hundred and sixty-five patients from Besançon (cohort 1) were followed up for a mean duration of 9.5 ± 10 years after transplantation. The mean age at transplantation was 47 ± 13.5 years, and 228 RTRs (62.5%) were men. Skin cancers occurred in 28 patients (7.7%), which included 11 cases of squamous cell carcinoma (SCC), 13 cases of basal cell carcinoma (BCC), 3 cases of both SCC and BCC, and 1 case of melanoma. Two hundred and thirty-eight patients from Paris (cohort 2) were followed up for a mean duration of 8.5 ± 3.7 years after transplantation. The mean age at transplantation was 45 ± 12.5 years, and 134 (56.3%) were men. Skin cancer occurred in 16 patients (6.7%), which included 5 cases of SCC, 7 cases of BCC, 3 cases of both SCC and BCC, and 1 case of melanoma.

RELATION BETWEEN THE COX-2 GENE PROMOTER POLYMORPHISM AND SKIN CANCER

Briefly, there was no difference in the distribution of the three genotypes in

Abbreviations: BCC, basal cell carcinoma; CI, confidence interval; COX-2, cyclooxygenase 2; gDNA, genomic DNA; HR, hazard ratio; PGE2, prostaglandin E2; RTR, renal transplant recipient; SCC, squamous cell carcinoma

Table 1. Genotype distribution of COX-2 polymorphism at position -765 in RTR patients

Patients	CC and CG (%)	GG (%)
Cohort 1 (Besançon)	125 (34.2)	240 (65.7)
No skin cancer	113 (90.4)	224 (93.3)
Skin cancer	12 (9.6)	16 (6.7)
Cohort 2 (Paris)	74 (31)	164 (69)
No skin cancer	69 (93.2)	153 (93.3)
Skin cancer	5 (6.7)	11 (6.7)
Cohorts 1 and 2	199 (33)	404 (67)
No skin cancer	182 (91.4)	377 (93.3)
Skin cancer	17 (8.5)	27 (6.7)

the two cohorts (Table 1). The observed allele frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium. In cohort 1, among the RTRs with skin cancer, 12 patients (9.6%) were C carriers and 16/240 (6.7%) were GG patients. In cohort 2, among the RTRs with skin cancer, 5 patients (6.7%) were C carriers and 11 (6.7%) were GG patients. Statistical analysis showed no difference between the genotypic distribution of RTRs presenting with skin cancer and the genotypic distribution of those without a history of skin cancer. In univariate analysis, only age at transplantation ($P=0.008$ and $P=0.021$, respectively) was associated with skin cancer. Cox regression analysis revealed that age at transplantation (hazard ratio (HR) 1.51; 95% confidence interval (CI) 1.33–2.45 and HR 1.39; 95% CI 1.12–1.85) was the only independent risk factor for skin cancer ($P=0.011$ and $P=0.034$, respectively).

CONCLUSION

We did not observe any significant difference in the genotype distribution of COX-2 gene promoter polymorphism in RTRs between those with and those without skin cancer. Both C and GG carriers were predominant in RTRs without a history of skin cancer and, conversely, less common among RTRs with skin cancer. We previously demonstrated that C carriers have lower serum PGE2 levels in a transplantation setting (Courivaud *et al.*, 2009).

Our study does not confirm previous results, suggesting the protective effect of the COX-2 gene promoter poly-

morphism at position -765 for BCC in RTRs (Lira *et al.*, 2007). However, this protective effect showed significance only in a subgroup of individuals (BCC patients who underwent transplantation before 50 years of age).

The discrepancy with our data might be explained by several hypotheses. First, we cannot exclude a limited statistical power due to the small number of BCC cases in our study (5 BCC cases among 26 patients <50 years of age). This is a significant concern because our statistical power calculation indicated that we would require at least 5 times this number of cases to detect a true effect size of ≤ 2.0 . For the difference observed in our study (GG versus CC and CG), this demonstration would require two cohorts comprising 6,322 RTRs—i.e., 12,644 RTRs—to demonstrate a risk below 2. Second, the effects of polymorphisms can vary from tissue to tissue, especially for inducible genes such as COX-2 (Szczyklik *et al.*, 2004), through the loss of an Sp1 transcription binding site induced by the -765C variant along with the creation of a binding site for E2F, which is a cyclin-dependent regulator of expression of several genes (Papafili *et al.*, 2002). Third, the potentially protective effect of the -765C allele may be abolished by the additive effects of other risk factors, such as human papillomavirus infection and UV exposure. Indeed, COX-2 -765C gene promoter polymorphism was associated with an increased risk of colorectal cancer (Xing *et al.*, 2008) or peptic ulcer

disease (Saxena *et al.*, 2008) only in the presence of smoking and a high body mass index or *Helicobacter pylori* infection, respectively.

In conclusion, despite the weak statistical power, our data suggest that the COX-2 genotype does not represent a major risk factor for skin cancer in RTRs. However, given our small case numbers, we cannot exclude the possibility that this genotype may have a minor role in a subgroup of patients.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Christine Colombain, Cédric Didier, and Eléonore Gravelin for collecting the patient samples and for their technical assistance. This study is supported by grants from the Fondation Transplantation, the Fondation de France (Appel d'offre Maladies Cardiovasculaires 2007, to PS), and the DHOS/INSERM/INCa (Appel d'offre Recherche Translationnelle 2008, to DD and PS). CC received financial support from the Fondation Transplantation (#ET-031211 and #ET-050320).

François Aubin^{1,2}, Cécile Courivaud^{3,4}, Jamal Bamoulid^{3,4}, Alexandre Loupy⁵, Marina Deschamps^{3,6}, Christophe Ferrand^{3,6}, Delphine Le Corre^{7,8}, Pierre Tiberghien^{3,6,9}, Jean-Marc Chalopin^{3,4,9}, Christophe Legendre⁵, Eric Thervet⁵, Philippe Humbert^{2,3}, Philippe Saas^{3,6} and Didier Ducloux^{3,4,9}

¹Université de Franche Comté, EA3181, IFR133, Besançon, France; ²Service de Dermatologie, Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, Besançon, France; ³INSERM UMR645, Université de Franche-Comté IFR 133, Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France; ⁴Dialyse et Transplantation Rénale, Service de Néphrologie, Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, Besançon, France; ⁵Service de Transplantation Rénale, Centre Hospitalier Universitaire Necker, Paris, France; ⁶Plateforme de Biomonitoring, Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France; ⁷Université Paris Descartes, Paris, France; ⁸INSERM UMR-S 775 Centre Universitaire des Saints-Pères, Paris, France and ⁹Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, Besançon, France
E-mail: francois.aubin@univ-fcomte.fr

REFERENCES

- Baratelli F, Lin Y, Zhu L *et al.* (2005) Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J Immunol* 175:1483–90

- Beissert S, Schwarz T (2009) Ultraviolet-induced immunosuppression: implications for photocarcinogenesis. *Cancer Treat Res* 146:109-21
- Courivaud C, Bamoulid J, Loupy A et al. (2009) Influence of cyclooxygenase-2 (COX-2) gene promoter polymorphism -765 on graft loss after renal transplantation. *Am J Transplant* 9:2752-7
- Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO et al. (2007) Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 370:59-67
- Lira MG, Mazzola S, Tessari G et al. (2007) Association of functional gene variants in the regulatory regions of COX-2 gene (PTGS2) with nonmelanoma skin cancer after organ transplantation. *Br J Dermatol* 157:49-57
- Moloney FJ, Comber H, O'Lorcain P et al. (2006) A population-based study of skin cancer incidence and prevalence in renal transplant recipients. *Br J Dermatol* 154:498-504
- Müller-Decker K, Fürstenberger G (2007) The cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin signaling is causally related to epithelial carcinogenesis. *Mol Carcinog* 46:705-10
- Papafili A, Hill MR, Brull DJ et al. (2002) Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1631-6
- Rundhaug JE, Fischer SM (2008) Cyclo-oxygenase-2 plays a critical role in UV-induced skin carcinogenesis. *Photochem Photobiol* 84:322-9
- Saxena A, Prasad KN, Ghoshal UC et al. (2008) Polymorphism of -765G > C COX-2 is a risk factor for gastric adenocarcinoma and peptic ulcer disease in addition to H pylori infection: a study from northern India. *World J Gastroenterol* 14:1498-503
- Szczeklik W, Sanak M, Szczeklik A (2004) Functional effects and gender association of COX-2 gene polymorphism G-765C in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114:248-53
- Xing LL, Wang ZN, Jiang L et al. (2008) Cyclooxygenase 2 polymorphism and colorectal cancer: -765G>C variant modifies risk associated with smoking and body mass index. *World J Gastroenterol* 14:1785-9

III/ Discussion concernant ces 3 articles

La 1^{ère} étude rapportée ci-dessus n'objective pas de relation entre le polymorphisme du promoteur du gène de COX-2 en position -765 G/C et la survenue d'événements athéromateux après transplantation rénale. Plusieurs études attribuent un rôle néfaste au génotype GG, fort inducteur de la voie COX-2, sur la survenue d'événements athéromateux. Ces données peuvent paraître contradictoires avec celles issues des études montrant une augmentation des événements athéromateux chez les patients suivant un traitement par coxib (AINS inhibiteur sélectif de COX-2) (**Bombardier C et al. 2000, Silverstein FE et al. 2000**). Ces mêmes observations sont décrites chez l'animal avec l'accélération des lésions d'athérosclérose chez des souris apoE^{-/-} après 3 semaines de traitement par inhibiteur sélectif de COX-2 (**Rott D et al. 2003**). L'acide arachidonique libéré des phospholipides membranaires par l'action de la phospholipase A2 est métabolisé par COX-2 en PGH2. PGH2 est ensuite métabolisée par d'autres isomérases (prostaglandines synthétases (PGS)) en prostanoïdes variés (PGE2, PGD2, PGF2 α , PGI2 et Thromboxane A2) (**Brash AR 2001**). Donc, l'abondance de l'une ou l'autre de ces prostanoïdes est le résultat de l'expression et de l'activité d'une PGS spécifique. Seul l'expression simultanée de COX-2 au niveau des macrophages de la plaque d'athérome et la synthèse de PGE2 conduit à l'augmentation de synthèse de MMP-2 et MMP-9. Ceci est crucial quand on considère que certaines PG, telles que PGD2 et PGI2, peuvent posséder des activités anti-inflammatoires (**Cipollone F et al. 2005**). En effet, PGD synthétase (PGDS) a été identifiée récemment comme un facteur protecteur, réduisant l'incidence des re-sténoses chez les patients ayant bénéficié d'une angioplastie coronarienne trans-luminale per-cutanée. De même, 15d-PGJ2 dérivé de PGDS est considérée comme un inhibiteur de la voie NF- κ B et peut donc exercer des effets anti-inflammatoires (**Inoue T et al. 2001, Cipollone F et al. 2005**). Donc, l'expression prédominante de PGES au détriment de l'expression de PGDS peut influencer, au niveau de la

plaque d'athérome, l'augmentation de phénomènes inflammatoires et donc la rupture de la plaque. Un traitement par inhibiteur de la voie COX-2, chez des patients sélectionnés, présentant une maladie athéromateuse symptomatique, peut alors être bénéfique, car dans cette situation, on peut penser que PGE2 est la PG la plus générée. Dans le cas contraire, c'est-à-dire chez des patients à faible risque ou asymptomatique, PGD2 et PGI2 sont probablement les PG les plus produites. Inhiber la voie COX-2 peut alors être délétère en diminuant la production de ces PG à rôle protecteur au détriment de PGE2, amenant à la déstabilisation de la plaque d'athérome. Les prostanoides sont donc au centre d'une balance "activité inflammatoire"- "activité anti-inflammatoire", synonyme de : "instabilité de la plaque"- "stabilité de la plaque". En fonction de la situation clinique, les inhibiteurs spécifiques de COX-2 semblent donc susceptibles de faire pencher cette balance d'un côté ou d'un autre (Figure 23).

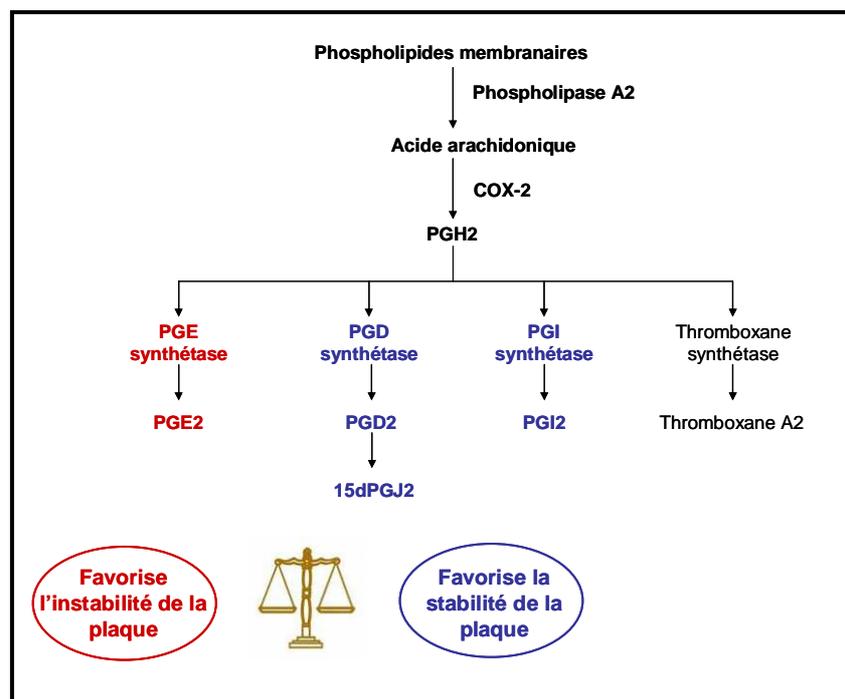


Figure 23: Production et actions des prostanoïdes issus de la voie enzymatique COX-2 (cyclooxygénase-2), illustrant le rôle potentiellement pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire de cette voie.

Basée sur les propriétés immunomodulatrices de PGE2, la 2^{ème} étude montre une relation entre la capacité de production de PGE2 prédite par le polymorphisme -765 G/C du promoteur de *COX-2* et la survie du greffon chez le patient transplanté rénal. En pratique, l'analyse de ce polymorphisme chez les patients transplantés rénaux pourrait donc permettre d'identifier une population à risque accru de perte de greffon et ainsi améliorer leur prise en charge en influençant, par exemple, la stratégie thérapeutique immunosuppressive.

Dans la 3^{ème} étude, nous ne confirmons pas les données de Lira et al. en transplantation rénale, objectivant un rôle protecteur de l'allèle C sur la survenue de cancers cutanés (hors mélanome) dans une population restreinte aux patients transplantés de moins de 50 ans. Cependant la puissance statistique de notre étude est largement grevée par le faible nombre d'événements étudiés (cancers cutanés).

Nous avons réalisé la caractérisation fonctionnelle du polymorphisme du promoteur du gène de *COX-2* par la mesure quantitative de la production de PGE2. Dans ce travail, les dosages sériques réalisés chez 62 patients nous permettent de valider de manière fonctionnelle le polymorphisme du promoteur du gène *COX-2*. Toutefois, l'interprétation des résultats doit être modulée en fonction de différents paramètres médicamenteux tel que, dans notre population, l'utilisation de corticostéroïdes. Les sérums testés sont prélevés à différents temps de la transplantation et les posologies de corticoïdes suivis par ces mêmes patients, sont donc très variables de l'un à l'autre et ont pu modifier les valeurs des dosages réalisés (inhibition de la voie pro-inflammatoire *COX-2* par les corticostéroïdes à fortes doses). La réalisation de différents dosages, soit à J0 de la transplantation, soit à distance suffisante de la transplantation pour que tous les patients suivent une corticothérapie à faible dose, permettrait d'évaluer la réalité de ce biais.

IV/ Polymorphisme du promoteur du gène *COX-2* et insulino-résistance

Nous n'observons pas de relation entre le polymorphisme du promoteur du gène de *COX-2* et l'insulino-résistance après transplantation rénale. Le lien entre insulino-résistance et voie enzymatique *COX-2* pourrait faire intervenir les PPARs. En effet, les PPAR γ jouent un rôle primordial dans le métabolisme des lipides et l'homéostasie du glucose. Leur activation, à l'origine de propriétés anti-inflammatoires, réprime l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF), de gènes précoces de l'inflammation (iNOS, *COX-2*) et de MMP (MMP2, MMP13) (**Jiang C et al. 1998, Shioriji T et al. 2002, Cuzzocrea S et al. 2004**). Par ailleurs, leur activation restaure la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline. Ce dernier effet explique l'intérêt des agonistes des PPAR γ dans le traitement du diabète de type 2 (**Cheng PT et al. 2005**). La majorité des ligands endogènes des PPAR γ sont les eicosanoïdes issus de la biotransformation de l'acide arachidonique ou de l'acide linoléique par les lipoxigénases ou les cyclooxygénases (**Devchand PR et al. 1996**). Ainsi les prostanoides pourraient être considérés comme des inhibiteurs endogènes de la réaction inflammatoire capables également de restaurer l'insulino-sensibilité via l'activation des PPAR γ . Cette théorie souffre cependant de plusieurs limites dont la faible affinité de ces ligands pour PPAR γ qui imposerait des concentrations importantes de ces agonistes pour être efficace, et il n'existe pas de démonstrations probantes que les quantités produites par l'organisme soient suffisantes (**Bell-Parikh LC et al. 2003**). D'autre part leur manque de sélectivité marquée pour un sous-type spécifique de PPAR a pour conséquence des effets dépendants de leur cinétique de production et de leur aptitude à entrer ou non en compétition pour la fixation sur PPAR. Il existe par ailleurs un paradoxe qui est la possibilité pour certains AINS, par définition inhibiteur de *COX-2*, à se comporter également comme des agonistes de PPAR γ . Cependant, la pertinence thérapeutique de ces effets reste très incertaine car la modulation des PPARs a été observée à des concentrations d'AINS très nettement supérieures à celles

inhibant l'activité de COX-2 dans les chondrocytes ou les fibroblastes synoviaux (**Yamazaki R et al. 2002**). De plus le faible potentiel activateur des AINS sur les PPARs ne compense pas forcément le déficit d'activation provoqué par la diminution des PG secondaire à l'inhibition de COX-2.

Le rôle des PPARs est essentiel dans les mécanismes de restauration d'insulino-sensibilité et leur potentiel anti-inflammatoire est également intéressant au sein de cette pathologie inflammatoire chronique qu'est l'insulino-résistance. Cependant, que ce soit les PG, agonistes endogènes, ou les AINS, agonistes synthétiques des PPAR γ , ceux-ci ne semblent pas jouer un rôle significatif dans la modulation de la réaction inflammatoire, ni dans l'homéostasie glucidique. Ces données pourraient expliquer l'absence d'influence du polymorphisme du promoteur du gène *COX-2* que nous avons étudié sur la survenue d'un diabète après transplantation rénale.

3^{ème} gène candidat :

CX3CR1 (récepteur de CX3CL1/fractalkine)

I/ Description du gène CX3CR1

Le gène humain de CX3CR1 est situé sur le chromosome 3 (3p22). CX3CR1 (le récepteur de la fractalkine) est un récepteur de chimiokine appartenant à la famille des GPCR (G protein-coupled receptor : récepteurs contenant sept domaines transmembranaires associés aux protéine G). Cette liaison provoque l'activation de la cellule et la transduction du signal activant les cascades de signalisation intracellulaire aboutissant à l'expression de certains gènes contrôlant l'expression de molécules d'adhésion, la croissance cellulaire, la migration cellulaire et le chimiotactisme. CX3CR1 lie spécifiquement, avec une très forte affinité CX3CL1 (fractalkine) (**Imai T et al. 1997, Fong AM et al. 2002**). CX3CL1 est une chimiokine. Il existe actuellement 4 classes de chimiokines établies sur la base du réarrangement des résidus cystéines (C) conservés à l'extrémité N-terminale de la protéine mature. Dans la 1^{ère} classe, 1 acide aminé sépare les 2 premières cystéines conservées (classe CXC). Dans la 2^{ième} classe, les 2 premières cystéines sont adjacentes (classe CC). Dans la 3^{ème} classe, il manque le 1^{er} et 3^{ème} résidu cystéine (classe C). Enfin, il existe une 4^{ème} classe avec un unique représentant connu à l'heure actuelle : CX3CL1 (CXXXC ou CX3C pour la classe, L pour ligand et 1 pour l'ordre de découverte). Dans ce cas, les 2 premières cystéines sont séparées par 3 acides aminés. CX3CL1 est présente sous 2 formes : une forme soluble chimio-attractive qui permet le recrutement des cellules exprimant CX3CR1 aux sites d'inflammation et une forme membranaire adhésive qui permet l'adhésion des cellules exprimant CX3CR1 à l'endothélium et leur infiltration dans les tissus (**Imai T et al. 1997, Fong AM et al. 1998**). CX3CL1 est la seule chimiokine avec CXCL16 à exister sous forme membranaire (**Matloubian M et al. 2000**). CX3CR1 est exprimé principalement à la surface des monocytes, des Lc T et des cellules NK (**Imai T et al. 1997, Combadiere C et al. 1998, Robertson MJ et al. 2002**). CX3CL1 se lie aux cellules NK et sa forme soluble aurait un rôle important dans leur activité biologique en augmentant leur activité cytolytique (**Yoneda O et**

al. 2000). Le complexe CX3CR1-CX3CL1 est impliqué dans des maladies à composantes inflammatoires. Une sous-population de macrophage de la plaque d'athérome sur-exprime des chimiokines dont le couple CX3CL1/CX3CR1 (**Greaves DR et al. 2001**). CX3CL1, en tant que chimiokine membranaire, induit l'adhésion et la rétention des monocytes et des Lc T au sein des lésions d'athérosclérose. L'inactivation du gène codant pour le récepteur CX3CR1 n'altère pas le phénotype, mais suggère une implication du récepteur dans l'athérosclérose. En effet, la délétion du gène entraîne chez des souris apoE^{-/-} CX3CR1^{-/-} une réduction des lésions athéromateuses (**Lesnik P et al. 2003, Combadiere C et al. 2003**). En transplantation cardiaque, un modèle murin, objectivent au cours du rejet, une augmentation de l'expression de CX3CL1 induisant une augmentation de l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium cardiaque et participant ainsi au déclenchement de la réponse immunitaire. De plus, le traitement des souris par un Ac anti-CX3CR1 prolonge la survie de la transplantation (**Robinson LA et al. 2000**). L'utilisation de souris déficientes pour CX3CR1 et pour CX3CL1 a confirmé ces résultats (**Haskell CA et al. 2001**). Par ailleurs, CX3CL1 serait impliqué dans une voie d'échappement des cellules cancéreuses à l'immunosurveillance. En effet un site de fixation de la protéine p53 se trouve sur le promoteur du gène de CX3CL1. p53 est connue pour exercer un rôle de répresseur de tumeur. Il est également impliqué dans le repérage des séquences d'ADN endommagée. Le gène codant pour la protéine p53 est muté dans la moitié des cancers. Dans ce cas, p53 ne sera pas produite et les cellules cancéreuses exprimant normalement CX3CL1 ne pourront pas être éliminée par les LcT cytotoxiques ou les cellules NK exprimant CX3CR1. Ce mécanisme serait l'un des nombreux moyens permettant aux cellules tumorales d'échapper à la surveillance du système immunitaire. Enfin, CX3CR1 a été décrit comme co-récepteur du VIH et serait impliqué dans la progression du SIDA (**Combadiere C et al. 1998, Faure S et al. 2000**).

II/ Polymorphismes V249I et T280M du gène CX3CR1

II-1/ Etat de la littérature

Il existe 2 polymorphismes du gène de CX3CR1 (280 M/T et 249 V/I) avec un fort déséquilibre de liaison, aboutissant communément au génotype M280-I249. Pour le polymorphisme du gène CX3CR1 en position 280 M/T, une méthionine est remplacée par une thréonine et pour le polymorphisme du gène CX3CR1 en position 249 V/I, une valine est remplacée par une isoleucine.

Les premiers à s'être intéressés à la validation fonctionnelle du polymorphisme du gène de CX3CR1 sont Faure et al qui ont comparé l'expression de CX3CR1 sur des monocytes circulants de patients VIH+, soit homozygotes V249-T280, soit homozygotes I249-M280. Ceux-ci objectivent un nombre de récepteurs moindres chez les patients I249-M280 (génotype commun) versus V249-T280 (**Faure S et al. 2000**). Au sein de la même équipe, Moatti et al ont confirmé ces données chez des individus sains et observé une réduction d'environ 40% du nombre de récepteurs CX3CR1 sur les monocytes circulants de patients hétérozygotes VI en position 249 par rapport aux patients homozygotes VV. Des études fonctionnelles ont également montré l'association entre la présence du récepteur muté I249 sur les monocytes circulants et leur faible capacité à répondre à CX3CL1 (**Moatti D et al. 2001**). Cette moindre capacité de liaison résulterait d'une diminution de 36% du nombre de site de liaison à la fractalkine par cellule (**McDermott DH et al. 2001**). D'autre part, MacDermoot et al observent que des patients sains, homozygotes MM en position 280, ont un nombre de récepteurs leucocytaires CX3CR1 moindre, mais également que ces récepteurs ont des fonctions chimiotactiques déficientes (**McDermott DH et al. 2003**). En conclusion, les études fonctionnelles concernant le polymorphisme du gène de CX3CR1 objectivent qu'être I249-

M280 homozygote est sur le plan fonctionnel caractérisé par un nombre diminué de récepteur CX3CR1, également moins fonctionnel, aboutissant à une affinité moindre des cellules mononuclées pour CX3CL1.

Dans la littérature, l'allèle M280 est largement considéré comme « anti-athérogène » (**Niessner A et al. 2005, Apostolakis S et al ; 2007, Kimouli M et al. 2009**). Cependant, les données ne sont pas unanimes (**Debette S et al. 2009, Ghilardi G et al. 2004**). Enfin, contrairement aux données retrouvées dans le modèle murin de transplantation cardiaque, Simeoni et al. n'ont objectivé aucune corrélation entre le polymorphisme du gène de CX3CR1 et le rejet aigu après transplantation cardiaque. A noter cependant une incidence d'épisodes de rejet moindre chez les patients CX3CR1 249I en association à un autre variant génétique concernant CCR5 et supposant une action combinée de ces 2 récepteurs (**Simeoni E et al. 2005**).

II-2/ Etat de la littérature en transplantation rénale (population caucasienne)

Abdi et al. ont publié en 2002, une étude s'intéressant à l'influence de plusieurs variants génétiques concernant des récepteurs de chimiokines sur la survenue d'un rejet aigu après transplantation rénale (**Abdi R et al. 2002**). Cette étude comporte une seule cohorte de 163 patients transplantés rénaux et ne permet pas d'objectiver d'influence du polymorphisme du gène CX3CR1 à la fois en position 249 V/I et en position 280 M/T, sur la survenue d'un rejet aigu. Il faut noter l'absence de validation fonctionnelle au sein de ce travail.

Article n°6

Influence of fractalkine receptor gene polymorphisms V249I-T280M on cancer occurrence after renal transplantation

Soumis : Am J Transplant

Le couple CX3CR1/CX3CL1, comme décrit précédemment, est impliqué dans l'immunité anti-tumorale. Deux polymorphismes du gène CX3CR1 sont décrits dans la littérature et sont corrélés à une affinité de CX3CR1 pour son ligand CX3CL1 chez les patients 1249-M280.

Nous avons donc émis l'hypothèse que les patients transplantés rénaux porteurs du génotype 1249-M280 pourraient présenter un risque accru de cancer du fait d'une capacité d'immunosurveillance anti-tumorale moindre.

Influence of fractalkine receptor gene polymorphisms V249I-T280M on cancer occurrence after renal transplantation

Cécile Courivaud^{a,b}, Jamal Bamoulid^{a,b}, Alexandre Loupy^c, Marina Deschamps^{a,d}, Christophe Ferrand^{a,d}, Delphine Le Corre^e, Pierre Tiberghien^{a,d, f}, Jean-Marc Chalopin^{a,b,f}, Christophe Legendre^c, Eric Thervet^c, Christophe Borg^{a, f, g}, Philippe Saas^{a,d,f}, Didier Ducloux^{a,b,f}

^aINSERM, UMR645, Besançon, F-25020 France; Université de Franche-Comté, Etablissement Français du Sang, Besançon, Besançon, F-25020 France; IFR133, Besançon, F-25020 France

^bCHU Besançon, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, F-25030, Besançon, France

^cCHU Necker, Department of Renal Transplantation, 149 rue de Sèvres 75743 Paris cedex 15, France

^dEtablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté, Plateforme de Biomonitoring, CIC Biothérapie 506, Besançon, F-25020 France.

^eUniversité Paris Descartes, Paris, France ; (2) INSERM UMR-S 775 Centre Universitaire des Saints-Pères , 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France

^fCHU Besançon, CIC Biothérapies 506, F-25030 Besançon, France

^gCHU Besançon, Department of Medical Oncology, F-25030, Besançon, France

This study is supported by grants from the Fondation Transplantation, the Etablissement Français du Sang (Appel d'offres 2003), the Fondation de France (Appel d'offre Maladies Cardiovasculaires 2007, to PS), and the DHOS/INSERM/INCa (Appel d'offre Recherche Translationnelle 2008, to DD and PS). CC received financial support from the Fondation transplantation (#ET-031211 and #ET-050320, respectively).

Corresponding author: Dr Cécile Courivaud

Phone: 33381218782; Fax: 33381218781; e-mail: ccourivaud@chu-besancon.fr

Abstract

Fractalkine (CX3CL1) and its receptor (CX3CR1) are involved in anti-tumor immunity. Two common single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *CX3CR1* gene, T280M and V249I have been associated with reduced fractalkine signalisation characterized by decreased adhesive function, signalling and chemotaxis of leukocytes. We hypothesized that renal transplant recipients (RTR) carrying the homozygous I249M280 genotype could experience more cancer due to lower Fractalkin-dependent anti-tumorigenic effects.

We studied the association between these polymorphisms and cancer incidence in two independent cohorts of renal transplant recipients (RTR) including a total of 622 patients.

Median follow-up were 8.7 and 7.9 years for the first and second cohorts, respectively.

Analysis of 622 patients identified 20 I249M280 homozygous patients (3.2%), 321 V249T280 homozygous patients (51.6%), and 281 heterozygous patients (45.2%).

I249M280 homozygotes have an independent increased risk of cancer (HR 3.30 [95% CI 1.04-10.52], p=0.043 for cohort 1; HR 9.21 [95% CI 1.67-50.91], p=0.011 for cohort 2) compared to other patients. Age and male gender were also risk factors for cancer occurrence.

CX3CR1 gene polymorphism is associated with a higher rate of cancer in RTRs. Such findings may be used to influence immunosuppressive strategies and optimize patient management.

Introduction

A wide-ranging excess risk of cancer after solid organ transplantation has been increasingly recognized over recent decades as advances in medicine have extended the life of transplant recipients (1, 2, 3, 4). As a consequence, malignancy is now a leading cause of patient's death with functional graft, an outcome that can predominantly be attributed to the iatrogenic immunosuppression required to avoid rejection of the transplanted organ (1, 2, 3, 4).

Chemokines (chemotactic cytokines) are small secreted proteins that mainly regulate leucocyte trafficking. In cancer biology, they are known to be of fundamental importance because they are major determinants of macrophage, natural killer (NK) cell and lymphocyte infiltration in human carcinomas (5). The chemokine CX3CL1, also known as Fractalkine, and its receptor CX3CR1 have been implicated in colorectal cancer (CRC) where the ligand/receptor interaction exerts a chemotactic and a cell adhesion effect on monocytes/macrophages, NK cells and T lymphocytes and contribute to the accumulation of these cells into the cancer (6). Some data suggest that a high expression of Fractalkine in cancerous tissue results in a better prognosis for CRC patients (7, 8). There are 2 common single-nucleotide polymorphisms (SNPs) located in the coding sequence of the *CX3CR1* gene, T280M and V249I (9). These 2 variants are in strong linkage disequilibrium. In the T280M SNP, a methionine replaces a threonine residue, and a valine is replaced by an isoleucine in the V249I SNP (9). These polymorphisms have been associated with reduced number of fractalkine binding sites, reduced cell adhesion and decreased signalling and chemotaxis (10, 11). It has been proposed that the presence of the 280M allele impairs the ability of the molecule to participate in the inflammatory process; this is supported by the decreased adhesive function, signalling and chemotaxis of leukocytes from subjects homozygous for the 280M allele. The role of the V249I polymorphism, although in linkage disequilibrium with T280M, is less clear. Because a reduced binding affinity of FKN to cells from CX3CR1-

I249M280 homozygotes has been described, we analyzed cancer incidence in I249M280 homozygotes and in patients with other genotypes (9). Our working hypothesis was that RTRs carrying the M and I alleles could experience more cancer due to lower Fractalkin-dependent anti-tumorigenic effects.

Materials and Methods

Study design and population

We conducted a genetic study to assess whether the *CX3CR1* gene polymorphisms at positions 280 (T→M) and 249 (V→I) may be a risk factor for cancer. This hypothesis was first generated by the exploratory analysis of a first cohort of RTRs from the Saint Jacques University Hospital in Besançon (France), and then validated in a second verification cohort of RTRs from the Necker Hospital in Paris (France). Between June 1988 and December 2004, 597 adults underwent renal transplantation at Saint Jacques Hospital in Besançon. DNA was available in 370 patients (61%). These 370 individuals did not differ significantly from the non-evaluated patients transplanted during the same period and for whom DNA was not available (data not shown). A duplicate independent cohort was subsequently assembled and comprised 252 patients with DNA available from the 1080 adult recipients having received a renal transplant at Necker University Hospital in Paris between April 1986 and July 2003. These 252 individuals did not differ significantly from the non-evaluated patients transplanted during the same period and for whom DNA samples were not available (data not shown). The study design was approved by the Research Ethics Committee of Saint Jacques Hospital and all patients have received written information for DNA studies. Patients were not required to give consent, because their anonymity was maintained but could deny participation after having received written information.

Other risk factors for cancer such as age, number of HLA mismatches, transplant number (first vs second or more), dialysis duration before transplantation, delayed graft function (DGF), and acute rejection episodes were analyzed as covariates. Only Caucasian individuals were included in the study. All the patients in the two cohorts received a sequential quadruple immunosuppression with antibody induction, steroids, anticalcineurin and either AZA or MMF.

DNA extraction and analysis of *CX3CR1* gene polymorphisms at position 280 (T→M) and 249 (V→I)

Genomic DNA (gDNA) was obtained by standard salting out method from peripheral blood leukocytes of patients studied. Analysis of the *CX3CR1* gene loci was then studied using a PCR-based genotyping assay. The region containing the polymorphic site T280M was amplified with primers that have been described previously (12). The resulting PCR product (588bp) was used for restriction fragments length polymorphism (RFLP), and all fragments were separated on 2.5% agarose gels and visualised with UV light after ethidium bromide staining. T280M, digested PCR product is represented by mutated homozygote M/M 280 (372+216 bp), mutated heterozygote T/M 280 (372+297+216+75bp) or wild type homozygote T/T 280 (297+216+75bp). V249I digested PCR is represented by mutated homozygote I/I 249 (588bp), mutated heterozygote I/V 249 (588+205+383bp) or wild type homozygote V/V 249 (205+383bp). For each PCR, negative control (PCR amplification without gDNA) was included. Researchers and laboratory personnel had no access to identifiable information and could identify samples by number only.

Statistical analysis

Arithmetic means were calculated and expressed \pm standard deviation (SD). For normally distributed variables, homozygous I249M280 patients were compared to those carrying either T or V allele using the χ^2 test for dichotomic variables and the Student t test for continuous variables. Hardy-Weinberg equilibrium was assessed for the genotype distribution. Relationships between numerical variables were evaluated with the Spearman/Pearson rank test.

Using log rank tests on Kaplan Meier nonparametric estimates of the survival without cancer distribution, variables with a *p value* lower than, or equal to, 0.20 were selected. Time of transplant (1988-1995) or (1996-2002) was used as a covariate. The selected variables were included into a Cox proportional hazards model and a backward stepwise selection process was performed, this time with $\alpha = 0.05$. Results are expressed as relative risk (RR) and 95 % confidence interval, with a *p value* testing the null hypothesis: $RR = 1$. Therefore when *p value* is less than 0.05, RR is significantly different from 1, either greater than 1 (i.e., risk of cancer is increased) or less than 1 (i.e., risk of cancer is decreased). Assumptions of Cox models (log-linearity, proportionality of risk in time) were met in this analysis.

Results

Study population

-Cohort 1

Three hundred and seventy patients were followed for a median duration of 8.7 years after transplantation. Mean age was 47 ± 13 years, and 231 RTR (63.3%) were men. Mean dialysis duration was 17.9 ± 24 months. Eighty eight percent of the patients were recipients of a first transplant and 11% exhibited a positive PRA. There was no difference in the timing of transplant between I249M280 patients and T/V carriers.

-Cohort 2

Two hundred and fifty two patients were followed for a median duration of 7.7 years after transplantation. Mean age was 45 ± 12 years, and 142 (56.3%) were men. Compared to cohort 1, mean dialysis duration was longer in cohort 2 (30.6 ± 41.2 months; $p=0.024$). Eighty one percent of the patients were recipients of a first transplant. The rate of first transplant was lower in the second cohort ($p=0.048$). There was no difference in the timing of transplant between I249M280 patients and T/V carriers.

In the 2 cohorts, mean follow-up was similar in patients with the different genotypes (data not shown).

Analysis of the *CX3CR1* gene polymorphism at position 280 and 249 frequencies in RTR

The frequencies of the different genotypes are described in table 2. Briefly, there was no difference in the distribution of the three genotypes in the two cohorts. The observed allele frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium.

We analyzed the ratio (MM/II patients / T/V carriers) in early grafts (1988-1998) and late grafts (1999-2002). In the first cohort, the ratios were 3.2 and 3.6%, respectively. The ratios were 2.1% and 3.3% in the second cohort.

Relation between the *CX3CR1* gene polymorphisms at position 280 and 249 and cancer occurrence

-Cohort 1

Cancer occurred in 87 patients (23.5%): 7 (53.8%) in I249M280 patients and 80 (22 %) in T/V carriers. This corresponds to 62 cancers for 1000 patients/year in I249M280 patients and

26 for 1000 patients/year in T/V carriers. Cancer-free survival according to *CX3CR1* gene polymorphism is depicted in figure 1.

In univariate analysis, I249M280 homozygous genotype ($p=0.014$), age ($p<0.0001$) as well as male gender ($p=0.18$) were associated with cancer occurrence.

Cox regression analysis revealed that I249M280 homozygous genotype (HR 3.30 [95% CI 1.04-10.52], $p=0.043$), and age (HR 1.06 [95% CI 1.04-1.08], for each increase in age of one year, $p<0.0001$) were independent risk factors for cancer (table 3).

-Cohort 2

Cancer occurred in 36 patients (14.3%): 3 (42.8%) in I249M280 patients and 33 (13.5 %) in T/V carriers. This corresponds to 54 cancers for 1000 patients/year in I249M280 patients and 17 for 1000 patients/year in T/V carriers. Cancer-free survival according to *CX3CR1* gene polymorphism is depicted in figure 2.

In univariate analysis, I249M280 homozygous genotype ($p=0.045$), age ($p=0.0001$) as well as male gender ($p=0.016$) were associated with cancer occurrence.

Cox regression analysis revealed that I249M280 homozygous genotype (HR 9.21 [95% CI 1.67-50.91], $p=0.011$), male gender (HR 2.90 [95% CI 1.22-6.90], $p=0.016$), and age (HR 1.07 [95% CI 1.03-1.10], for each increase in age of one year, $p=0.0001$) were independent risk factors for cancer (table 3).

-overall population

Cancer occurred in 123 patients (19.8%).

Cox regression analysis revealed that I249M280 homozygous genotype (HR 3.43 [95% CI 1.31-8.98], $p=0.012$), male gender (HR 1.83 [95% CI 1.17-2.88], $p=0.008$), and age (HR 1.06 [95% CI 1.05-1.08], for each increase in age of one year, $p=0.0001$) were independent

risk factors for cancer (table 3).

Discussion

Our study suggests that CX3CR1 gene polymorphism is an important determinant for the subsequent development of cancer after transplantation. Indeed, patients carrying the homozygous genotype I249M280 had a three fold increase in the risk of cancer as compared with those carrying the T or V allele. Such a relationship between CX3CL1/CX3CR1 and cancer have been reported in the general population for different cancer sites especially prostate (7), and colon (8). Nevertheless, we report the first evidence that this polymorphism also contributes to cancer occurrence after kidney transplantation.

The incidence of cancer is considerably increased after organ transplantation (1, 2, 3, 4). Recent data suggest that the rates of cancer in renal transplant recipients are similar to non-transplanted people 20-30 years older (1). In absolute terms, the excess burden of cancer cases in the transplant population compared with the general population ranged from 184/100000 to 1656/100000 extra cases according to recipients' risk factors (1). A greater understanding of risk factors would allow physicians to appreciate the absolute recipient's cancer risk and to subsequently manipulate factors that are open to modification. As a result, defining risk factors for the development of cancer is a major issue. Nevertheless, for a genetic test to be relevant in clinical management, it is obviously critical that the test has additional predictive power over and above the presently available and easily assessable risk factors. Our study highlights that CX3CR1-V249I-T280M can define a very high risk transplant population regarding cancer occurrence independent of age and gender. Until recently post-transplantation cancer prevention has included life style recommendations and reduction/discontinuation of the immunosuppressive regimen with concomitant increases in the risk of acute rejection and graft loss. The use of mTOR inhibitors within the

immunosuppressive regimen has been associated with decreased incidences of post-transplantation cancer (13, 14, 15). Such treatments could be especially considered in I249M280 homozygous patients. *CX3CR1* gene polymorphisms determination might offer the opportunity to modulate the immunosuppressive treatment and optimize the monitoring in a substantial proportion of the transplant population.

Innate immunity is critically important for tumor surveillance and regulating tumor metastasis. Fractalkine (FKN, *CX3CL1*), operating through the receptor *CX3CR1*, is an effective chemoattractant and adhesion receptor for NK cells and monocytes, important constituents of the innate immune response. Previous studies have shown that over-expression of *CX3CL1* by tumor cells enhances antitumor responses. Yu et al tested the response of wild-type and *CX3CR1*-deficient animals to un-manipulated B16 melanoma that does not express *CX3CL1* (10). They found that B16-treated *CX3CR1*^{-/-} mice had increased lung tumor burden and cachexia. Lavergne et al (11) demonstrated that Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo and can reduce incidence and size of lymphoma in vivo through increased recruitment of activated NK cytotoxic cells.

The design of the study may have introduced a selection bias. Even though, no significant differences could be identified between included and non-included patient, we cannot exclude a preferential selection of low-risk recipients regarding cancer occurrence and subsequent death. Indeed, main causes of DNA unavailability are death and graft loss. Nevertheless, if true, such limitation should favour the null hypothesis, and not contribute to a false positive result. It should be noted that the observed frequency of the M allele is quite similar to those observed in other studies including Caucasian people (9, 16, 17). We did not assess the biological relevance of the polymorphism. Many investigators have explored the mechanisms underlying this phenotype–genotype interaction. FKN-dependent cell-cell adhesion is severely reduced in cells expressing *CX3CR1*-M280. This is associated with marked reduction in the

kinetics of FKN binding as well as reduced FKN-induced chemotaxis of primary leukocytes from donors homozygous for *CX3CR1-M280* and *I249* (18). Faure et al (9) compared FKN binding to primary peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HIV-infected patients homozygous for *CX3CR1-V249T280* versus *CX3CR1-I249M280*. Scatchard regression analysis of the binding data revealed a significantly reduced binding affinity of ¹²⁵I-labeled FKN to cells from *CX3CR1-I249M280* homozygotes versus wild-type *CX3CR1-V249T280* cells, providing an indication that the specific genotype affects the integrity of the receptor. In fact, because *CX3CR1-M280* seems to affect *CX3CR1* affinity for CX3CL1, immunosuppression should not affect the functionality of the mutation. Methodological standardization is mandatory in SNPs studies. A plausible hypothesis, a sufficient sample size, and a confirmation of the results in a separate independent cohort are other indispensable prerequisite in such studies (19). All these essential conditions are met in this study. Another issue is that the *I249M280* homozygous genotype is very rare. Nevertheless, these patients carry such an increased risk that screening for this polymorphism seems us reasonable for efficient prevention of cancer.

Finally, our results highly suggest that *CX3CR1* gene polymorphism influences the development of cancer after kidney transplantation. The *CX3CR1* gene polymorphisms at position 280 and 249 may serve as a genetic marker to help physicians in determining recipient risk profile and in optimizing pre-and post-transplant treatment strategies.

References

1. Webster AC, Craig JC, Simpson JM, Jones MP, Chapman JR. Identifying high risk groups and quantifying absolute risk of cancer after kidney transplantation: a cohort study of 15183 recipients. *Am J Transplant* 2007; 7: 2140-2151
2. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson DT, Wang C. Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 2004; 4: 905-913
3. Birkeland SA, Storm HH, Lamm LU, et al. Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer* 1995; 60: 183-189
4. London NJ, Farmery SM, Will EJ, Davison AM, Lodge JP. Risk of neoplasia in renal transplant patients. *Lancet* 1995; 346: 403-406
5. Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med*. 2010; 16: 133-44
6. D'Haese JG, Demir IE, Friess H, Ceyhan GO. Fractalkine/CX3CR1: why a single chemokine-receptor duo bears a major and unique therapeutic potential. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14: 207-19.
7. Blum DL, Koyama T, M'Koma AE, Iturregui JM, Martinez-Ferrer M, Uwamariya C, Smith JA Jr, Clark PE, Bhowmick NA. Chemokine markers predict biochemical recurrence of prostate cancer following prostatectomy. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 7790-7.
8. Ohta M, Tanaka F, Yamaguchi H, Sadanaga N, Inoue H, Mori M. The high expression of Fractalkine results in a better prognosis for colorectal cancer patients. *Int J Oncol* 2005; 26: 41-7
9. Faure S, Meyer L, Costagliola D, Vaneensberghe C, Genin E, Autran B, Delfraissy JF, McDermott DH, Murphy PM, Debré P, Théodorou I, Combadière C. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science*. 2000; 287: 2274-7

10. Yu YR, Fong AM, Combadiere C, Gao JL, Murphy PM, Patel DD. Defective antitumor responses in CX3CR1-deficient mice. *Int J Cancer*. 2007; 121: 316-22.
11. Lavergne E, Combadière B, Bonduelle O, Iga M, Gao JL, Maho M, Boissonnas A, Murphy PM, Debré P, Combadière C. Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo. *Cancer Res* 2003; 63: 7468-74.
12. Moatti D, Faure S, Fumeron F, Amara Mel-W, Seknadji P, McDermott DH, Debré P, Aumont MC, Murphy PM, de Prost D, Combadière C. Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood*. 2001; 97: 1925-8
13. Kauffman HM, Cherikh WS, Cheng Y, Hanto DW, Kahan BD. Maintenance immunosuppression with target-of-rapamycin inhibitors is associated with a reduced incidence of de novo malignancies. *Transplantation* 2005; 80: 883-9.
14. Campistol JM, Eris J, Oberbauer R, Friend P, Hutchison B, Morales JM, et al. Sirolimus therapy after early cyclosporine withdrawal reduces the risk for cancer in adult renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 581-9.
15. Schena FP, Pascoe MD, Alberu J, del Carmen Rial M, Oberbauer R, Brennan DC, et al. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus maintenance therapy in renal allograft recipients: 24-month efficacy and safety results from the CONVERT trial. *Transplantation* 2009; 87: 233-42
17. Moatti D, Faure S, Fumeron F, El Walid Amara M, Seknadji P, McDermott DH, Debré P, Aumont MC, Murphy PM, de Prost D, Comabière C. Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood* 2001; 97: 1925-1928
18. Norata GD, Garlaschelli K, Ongari M, Raselli S, Grigore L, Catapano AL. Effects of fractalkine receptor variants on common carotid artery intima-media thickness. *Stroke* 200-; 37: 1558-1561

18. McDermott DH, Fong AM, Yang Q, Sechler JM, Cupples LA, Merrell MN, Wilson PW, D'Agostino RB, O'Donnell CJ, Patel DD, Murphy PM. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest* 2003; 111: 1241-50
19. Freely associating. *Nature Genetics* 1999; 22: 1-3

Table 1: Clinical characteristics of the two cohorts

	Cohort 1			Cohort 2		
	V/T	MM/II	p	V/T	MM/II	p
Age (years)	50 ± 14	44 ±/- 14	NS	44 ± 13	45 ± 13	NS
Gender (% male)	69	63	NS	57	15	NS
Dialysis duration (months)	18 ± 16	18 ± 17	NS	34 ± 19	29 ± 21	NS
First transplant (%)	87%	89%	NS	77%	84%	NS
Acute rejection (%)	31	20	NS	29	25.2	NS

Table 2: Combined genotype frequencies of the V249I and T280M polymorphisms of the CX3CR1 gene in cohorts 1 and 2. Cumulative cancer incidence is depicted in homozygous I249M280 patients, homozygous V249T280 patients, and heterozygous patients

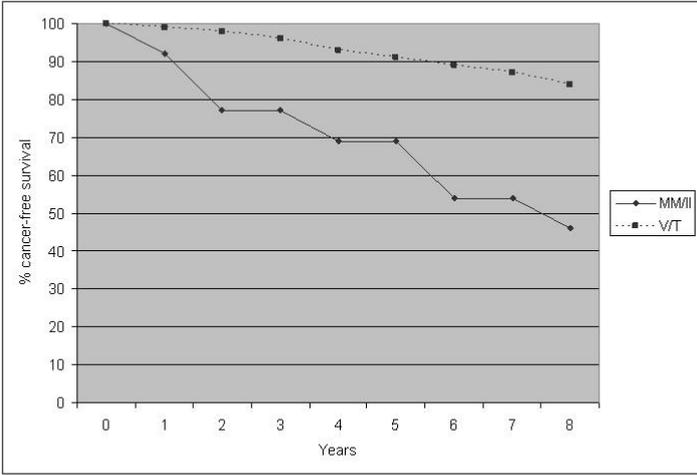
	V249I	T280M	Cohort 1	Cancer	Cohort 2	Cancer
1	VV	TT	182 (49%)	39 (21%)	139 (54%)	23 (16%)
2	VI	TT	74 (20%)	41 (23%)	37 (15%)	11 (10%)
3	VI	TM	70 (19%)		43 (17%)	
4	II	TT	9 (2%)		12 (5%)	
5	II	TM	22 (6%)		14 (6%)	
6	II	MM	13 (4%)		7 (54%)	

Table 3: Cox model: Hazard Ratio (HR) of cancer and 95% Confidence Intervals (CI)

	Cohort 1			Cohort 2			Overall population		
	HR	CI 95%	p	HR	CI 95%	p	HR	CI 95%	p
MM/II genotype	4.81	1.03- 22.51	0.045	9.21	1.67- 50.91	0.011	3.43	1.31- 8.98	0.012
Gender	1.41	0.83- 2.43	NS	2.90	1.22- 6.90	0.016	1.83	1.17- 2.88	0.008
Age	1.06	1.19- 4.97	<0.0001	1.07	1.03- 1.10	0.0001	1.06	1.05- 1.08	<0.0001

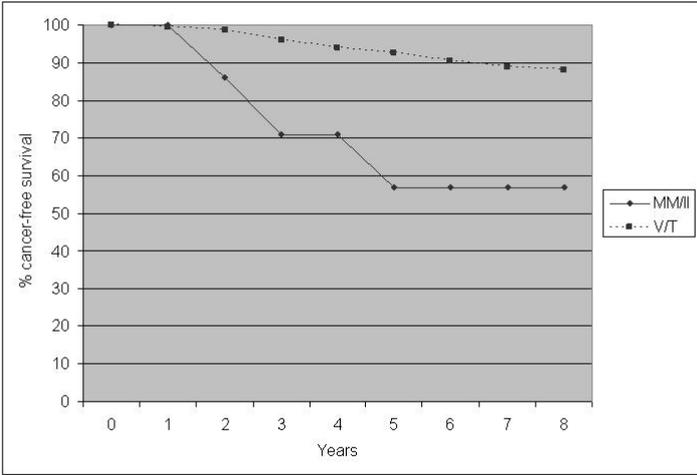
Figure legends

Figure 1. Cancer-free survival according to *CX3CR1* gene polymorphism (cohort 1)



Cohort 1

Figure 2. Cancer-free survival according to *CX3CR1* gene polymorphism (cohort 2)



Cohort 2

III/ Discussion

Cette étude montre une relation entre affinité moindre de CX3CR1 à son ligand CX3CL1 (Fractalkine) et une survenue accrue de cancer au sein d'une population de transplantés rénaux. Ces données valident donc l'influence du polymorphisme V249I-T280M sur la survenue de cancer et donc le rôle important de CX3CL1 dans l'immunité anti-tumorale. A ce jour, les études ont constaté fréquemment une augmentation de l'expression de CX3CR1/CX3CL1 au sein des tissus tumoraux. Cependant, cette étude est la première à corréler directement le polymorphisme de CX3CR1 au cancer dans une population de patients transplantés.

La connaissance de ce polymorphisme pourrait aider au choix de l'immunosuppression et du type de surveillance après transplantation.

4^{ème} gène candidat :

NOD2 (Nucleotide Oligomerisation Domain 2)

I/ Description du gène de NOD2

Le gène humain NOD2 est situé sur le chromosome 16 (16q12). Parmi les molécules de transduction NOD (Nucleotide Oligomerisation Domain), NOD1 est un récepteur pour les bactéries gram positif, alors que NOD2 (appelé aussi CARD15, Caspase-Recruitment Domain chez la souris) reconnaît le muramyl dipeptide (MDP) présents dans le peptidoglycane des parois des bactéries gram positif et négatif. NOD2, récepteur cytoplasmique, est exprimé par de nombreuses cellules, telles que les monocytes/macrophages, les cellules épithéliales, les CD4 et les LcT. Si NOD2 est présent spontanément dans les monocytes/macrophages et CD4, son expression dans les LcT et surtout les cellules épithéliales coliques est induite par le TNF- α et l'IFN- γ , médiateurs importants de l'inflammation et de la constitution d'une réponse immunitaire antibactérienne. D'une façon plus générale, l'expression de NOD2 est augmentée par l'activation de la voie NF- κ B et inversement, le processus de différenciation cellulaire diminue l'expression de NOD2 par les monocytes/macrophages. Cette reconnaissance déclenche une cascade d'événements dans la cellule, aboutissant à l'activation de la voie NF- κ B (**Figure 24**).

Les données *in vitro* montrent donc que NOD2/CARD15 est impliqué dans la reconnaissance des bactéries gram positif et négatif et qu'il pourrait intervenir dans la régulation de l'inflammation induite par les bactéries. Cependant, une étude fonctionnelle de NOD2/CARD15 réalisée *in vivo* objective que les souris NOD2/CARD15^{-/-} ont un phénotype normal et ne développent pas d'inflammation intestinale spontanée, dans un environnement conventionnel (**Pauleau AL et al. 2003**). De plus, les macrophages purifiés de ces souris répondent de manière identique par rapport aux macrophages contrôles exprimant normalement NOD2/CARD15. Ainsi *in vivo* et *ex vivo*, NOD2/CARD15 ne semble pas intervenir dans l'activation des voies NF- κ B ou des kinases de stress (MAPkinases), ni dans

la production de cytokines inflammatoires, après mise en contact avec des agents stimulants tels que le LPS et le peptidoglycane.

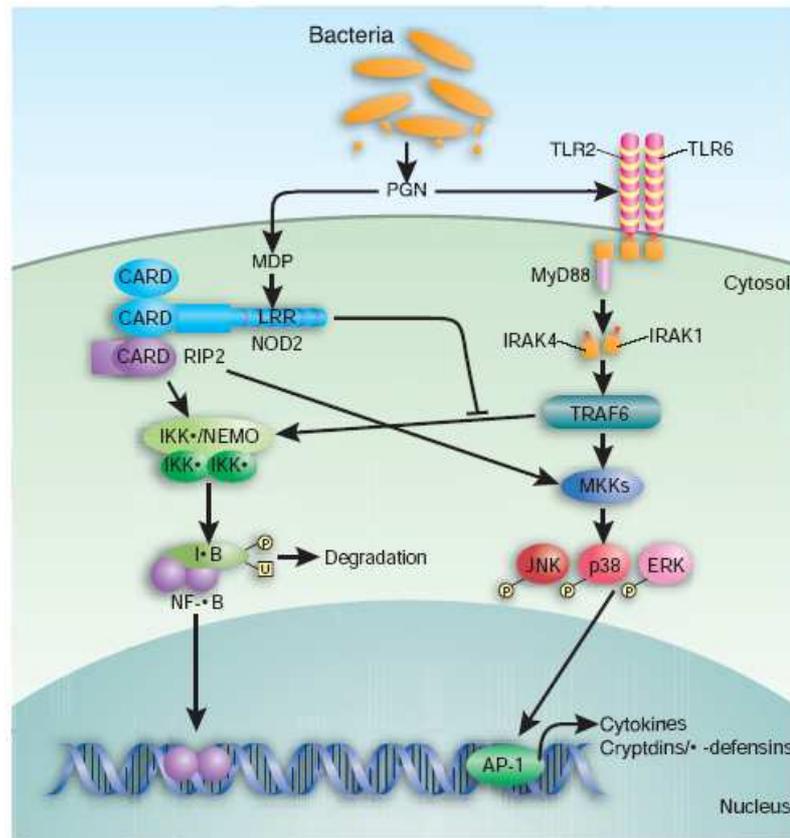


Figure 24: Récepteurs Nod2 et voies de signalisation dépendantes de l'interaction de Nod2 et de son ligand (PGN :peptidoglycane). Cette reconnaissance déclenche une cascade d'événements dans la cellule, aboutissant à l'activation de la voie NF-κB.

II/ Polymorphismes du gène *NOD2*

II-1/ Etat de la littérature

Trois mutations principales du gène *NOD2* ont été observées (Arg702Trp ou SNP8, Gly908Arg ou SNP12 et Leu1007fsinsC ou SNP13) chez des patients atteints de maladie de Crohn (maladie inflammatoire chronique du colon) objectivant qu'environ 50 % des patients

atteints de maladie de Crohn présentent au moins une des 3 mutations sur un des deux chromosomes 16 (sujets hétérozygotes simples) et 15 % une mutation sur leurs 2 chromosomes (sujets homozygotes ou hétérozygotes composites). Les études réalisées chez les malades atteints de maladie de Crohn suggèrent que ce polymorphisme permet de définir un sous groupe de malades qui développent une maladie plus précoce et localisée plus fréquemment dans l'iléon et d'évolution plus volontiers sténosante (**Lesage S et al. 2002, Cuthbert AP et al. 2002, Abreu MT et al. 2002**). La capacité pour NOD2 de déclencher une réponse inflammatoire moindre via la voie NF- κ B en cas de mutation peut paraître paradoxale lorsqu'elle est corrélée à une sévérité accrue de la maladie de Crohn. Le rôle de NOD2 dans l'activation de la voie pro-inflammatoire NF- κ B pourrait donc être mineur, au profit de mutations NOD2 plutôt responsables d'un défaut de clairance des bactéries pathogènes, augmentant ainsi le nombre d'infections digestives chez l'hôte et engendrant une situation pro-inflammatoire. Depuis longtemps le rôle de la flore digestive est suspecté dans la maladie de Crohn. Les expériences de dérivation ou de ré-instillation de l'effluent entérique, ainsi que le rôle partiellement bénéfique des antibiotiques suggèrent que la flore intestinale pourrait avoir un rôle dans le développement de la maladie. Par ailleurs, le polymorphisme de NOD2/CARD15 influence aussi la survenue de la maladie du greffon contre l'hôte digestive (GVHD), une pathologie inflammatoire observée lors de l'allogreffe de cellules hématopoïétiques (**Holler E et al. 2008**). En effet, Holler et al ont observé une augmentation significative de l'incidence cumulée des GVHD digestives, facteur de mortalité important dans cette population, passant de 18 à 40% respectivement chez les "couples donneur/receveur" non mutés, comparativement aux "couples donneur/receveur" présentant l'un et/ou l'autre une ou plusieurs mutations NOD2/CARD15. Cependant, ces données n'ont pas été confirmées par d'autres équipes (**Sairafi D et al. 2008, Nguyen Y et al. 2010**).

II-2/ Etat de la littérature en transplantation rénale (population caucasienne)

Krüger et al ont retrouvé une association entre des polymorphismes de NOD2 et la mortalité cardio-vasculaire après transplantation rénale. Dans cette étude, la relation est retrouvée en combinant les polymorphismes et en comparant une combinaison à l'ensemble des autres. Il est très probable que des comparaisons multiples aient été effectuées sans ajustement pour le nombre de tests effectués. En conséquence, ces résultats doivent être interprétés avec précaution (**Krüger B et al. 2007**).

Article n°7

No evidence of association between *NOD2/CARD15* gene polymorphism and atherosclerotic events after renal transplantation

Transplantation 2006

Par analogie avec les données que nous avons précédemment publiées concernant TLR4, nous nous sommes intéressées à l'influence potentielle des différents polymorphismes du gène *NOD2* sur la survenue d'événements athéromateux après transplantation rénale. En effet, notre groupe a montré que les transplantés rénaux ayant un TLR-4 muté et moins fonctionnel pour délivrer un signal inflammatoire, ont un risque athéromateux moindre. L'hypothèse est donc, que de la même manière, les patients transplantés ayant un récepteur *NOD2* muté et donc moins fonctionnel pour activer la voie NF- κ B pro-inflammatoire, pourraient présenter un risque athéromateux moindre.

No Evidence of Association between NOD2/CARD15 Gene Polymorphism and Atherosclerotic Events after Renal Transplantation

Cécile Courivaud,^{1,2,3} Christophe Ferrand,^{1,2,4} Marina Deschamps,^{1,2,4} Pierre Tiberghien,^{1,2,4,5} Jean-Marc Chalopin,^{1,2,3,5} Anne Duperrier,^{1,2,4} Philippe Saas,^{1,2,4,6} and Didier Ducloux^{1,2,3,5,6}

Stable renal transplant recipients (RTR) display high rates of atherosclerotic events (AE). Innate immunity and especially vascular inflammation play a role in the pathogenesis of atherosclerosis. It is illustrated both by an increased occurrence of postrenal transplant cardiovascular events in patients with elevated levels of C-reactive protein and by a correlation between posttransplant AE and Toll-like receptor-4 Asp299Gly polymorphism. Here, we analyze the influence NOD2/CARD15 gene polymorphism since NOD2 can modulate macrophage pro-inflammatory activity and macrophage is present in early atherosclerotic lesions. The incidence of single nucleotide polymorphism (SNP) in the three major polymorphic region of NOD2 gene (SNP8, SNP12 and SNP13) was assessed in 182 RTR and the correlation between such polymorphism and the development of AE was analyzed. No correlation was observed between NOD2 gene polymorphism and the occurrence of AE after renal transplantation. NOD2 gene polymorphism thus does not appear to influence cardiovascular complications in RTR.

Keywords: Atherosclerosis, Inflammation, Innate immunity.

(*Transplantation* 2006;81: 1212–1215)

Stable renal transplant recipients (RTRs) display disproportionately high rates of atherosclerotic events (AE) (1). It is now established that both vascular inflammation and components of the immune system are involved in the pathogenesis of atherosclerosis (2). We have already shown the importance of inflammatory and innate immunity in the pathogenesis of atherosclerosis after renal transplantation by demonstrating a correlation between the occurrence of post-transplant cardiovascular events and i) elevated circulating levels of C-reactive protein (3) and ii) Toll-like receptor-4 (TLR4) Asp299Gly polymorphism (4). Here, we analyze

NOD2/CARD15 (Nucleotide Oligomerisation Domain-2/ Caspase-Recruitment Domain-15, thereafter called NOD2) gene polymorphism. Three major single nucleotide polymorphisms (SNP) have been reported in NOD2 gene; SNP8, 12 and 13 alleles have been previously associated with increased susceptibility for two inflammatory diseases: Crohn's disease (5, 6) and Graft-versus-Host Disease (GVHD) after allogeneic hematopoietic cell transplantation (7). This suggests that NOD2 gene polymorphism modulates pro-inflammatory diseases. NOD2 is expressed in macrophages (8, 9) and macrophages are present in atherosclerotic lesions at early stages (10). To date, no study has evaluated the impact of NOD2 gene polymorphism on AE after transplantation. We assessed the frequency of NOD2 gene polymorphism in 182 RTRs and analyzed the relationship between such polymorphism and the development of atherosclerotic complications.

One hundred and eighty-two RTRs were enrolled in this trial. These patients have been transplanted between January 1990 and December 2000. Age, gender, body mass index (weight [Kg]/size² [m²]), past history of cardiovascular disease (CVD) and other risk factors were collected at transplant time (Table 1). Mean age was 46 ± 13 years, and 117 RTRs (64.3%) were men (Table 1). Mean follow-up of these 182 patients was 7.5 ± 2.3 years posttransplant. These 182 RTRs were genotyped for SNP8, SNP12 and SNP13 of NOD2 gene. Genomic DNA was extracted from white blood cells using standard salting out procedure. Analysis of each NOD2 variants was then performed using a polymerase chain reaction (PCR)-based genotyping assay with specific primers, as de-

P. Saas and D. Ducloux contributed equally to this work.

This study is supported by grants from the Fondation Transplantation. CC received financial support from the Fondation Transplantation (#ET-050320). MD received financial support from the Comité Départemental de la Ligue contre le Cancer du Jura.

¹ INSERM, U645, Besançon, France.

² University of Franche-Comte, IFR133, Besançon, France.

³ CHU Besançon, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, Besançon, France.

⁴ EFS, Bourgogne Franche-Comté, Plateforme de BioMonitoring, Besançon, France.

⁵ CHU Besançon, CICBiothérapie, Besançon, France.

⁶ Address correspondence to: Didier Ducloux, M.D. or Philippe Saas, Ph.D., Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, CHU Saint Jacques, F-25030 Besançon, France.

E-mail: dducloux@chu-besancon.fr or philippe.saas@efs.sante.fr

Received 11 November 2005. Revision requested 5 December 2005.

Accepted 7 December 2005.

Copyright © 2006 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/06/8108-1212

DOI: 10.1097/01.tp.0000202846.17619.a4

TABLE 1. Comparison of baseline characteristics and main outcome after transplantation in 182 renal transplant recipients (RTR) presenting a wild type genotype of the NOD2 gene versus RTRs presenting a mutation in SNP8, SNP12 or SNP13 of the NOD2 gene

	Wild type genotype carriers	NOD2 polymorphism carriers ^a
n (%)	155 (85.2)	27 (14.8)
Age (years)	45.8±13.8 ^b	49.4±9.2 ^b
Sex ratio (male/female)	97/58 (62.6%/37.4%)	20/7 (74%/26%)
Pre-transplant body mass index (kg/m ²)	22.6±4.1 ^b	24.3±4.2 ^b
Past history of cardiovascular disease	8 (5.1%)	0
Hypertension	85 (54.8%)	17 (62.9%)
Dyslipidemia	61 (39.3%)	10 (37%)
Diabetes mellitus (DM)/post-transplant DM	8 (5.2%)/18 (11.6%)	1 (3.7%)/5 (18.5%)
Homocysteine (μmol/l)	16.6±5.5 ^b	15.2±6.7 ^b
Cigarette smoking	15 (9.7%)	5 (18.5%)
Atherosclerotic events after transplantation	32 (20.6%)	6 (22.2%) ^c
Opportunistic infections	39 (25.2%)	5 (18.5%)
CMV disease	38 (24.5%)	5 (18.5%)
Bacterial infections	55 (35.5%)	7 (25.9%)
Acute rejection	30 (19.3%)	6 (22.2%)
Death after transplantation	5 (3.2%)	2 (7.4%)

Results are expressed in kg/m² for body mass index, in μmol/l for homocysteine, in years for age and for other items as number of patients and percentage in brackets.

^a Heterozygote RTRs with a mutated NOD2 allele in either SNP8, SNP12 or SNP13 region (since no heterozygous composites or homozygous mutants were detected); ^b mean ± SD; ^c 2 patients with a mutated SNP8, 2 with a mutated SNP12 and 2 with a mutated SNP13 developed AE (see also Table 2).

scribed (5). After PCR amplification of the polymorphic regions of interest, PCR products were digested overnight with Msp I, Hha I and ApaI restriction endonuclease (New England Biolabs, Beverly, MA), for SNP8, SNP12 and SNP13 respectively (5), as recommended by the supplier. Digestion products were then separated by a 2% standard agarose gel electrophoresis (Fig. 1). For each PCR, a negative control (PCR amplification without genomic DNA) was included. We added systematically a mutated DNA to control digestion procedures. Researchers and laboratory staff did not have any access to identifiable information and could identify samples by number only.

Posttransplant AE, i.e., coronary heart disease, stroke/cerebrovascular disease and abdominal aortic or lower extremity arterial disease, were diagnosed according to pub-

lished criteria (11). Thirty-eight (20.7%) patients presented AE: 19 coronary heart diseases, 8 cerebrovascular diseases and 11 lower extremity arterial diseases. Statistical analysis was performed using Statview 5 (SAS institute Inc., Cary, NC). Arithmetic mean was calculated and expressed as ± standard deviation (SD). Dichotomic variables were compared with the χ^2 test and continuous variables with the Student *t* test. Using log-rank tests on Kaplan Meier nonparametric estimates of the survival without AE distribution, we selected variables with a p value lower than, or equal to, 0.20. The selected variables were included into a Cox proportional hazard model, and a backward stepwise selection process was performed, this time at a classical $\alpha=0.05$.

The incidence of heterozygous genotype carriers observed in the RTR cohort was limited: 8.8% (n=16), 4.4% (n=8) and 1.6% (n=3) for SNP8, SNP12 and SNP13, respectively. NOD2 allele and genotype frequencies are summarized in Table 2. As previously described (5, 6), we did not find either heterozygous composites or homozygous mutants (Table 2). We observed more SNP12 heterozygote patients (4.4%; Table 2) than in a previous publication reporting SNP12 incidence (0.72 and 1.23%) in two independent Caucasian populations (6). We did not find any relationship between NOD2 gene polymorphism and major complications observed after renal transplantation, including: acute rejection, CMV disease, bacterial or opportunistic infections, and death (Table 1). When focusing on occurrence of AE after renal transplantation, no correlation was also found (hazard ratio, HR, 1.12; 95% confidence interval, CI, 0.69 to 2.01; *P*=0.31; Tables 1 and 2). In multivariate analysis, older age (HR, 4.77; 95% CI, 2.37 to 9.80), a past history of cardiovascular disease (relative risk, RR, 3.20; 95% CI, 1.49 to 6.45), male gender (HR, 1.99; 95%CI, 0.99 to 3.78); and diabetes mellitus (RR, 1.48; 95% CI, 1.11 to 2.75) predicted independently the risk of AE. This contrasts with the implication of

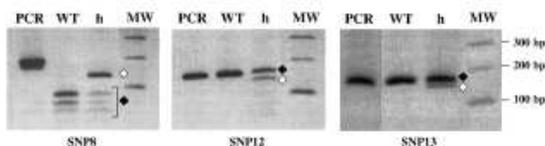


FIGURE 1. A representative analysis of NOD2 gene polymorphism by restriction fragment length polymorphism (RFLP)-PCR. Agarose gel electrophoresis of RFLP-PCR after MspI, HhaI, or ApaI overnight restriction digest, respectively, for SNP8 (left panel) SNP12 (middle panel) and SNP13 (right panel) polymorphisms. WT corresponds to DNA from a wild type patient, while h corresponds to DNA from a heterozygote patient. PCR corresponds to undigested PCR products of 185 bp, 163 bp, and 151 bp, respectively, for SNP8, SNP12 and SNP13 polymorphisms. MW represents molecular weight marker where the 3 bands are 100bp, 200 bp and 300 bp in length. In h samples, \diamond symbol depicts the mutated allele, whereas \blacklozenge depicts the wild type allele.

TABLE 2. Comparison of NOD2 gene polymorphism incidence in renal transplant recipients (RTR) enrolled in our cohort with three previously published cohorts including patients suffering from Crohn's Disease

	Polymorphism incidence in RTR	AE in these RTR	Polymorphism incidence in Ref. 5	Polymorphism incidence in Ref. 6	Polymorphism incidence in Ref. 6
n	182	38	300	373	202
SNP8					
WT	166 (91.2%)	36 (21.7%)	289 (96.3%)	95.2%	97.2%
H/h	16 (8.8%)	2 (12.5%)	11 (3.7%)	4.8%	2.8%
DM	0	0	0	0	0
SNP12					
WT	174 (95.6%)	36 (20.7%)	300 (100%)	99.3%	98.8%
H/h	8 (4.4%)	2 (25%)	0	0.7%	1.2%
DM	0	0	0	0	0
SNP13					
WT	179 (98.4%)	36 (20.1%)	290 (96.7%)	95.9%	98.8%
H/h	3 (1.6%)	2 (66.6%)	10 (3.3%)	4.1%	1.2%
DM	0	0	0	0	0

Results are expressed as number of patients and/or percentage.

WT, RTRs with a wild type NOD2 gene; H/h, heterozygote RTRs with a mutated NOD2 allele in either SNP8, SNP12 or SNP13 region (since no heterozygous composites or homozygous mutants were detected); DM, double mutated patients or homozygous mutants; AE, atherosclerotic events.

NOD2 gene polymorphisms in other inflammatory diseases such as Crohn's disease (5, 6) and GVHD (7). Several limitations should however be considered. The population studied was limited with regards to the frequency of polymorphism. However, the total number of patients was not very different from a previous publication associating NOD2 gene polymorphism and Crohn's disease occurrence (6). Furthermore, study design leads to include patients with a low CVD risk. However, with nearly the same cohort, we had previously shown that RTRs with TLR4 Asp299Gly polymorphism exhibited a lower risk of posttransplant AE (4). This led us to discuss the respective roles of NOD2 and TLR4 in pathogen recognition. NOD2, like TLRs, belongs to a large family of proteins involved in infectious pathogen recognition (12). As known for TLR4 at the cell membrane, intracellular NOD2 protein has been proposed to play a role in the intracytoplasmic response to bacterial cell wall products (muramyl dipeptide) and subsequent NF- κ B activation in macrophages (12). In our previous study (4), RTRs with Asp299Gly TLR-4 polymorphism were less likely to experience posttransplant AE (RR=0.44), but developed more frequently severe bacterial infections (RR=1.33) and opportunistic infections (RR=3.03). These previous data together with the present data (i.e., absence of correlation between a particular NOD2 gene polymorphism and posttransplant AE occurrence) could support the idea that bacterial infections do not play a major role in the development of atherosclerosis. The relationship between infectious pathogens and atherosclerosis, originally suggested by seroepidemiologic studies (13), was also confirmed by a series of investigations demonstrating the presence of pathogens in atherosclerotic lesions (14). On the other hand, transient prophylactic antibiotic treatment did not prevent secondary coronary syndromes (15, 16). Therefore, the etiologic or pathogenic significance of bacterial infections in CVD remains to be determined. Finally, the functional role of NOD2 is still unclear. Most studies which implicated NOD2 in pro-inflammatory NF- κ B pathway in macrophages were performed in vitro (8, 9). They suggested that the association of

NOD2 mutations was characterized by a diminished NF- κ B response (8, 9). However, the first functional study performed in vivo, using C57BL/6 mice deficient for NOD2 gene (NOD2 $-/-$ mice), did not confirm such in vitro results (17). Macrophages from NOD2 $-/-$ mice responded normally to TLR ligands in terms of NF- κ B activation and inflammatory cytokine production (17). These results suggest the absence of NOD2 implication in NF- κ B activation in macrophage. A more recent study using NOD2 $-/-$ mice reported that NOD2 was especially critical to regulate innate bacterial immunity in the intestinal tract (18). This was attested by an increased susceptibility of NOD2 $-/-$ mice to intragastric infection with *Listeria monocytogenes* but not after intravenous or intraperitoneal injection of these bacteria (18). NOD2 is highly expressed in crypts from the terminal ileum (18) in Paneth cells (19). This may explain why NOD2 mutations render patients susceptible to Crohn's diseases, a chronic inflammatory bowel disease (5, 6) and GVHD (7). It is believed that the loss of gastrointestinal tract integrity, and the translocation of endogenous endotoxins into the systemic circulation, is a critical event in the initiation of GVHD (20). Overall, NOD2 mutations may not have a major influence of vascular inflammation and this may account for the results we are reporting here. Lastly, one has to consider the potential influence of NOD2 and TLR4 ligands. TLR4 ligands are generally stronger NF- κ B activators than NOD2 ligands (12). In addition to pathogens, a number of endogenous ligands (e.g., heat shock proteins known to be present in atherosclerotic lesions, extracellular matrix proteins, . . .) have been shown to stimulate TLR4 (12). This again may explain why we found a relationship with TLR4 Asp299Gly polymorphism while not with NOD2 gene polymorphism.

In conclusion, NOD2 gene polymorphism is not associated with AE in RTRs population and should not be proposed to assess CVD risk in RTRs. These results underline recent data showing that bacterial infections are not involved in CVD (15, 16) and the major role of NOD2 is to control intestinal inflammation (18).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jackie Kerueillant for her help in preparing this manuscript.

REFERENCES

1. Kasiske BL, Guijarro C, Massy Z, et al. Cardiovascular disease after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 158.
2. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, et al. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002; 91: 281.
3. Ducloux D, Kazory A, Chalopin JM. Post-transplant diabetes mellitus and atherosclerotic events in renal transplant recipients: a prospective study. *Transplantation* 2005; 79: 438.
4. Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, et al. Relevance of Toll-Like Receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int* 2005; 67: 2454.
5. Heliö T, Halme L, Lappalainen M, et al. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 2003; 52: 558.
6. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, et al. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 2002; 359: 1661.
7. Holler E, Rogler G, Herfarth H, et al. Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2004; 104: 889.
8. Ogura Y, Inohara N, Benito A, et al. NOD2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001; 276: 4812.
9. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. NOD2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003; 278: 8869.
10. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92: 1355.
11. Ducloux D, Challier B, Saas P, et al. CD4 cell lymphopenia and atherosclerosis in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 767.
12. Philpott DJ, Girardin SE. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol Immunol* 2004; 41: 1099.
13. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, et al. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1998; 2: 983.
14. Morré SA, Stooker W, Lagrand WK, et al. Microorganisms in the aetiology of atherosclerosis. *J Clin Pathol* 2000; 53: 647.
15. Grayston JT, Kronmal RA, Jackson LA, et al. Azithromycin for the secondary prevention of coronary events. *N Engl J Med* 2005; 352: 1637.
16. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, et al. Antibiotic treatment of *Chlamydiae pneumoniae* after coronary syndrome. *N Engl J Med* 2005; 352: 1646.
17. Pauleau AL, Murray PJ. Role of NOD2 in the response of macrophages to Toll-like receptor agonists. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 7531.
18. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307: 731.
19. Ogura Y, Lala S, Xin W, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003; 52: 1591.
20. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, et al. Total body irradiations effects on acute graft versus host disease. The role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 1997; 90: 3204.

III/ Discussion

Nous n'avons pas mis en évidence d'association entre les polymorphismes du gène *NOD2* et le risque de complications athéromateuses après transplantation rénale. Aucune validation fonctionnelle des polymorphismes du gène *NOD2 in vivo*, chez l'homme, n'a été réalisée à ce jour. Les données de la littérature rassemblent uniquement des relations génotypes-phénotypes basées sur l'hypothèse, *in vitro*, d'un rôle des récepteurs NOD2/CARD15 dans la reconnaissance bactérienne aboutissant à l'activation de la voie NF-κB pro-inflammatoire. Cependant, *in vivo*, dans des modèles murins, NOD2 ne semble pas indispensable à l'activation de NF-κB dans les macrophages. Ces constatations pourraient expliquer l'absence de relation entre les polymorphismes du gène *NOD2* et l'athérosclérose.

Par ailleurs, le rôle de NOD2 dans l'immunité innée semble confiné au tractus digestif (**Kobayashi KS et al. 2005**). Les souris NOD2 *-/-* ont une sensibilité accrue à l'infection par voie gastrique à *Listeria monocytogenes*, mais pas à l'infection par voie systémique ou intra-péritonéale (**Kobayashi KS et al. 2005**). NOD2 est d'ailleurs fortement exprimé au niveau des cryptes de l'iléon terminal (**Kobayashi KS et al. 2005, Ogura Y et al. 2003**). Ceci pourrait expliquer que NOD2 soit plus particulièrement impliqué dans les pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin comme la maladie de Crohn ou la GVHD (**Hélio T et al. 2003, Hampe J et al. 2002, Holler E et al. 2004**). NOD2 aurait donc surtout pour rôle de contrôler l'inflammation intestinale. Ce tropisme digestif explique également l'absence de relation observées entre les différents polymorphismes du gène *NOD2* et les autres maladies inflammatoires chroniques post-transplantation étudiés dans nos travaux.

PROJETS

Nos travaux confirment que les mécanismes immunologiques et particulièrement ceux impliquant l'immunité innée sont opérants chez le patient transplanté rénal. En effet, certaines modulations de l'immunité innée (modulation des capacités de production d'IL-6, d'induction de la voie enzymatique COX-2 et de chimiotactisme du couple CX3CR1/CX3CL1) influencent la réponse inflammatoire chronique de plusieurs manières, avec un impact réel sur la survenue de complications post-transplantation rénale telles que l'athérosclérose, le NODAT, les cancers et la dysfonction chronique du greffon.

Ces travaux apportent des éléments nouveaux pour la compréhension des mécanismes impliqués dans ces différentes pathologies et pourraient servir à mieux caractériser des patients à risque concernant ces complications. De ces connaissances acquises pourraient également dériver des stratégies thérapeutiques qu'il nous faudrait bien sur valider afin d'en estimer le réel bénéfice dans la prise en charge globale des patients transplantés.

Nos projets en cours et à venir s'inscrivent donc dans une volonté de poursuivre un plan de recherche translationnelle dont l'axe thématique centrale est l'étude des interactions entre inflammation et complications après transplantation rénale. La caractérisation de prédispositions immuno-génétiques aux complications post-transplantation rénale constitue une partie de cette recherche avec le souci de mêler études cognitives et études interventionnelles.

Approche immuno-génétique

L'approche immuno-génétique doit être développée selon des critères méthodologiques stricts permettant de garantir au mieux la validité des résultats. Ces exigences sont dérivées des recommandations éditées par Nature Genetics et par le groupe STREGA (**Editorial. Freely**

associating 1999, Little A et al. 2009). Les critères principaux sont la plausibilité de l'hypothèse, la taille de l'effectif suffisante, la reproductibilité des résultats dans une seconde cohorte, l'ajustement pour les comparaisons multiples, la vérification de la fonctionnalité du polymorphisme et l'évaluation d'un effet de stratification. Ces exigences ont guidées nos évaluations et ont conditionnées la publication de nos travaux. Cette rigueur nécessaire permet de limiter les risques inhérents aux études d'association génétique.

La littérature médicale s'intéressant aux facteurs génétiques de prédisposition à des événements post-transplantation rénale, se base, actuellement, uniquement sur une approche gène-candidat. La majorité de ces études s'est intéressée aux polymorphismes de gènes de cytokines (**Goldfarb-Rumyantzev AS et al. 2008**). Par ailleurs, ces études sont uni ou bi-centriques, rétrospectives avec les différents biais que cela implique. Pour faire suite à l'approche gène candidats présente dans ce travail, une seconde orientation est donc à venir, correspondant à celle d'une approche pan-génomique restreinte aux gènes de l'immunité (approche génome-wide). Dans ce sens, une étude prospective multicentrique est actuellement en place depuis 2008 dans la région Est (**O**rientation de la **r**éponse **l**ymphocytaire après transplantation rénale [ORLY-Est] ayant pour but initial de déterminer l'influence de l'orientation de la réponse lymphocytaire dans la survenue de complications athéromateuses. Plusieurs types d'analyses sont prévues (phénotypiques, immuno-génétiques et dynamiques). Le matériel génétique collecté lors de cette étude sera également utilisé pour des études d'association pan-génomiques.

Approche interventionnelle

Identifier des prédispositions génétiques à la survenue de complications après transplantation rénale permet d'élucider certains mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces maladies, mais ceci a également pour but de mieux caractériser une population à risque afin

de lui proposer une prise en charge préventive, thérapeutique, individualisée à ce risque. Les études interventionnelles sont donc indispensables pour évaluer le réel intérêt clinique de ces études de polymorphismes.

Concernant le NODAT, nous avons l'intention de mettre en place une étude thérapeutique basée sur différentes stratégies d'évaluation du risque de NODAT. Prédire le risque de NODAT est un enjeu important car les traitements immunosuppresseurs ont eux même un effet diabétogène variable d'une molécule à l'autre. Ainsi la capacité de prédire au mieux le risque de diabète pourrait permettre de moduler le traitement immunosuppresseur et par exemple privilégier l'utilisation de la cyclosporine par rapport au tacrolimus chez des patients à fort risque de NODAT. Toutefois il est nécessaire de valider cette approche en s'assurant de ne pas exposer le patient à un risque de rejet aigu plus important. Nous avons montré que la capacité de production d'IL-6, influencée par le polymorphisme du promoteur de ce gène, est prédictive de la survenue d'un NODAT. De plus la connaissance du génotype -174G/C double la valeur prédictive positive d'un IMC au-delà de la valeur seuil de surpoids. Nous avons donc fait l'hypothèse qu'une stratégie de prévention incluant IMC et génotype -174G/C réduirait l'incidence d'un critère composite incluant la survenue d'un diabète et/ou d'un rejet aigu par rapport à une stratégie basée uniquement sur l'IMC. Le déroulement de l'étude randomisée, prospective, multicentrique proposée est schématisé **Figure 25**.

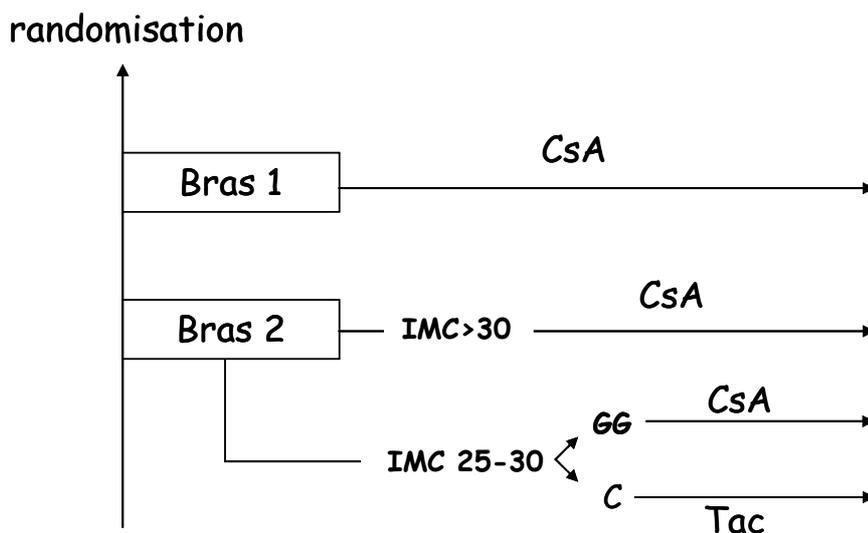


Figure 25: Les patients sont randomisés en 2 bras. Le bras 1 reçoit un traitement basé sur la cyclosporine (CsA)/ Le bras 2 reçoit un traitement variable selon l'index de masse corporelle (IMC) et le génotypage -174G/C. Les patients ayant un IMC>30 ont un traitement par CsA tout comme les patients de génotype GG. En revanche, les patients porteurs de l'allèle C moins à risque du fait d'une capacité moindre à synthétiser l'IL-6 reçoivent un traitement à base de tacrolimus (Tac).

De la même manière l'étude des polymorphismes du gène de CX3CR1 présentée dans ce travail, pourrait permettre chez les patients transplantés rénaux d'identifier une population à risque accru de cancer et ainsi améliorer la prise en charge de ces patients en leur proposant également une stratégie thérapeutique immunosuppressive différente. Il serait en effet possible d'envisager, chez ces patients transplantés ayant un sur-risque de cancer (I249M280) une conversion, plus ou moins précoce après la transplantation rénale, d'immunosuppression vers les inhibiteurs de mTOR.

L'immunité innée a longtemps été sous estimée en transplantation rénale, au profit de l'immunité adaptative. Les travaux présentés ici soulignent le fait que l'immunité innée est effective chez le patient transplanté rénal, est probablement moins sujette à l'influence des thérapeutiques immunosuppressives et que son étude a une importance réelle dans la

compréhension de certains mécanismes physiopathologiques impliqués dans les complications, notamment inflammatoires chroniques, observées après transplantation rénale. Une meilleure connaissance de son rôle permettrait ainsi d'améliorer la prise en charge des patients transplantés rénaux.

BIBLIOGRAPHIE

- Abedini S, Holme I, März W, Weihrauch G, Fellström B, Jardine A, Cole E, Maes B, Neumayer HH, Grønhagen-Riska C, Ambühl P, Holdaas H; ALERT study group. Inflammation in renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009; 4: 1246-54
- Abdi R, Tran TB, Sahagun-Ruiz A, Murphy PM, Brenner BM, Milford EL, McDermott DH. Chemokine receptor polymorphism and risk of acute rejection in human renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 754-8
- Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, Vasiliauskas EA, Kam LY, Rojany M, Papadakis KA, Rotter JI, Targan SR, Yang H. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002; 123: 679-88
- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005; 105: 1815-22
- Akira S, Takeda K. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C R Biol*. 2004; 327: 581-9
- Alakulppi NS, Kyllönen LE, Jäntti VT, Matinlauri IH, Partanen J, Salmela KT, Laine JT. Cytokine gene polymorphisms and risks of acute rejection and delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation*. 2004; 78: 1422-8
- Alvarez-Llamas G, Szalowska E, de Vries MP, Weening D, Landman K, Hoek A, Wolffenbuttel BH, Roelofsen H, Vonk RJ. Characterization of the human visceral adipose tissue secretome. *Mol Cell Proteomics*. 2007; 6: 589-600
- Anderson CB, Graff RJ, Jaffe BM. Prostaglandin E prolongation of murine skin allografts. *Surg Forum*. 1976; 27: 330-2

- Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* 2008; 34: 2-11
- Apostolakis S, Baritaki S, Kochiadakis GE, Igoumenidis NE, Panutsopoulos D, Spandidos DA. Effects of polymorphisms in chemokine ligands and receptors on susceptibility to coronary artery disease. *Thromb Res.* 2007; 119: 63-71
- Areschoug T, Gordon S. Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands. *Contrib Microbiol.* 2008; 15: 45-60
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 257: 79-83
- Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schürmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med.* 2000; 6: 583-8
- Babel N, Cherepnev G, Kowalenko A, Horstrup J, Volk HD, Reinke P. Nonimmunologic complications and gene polymorphisms of immunoregulatory cytokines in long-term renal transplants. *Kidney Int.* 2004; 66: 428-32
- Backlund MG, Mann JR, Dubois RN. Mechanisms for the prevention of gastrointestinal cancer: the role of prostaglandin E2. *Oncology.* 2005; 69: 28-32

- Bakri RS, Afzali B, Covic A, Sriskantharan R, Bharna-Ariza P, Park WH, Sriharan M, Dalton N, Wierzbicki AS, Crook MA, Goldsmith DJ. Cardiovascular disease in renal allograft recipients is associated with elevated sialic acid or markers of inflammation. *Clin Transplant*. 2004; 18: 201-4
- Bamoulid J, Courivaud C, Deschamps M, Mercier P, Ferrand C, Penfornis A, Tiberghien P, Chalopin JM, Saas P, Ducloux D. IL-6 promoter polymorphism -174 is associated with new-onset diabetes after transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 2333-40
- Banas MC, Banas B, Hudkins KL, Wietecha TA, Iyoda M, Bock E, Hauser P, Pippin JW, Shankland SJ, Smith KD, Stoelcker B, Liu G, Gröne HJ, Krämer BK, Alpers CE. TLR4 links podocytes with the innate immune system to mediate glomerular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19: 704-13
- Baratelli F, Lin Y, Zhu L, Yang SC, Heuzé-Vourc'h N, Zeng G, Reckamp K, Dohadwala M, Sharma S, Dubinett SM. Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J Immunol*. 2005; 175: 1483-90
- Barzilay JI, Abraham L, Heckbert SR, Cushman M, Kuller LH, Resnick HE, Tracy RP. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Diabetes*. 2001; 50: 2384-9
- Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85: 3338-42
- Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87: 2084-9

- Bayés B, Granada ML, Pastor MC, Lauzurica R, Salinas I, Sanmarti A, Espinal A, Serra A, Navarro M, Bonal J, Romero R. Obesity, adiponectin and inflammation as predictors of new-onset diabetes mellitus after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2007; 7: 416-22
- Bell-Parikh LC, Ide T, Lawson JA, McNamara P, Reilly M, FitzGerald GA. Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and the ligation of PPARgamma. *J Clin Invest.* 2003; 112: 945-55
- Bennermo M, Held C, Stemme S, Ericsson CG, Silveira A, Green F, Tornvall P. Genetic predisposition of the interleukin-6 response to inflammation: implications for a variety of major diseases? *Clin Chem.* 2004; 50: 2136-40
- Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2002; 13: 84-9
- Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, Bottino C, Moretta A. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev.* 2001; 181: 203-14
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17: 189-220
- Bobryshev YV, Lord RS. Expression of heat shock protein-70 by dendritic cells in the arterial intima and its potential significance in atherogenesis. *J Vasc Surg.* 2002; 35: 368-75
- Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ; VIGOR Study Group. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med.* 2000; 343: 1520-8

- Bordea C, Wojnarowska F, Millard PR, Doll H, Welsh K, Morris PJ. Skin cancers in renal-transplant recipients occur more frequently than previously recognized in a temperate climate. *Transplantation*. 2004; 77: 574-9
- Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998; 394: 894-7
- Brash AR. Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J Clin Invest*. 2001 Jun;107(11):1339-4
- Brosens LA, Iacobuzio-Donahue CA, Keller JJ, Hustinx SR, Carvalho R, Morsink FH, Hyland LM, Offerhaus GJ, Giardiello FM, Goggins M. Increased cyclooxygenase-2 expression in duodenal compared with colonic tissues in familial adenomatous polyposis and relationship to the -765G → C COX-2 polymorphism. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 4090-6.
- Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, Dhamrait S, Luong L, Rumley A, Lowe GD, Humphries SE. Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 1458-63
- Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90: 2282-9
- Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med*. 2005; 11: 183-90
- Caillard S, Lelong C, Pessione F, Moulin B; French PTLD Working Group. Post-transplant lymphoproliferative disorders occurring after renal transplantation in adults: report of 230 cases from the French Registry. *Am J Transplant*. 2006; 6: 2735-42

- Cartwright NH, Keen LJ, Demaine AG, Hurlock NJ, McGonigle RJ, Rowe PA, Shaw JF, Szydlo RM, Kaminski ER. A study of cytokine gene polymorphisms and protein secretion in renal transplantation. *Transpl Immunol.* 2001; 8: 237-44
- Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A, Segafredo C, Nibbelink M, André M, Casteilla L, Pénicaud L. Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Lett.* 2005; 579: 3487-92
- Catley MC, Chivers JE, Cambridge LM, Holden N, Slater DM, Staples KJ, Bergmann MW, Loser P, Barnes PJ, Newton R. IL-1beta-dependent activation of NF-kappaB mediates PGE2 release via the expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase. *FEBS Lett.* 2003; 547: 75-9
- Chan WL, Pejnovic N, Hamilton H, Liew TV, Popadic D, Poggi A, Khan SM. Atherosclerotic abdominal aortic aneurysm and the interaction between autologous human plaque-derived vascular smooth muscle cells, type 1 NKT, and helper T cells. *Circ Res.* 2005; 96: 675-83
- Chan CM, Ma BB, Hui EP, Wong SC, Mo FK, Leung SF, Kam MK, Chan AT. Cyclooxygenase-2 expression in advanced nasopharyngeal carcinoma--a prognostic evaluation and correlation with hypoxia inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor. *Oral Oncol.* 2007 Apr;43(4):373-8
- Charrière G, Cousin B, Arnaud E, André M, Bacou F, Penicaud L, Casteilla L. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem.* 2003; 278: 9850-5
- Chen X, Cushman SW, Pannell LK, Hess S. Quantitative proteomic analysis of the secretory proteins from rat adipose cells using a 2D liquid chromatography-MS/MS approach. *J Proteome Res.* 2005; 4: 570-7
- Cheng PT, Mukherjee R. PPARs as targets for metabolic and cardiovascular diseases. *Mini Rev Med Chem.* 2005; 5: 741-53

- Christiansen T, Richelsen B, Bruun JM. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *Int J Obes (Lond)*. 2005; 29: 146-50
- Chtanova T, Kemp RA, Sutherland AP, Ronchese F, Mackay CR. Gene microarrays reveal extensive differential gene expression in both CD4(+) and CD8(+) type 1 and type 2 T cells. *J Immunol*. 2001; 167: 3057-63
- Chung YC, Chang YF. Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2003; 83: 222-6
- Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Fazia M, De Cesare D, Iezzi A, Uchino S, Boccoli G, Saba V, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation*. 2001; 104: 921-7
- Cipollone F, Toniato E, Martinotti S, Fazia M, Iezzi A, Cuccurullo C, Pini B, Ursi S, Vitullo G, Averna M, Arca M, Montali A, Campagna F, Uchino S, Spigonardo F, Taddei S, Viridis A, Ciabattini G, Notarbartolo A, Cuccurullo F, Mezzetti A; Identification of New Elements of Plaque Stability (INES) Study Group. A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke. *JAMA*. 2004; 291: 2221-8
- Cipollone F, Fazia M, Mezzetti A. Novel determinants of plaque instability. *J Thromb Haemost*. 2005; 3: 1962-75
- Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med*. 2000; 191: 189-94

- Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem.* 1998; 273: 23799-804
- Combadière C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, Debré P, Tedgui A, Murphy PM, Mallat Z. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation.* 2003; 107: 1009-16
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001; 22: 633-40
- Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol.* 2004; 25: 47-52
- Cosio FG, Pesavento TE, Osei K, Henry ML, Ferguson RM. Post-transplant diabetes mellitus: increasing incidence in renal allograft recipients transplanted in recent years. *Kidney Int.* 2001; 59: 732-7
- Cosio FG, Pesavento TE, Kim S, Osei K, Henry M, Ferguson RM. Patient survival after renal transplantation: IV. Impact of post-transplant diabetes. *Kidney Int.* 2002; 62: 1440-6
- Courivaud C, Bamoulid J, Loupy A, Deschamps M, Ferrand C, Le Corre D, Tiberghien P, Chalopin JM, Legendre C, Thervet E, Saas P, Ducloux D. Influence of cyclooxygenase-2 (COX-2) gene promoter polymorphism -765 on graft loss after renal transplantation. *Am J Transplant.* 2009; 9: 2752-7
- Courivaud C, Ladrière M, Caillard S, Toupance O, Hurault de Ligny B, Ryckelynck JP, Rieu P, Moulin B, Frimat L, Chauvé S, Kazory A, Chalopin JM, Ducloux D. Impact of dialysis modality on post-transplant diabetes. *Clinical Transplant.* 2010; *in press*
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002; 420: 860-7

- Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002; 122: 867-74
- Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Maffia P, Patel NS, Di Paola R, Ialenti A, Genovese T, Chatterjee PK, Di Rosa M, Caputi AP, Thiemermann C. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2004; 483: 79-93
- Cybulsky MI, Hegele RA. The fractalkine receptor CX3CR1 is a key mediator of atherogenesis. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1118-20
- Davidson J, Wilkinson A, Dantal J, Dotta F, Haller H, Hernández D, Kasiske BL, Kiberd B, Krentz A, Legendre C, Marchetti P, Markell M, van der Woude FJ, Wheeler DC; International Expert Panel. New-onset diabetes after transplantation: 2003 International consensus guidelines. Proceedings of an international expert panel meeting. Barcelona, Spain, 19 February 2003. *Transplantation*. 2003; 75: S3-2
- Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring - the cause of acute myocardial infarction, sudden cardiac ischemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 1985; 53: 363-73
- DeBette S, Bevan S, Dartigues JF, Sitzer M, Lorenz M, Ducimetière P, Amouyel P, Markus HS. Fractalkine receptor/ligand genetic variants and carotid intima-media thickness. *Stroke*. 2009; 40: 2212-4
- De Groot K, Kuklik K, Bröcker V, Schwarz A, Gwinner W, Kreipe H, Haller H, Fliser D, Mengel M. Toll-like receptor 2 and renal allograft function. *Am J Nephrol*. 2008; 28: 583-8

- De Groot K, Kuklik K, Bröcker V, Schwarz A, Gwinner W, Kreipe H, Haller H, Fliser D, Mengel M. Toll-like receptor 2 and renal allograft function. *Am J Nephrol.* 2008; 28: 583-8
- Dendorfer U, Oettgen P, Libermann TA. Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol.* 1994; 14: 4443-54
- Denkert C, Köbel M, Berger S, Siegert A, Leclere A, Trefzer U, Hauptmann S. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 2001; 61: 303-8
- Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPAR α -leukotriene B₄ pathway to inflammation control. *Nature.* 1996; 384: 39-43
- Doherty TM, Fisher EA, Arditi M. TLR signaling and trapped vascular dendritic cells in the development of atherosclerosis. *Trends Immunol.* 2006; 27: 222-7
- Ducloux D, Carron PL, Racadot E, Rebibou JM, Bresson-Vautrin C, Saint-Hillier T, Chalopin JM. CD4 lymphocytopenia in a long-term renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 1998; 30: 2859-60
- Ducloux D, Challier B, Saas P, Tiberghien P, Chalopin JM. CD4 cell lymphopenia and atherosclerosis in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: 767-72
- Ducloux D, Kazory A, Chalopin JM. Predicting coronary heart disease in renal transplant recipients: a prospective study. *Kidney Int.* 2004; 66: 441-7
- Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, Ferrand C, Bamoulid J, Saas P, Kazory A, Chalopin JM, Tiberghien P. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int.* 2005; 67: 2454-61
- Ducloux D, Kazory A, Chalopin JM. Posttransplant diabetes mellitus and atherosclerotic events in renal transplant recipients: a prospective study. *Transplantation.* 2005; 79: 438-43

- Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, Bang H, Couper D, Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Heiss G. Adiponectin and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes*. 2004; 53: 2473-8
- Einspahr JG, Stratton SP, Bowden GT, Alberts DS. Chemoprevention of human skin cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002; 41: 269-85
- Einstein FH, Atzmon G, Yang XM, Ma XH, Rincon M, Rudin E, Muzumdar R, Barzilai N. Differential responses of visceral and subcutaneous fat depots to nutrients. *Diabetes*. 2005; 54: 672-8
- Ekberg H, Grinyó J, Nashan B, Vanrenterghem Y, Vincenti F, Voulgari A, Truman M, Nasmyth-Miller C, Rashford M. Cyclosporine sparing with mycophenolate mofetil, daclizumab and corticosteroids in renal allograft recipients: the CAESAR Study. *Am J Transplant*. 2007; 7: 560-70
- Ekobom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med*. 1990; 323: 1228-33
- Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med*. 2003; 348: 1681-91
- Fabrega AJ, Blanchard J, Rivas PA, Moran SM, Pollak R. Prolongation of rat heart allograft survival using cyclosporine and enisoprost, a prostaglandin E1 analog. *Transplantation*. 1992; 53: 1363-4
- Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004; 145: 2273-82

Fain JN, Tichansky DS, Madan AK. Most of the interleukin 1 receptor antagonist, cathepsin S, macrophage migration inhibitory factor, nerve growth factor, and interleukin 18 release by explants of human adipose tissue is by the non-fat cells, not by the adipocytes. *Metabolism*. 2006; 55: 1113-21

Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92: 657-71

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115: 911-9

Faure S, Meyer L, Costagliola D, Vaneensberghe C, Genin E, Autran B, Delfraissy JF, McDermott DH, Murphy PM, Debré P, Théodorou I, Combadière C. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science*. 2000; 287: 2274-7

Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*. 2000; 105: 1049-56

Fischer SM, Lo HH, Gordon GB, Seibert K, Kelloff G, Lubet RA, Conti CJ. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, and indomethacin against ultraviolet light-induced skin carcinogenesis. *Mol Carcinog*. 1999; 25: 231-40

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*. 1998; 102: 1369-76

Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel DD. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med*. 1998; 188: 1413-9

- Fong AM, Alam SM, Imai T, Haribabu B, Patel DD. CX3CR1 tyrosine sulfation enhances fractalkine-induced cell adhesion. *J Biol Chem.* 2002; 277: 19418-23
- Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes.* 2007; 56: 1010-3
- Ford ES. The metabolic syndrome and C-reactive protein, fibrinogen, and leukocyte count: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis.* 2003; 168: 351-8
- Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasan RS, Murabito JM, Meigs JB, Cupples LA, D'Agostino RB Sr, O'Donnell CJ. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2007; 116: 39-48
- Franchi L, Park JH, Shaw MH, Marina-Garcia N, Chen G, Kim YG, Núñez G. Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol.* 2008; 10: 1-8
- Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev.* 2009; 227: 106-28
- Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, Belmont JW, Boudreau A, Hardenbol P, Leal SM, Pasternak S, Wheeler DA, Willis TD, Yu F, Yang H, Zeng C, Gao Y, Hu H, Hu W, Li C, Lin W, Liu S, Pan H, Tang X, Wang J, Wang W, Yu J, Zhang B, Zhang Q, Zhao H, Zhao H, Zhou J, Gabriel SB, Barry R, Blumenstiel B, Camargo A, Defelice M, Faggart M, Goyette M, Gupta S, Moore J, Nguyen H, Onofrio RC, Parkin M, Roy J, Stahl E, Winchester E, Ziaugra L, Altshuler D, Shen Y, Yao Z, Huang W, Chu X, He Y, Jin L, Liu Y, Shen Y, Sun W, Wang H, Wang Y, Wang Y, Xiong X, Xu L, Wayne MM, Tsui SK, Xue H, Wong JT, Galver LM, Fan JB, Gunderson K, Murray SS, Oliphant AR, Chee MS, Montpetit A, Chagnon F, Ferretti

V, Leboeuf M, Olivier JF, Phillips MS, Roumy S, Sallée C, Verner A, Hudson TJ, Kwok PY, Cai D, Koboldt DC, Miller RD, Pawlikowska L, Taillon-Miller P, Xiao M, Tsui LC, Mak W, Song YQ, Tam PK, Nakamura Y, Kawaguchi T, Kitamoto T, Morizono T, Nagashima A, Ohnishi Y, Sekine A, Tanaka T, Tsunoda T, Deloukas P, Bird CP, Delgado M, Dermitzakis ET, Gwilliam R, Hunt S, Morrison J, Powell D, Stranger BE, Whittaker P, Bentley DR, Daly MJ, de Bakker PI, Barrett J, Chretien YR, Maller J, McCarroll S, Patterson N, Pe'er I, Price A, Purcell S, Richter DJ, Sabeti P, Saxena R, Schaffner SF, Sham PC, Varilly P, Altshuler D, Stein LD, Krishnan L, Smith AV, Tello-Ruiz MK, Thorisson GA, Chakravarti A, Chen PE, Cutler DJ, Kashuk CS, Lin S, Abecasis GR, Guan W, Li Y, Munro HM, Qin ZS, Thomas DJ, McVean G, Auton A, Bottolo L, Cardin N, Eyheramendy S, Freeman C, Marchini J, Myers S, Spencer C, Stephens M, Donnelly P, Cardon LR, Clarke G, Evans DM, Morris AP, Weir BS, Tsunoda T, Mullikin JC, Sherry ST, Feolo M, Skol A, Zhang H, Zeng C, Zhao H, Matsuda I, Fukushima Y, Macer DR, Suda E, Rotimi CN, Adebamowo CA, Ajayi I, Aniagwu T, Marshall PA, Nkwodimmah C, Royal CD, Leppert MF, Dixon M, Peiffer A, Qiu R, Kent A, Kato K, Niikawa N, Adewole IF, Knoppers BM, Foster MW, Clayton EW, Watkin J, Gibbs RA, Belmont JW, Muzny D, Nazareth L, Sodergren E, Weinstock GM, Wheeler DA, Yakub I, Gabriel SB, Onofrio RC, Richter DJ, Ziaugra L, Birren BW, Daly MJ, Altshuler D, Wilson RK, Fulton LL, Rogers J, Burton J, Carter NP, Clee CM, Griffiths M, Jones MC, McLay K, Plumb RW, Ross MT, Sims SK, Willey DL, Chen Z, Han H, Kang L, Godbout M, Wallenburg JC, L'Archevêque P, Bellemare G, Saeki K, Wang H, An D, Fu H, Li Q, Wang Z, Wang R, Holden AL, Brooks LD, McEwen JE, Guyer MS, Wang VO, Peterson JL, Shi M, Spiegel J, Sung LM, Zacharia LF, Collins FS, Kennedy K,

- Jamieson R, Stewart J. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007; 449: 851-61
- Freely associating. *Nature Genetics* 1999; 22: 1-2
- Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83: 847-50
- Gao W, Topham PS, King JA, Smiley ST, Csizmadia V, Lu B, Gerard CJ, Hancock WW. Targeting of the chemokine receptor CCR1 suppresses development of acute and chronic cardiac allograft rejection. *J Clin Invest*. 2000; 105: 35-44
- Gao Z, Chen YF, Randlett MD, Zhao XC, Findell JL, Kieber JJ, Schaller GE. Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis through participation in ethylene receptor signaling complexes. *J Biol Chem*. 2003; 278: 34725-32
- Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84: 7251-5
- Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991; 351: 355-6
- Gazouli M, Zavos G, Papaconstantinou I, Lukas JC, Zografidis A, Boletis J, Kostakis A. The interleukin-6-174 promoter polymorphism is associated with a risk of development of Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients. *Anticancer Res*. 2004; 24: 1311-4
- Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Montano RF. Risk of adverse post-transplant events after kidney allograft transplantation as predicted by CTLA-4 +49 and TNF-alpha -308 single nucleotide polymorphisms: a preliminary study. *Transpl Immunol*. 2006; 16: 194-9

- Ghilardi G, Biondi ML, Turri O, Guagnellini E, Scorza R. Internal carotid artery occlusive disease and polymorphisms of fractalkine receptor CX3CR1: a genetic risk factor. *Stroke*. 2004; 35: 1276-9
- Gill JS, Ma I, Landsberg D, Johnson N, Levin A. Cardiovascular events and investigation in patients who are awaiting cadaveric kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16: 808-16
- Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut*. 1994; 35: 1590-2
- Gillespie KM, Nolsøe R, Betin VM, Kristiansen OP, Bingley PJ, Mandrup-Poulsen T, Gale EA. Is puberty an accelerator of type 1 diabetes in IL6-174CC females? *Diabetes*. 2005; 54: 1245-8
- Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001; 104: 503-16
- Goldstein DR, Tesar BM, Akira S, Lakkis FG. Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1571-8
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 23-35
- Greaves DR, Häkkinen T, Lucas AD, Liddiard K, Jones E, Quinn CM, Senaratne J, Green FR, Tyson K, Boyle J, Shanahan C, Weissberg PL, Gordon S, Ylä-Herttualla S. Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 923-9
- Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*. 1998; 2: 275-81

- Hackett D, Davies G, Maseri A. Pre-existing coronary stenoses in patients with first myocardial infarction are not necessarily severe. *Eur Hearth J* 1988; 9: 1317-23
- Hahn AB, Kasten-Jolly JC, Constantino DM, Graffunder E, Singh TP, Shen GK, Conti DJ. TNF-alpha, IL-6, IFN-gamma, and IL-10 gene expression polymorphisms and the IL-4 receptor alpha-chain variant Q576R: effects on renal allograft outcome. *Transplantation*. 2001; 72: 660-5
- Hakim FT, Gress RE. Immunosenescence : deficits in adaptative immunity in the elderly. *Tissue Antigens*. 2007; 70: 179-89
- Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res*. 2002; 62: 1676-81
- Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJ, Mascheretti S, Jahnsen J, Moum B, Klump B, Krawczak M, Mirza MM, Foelsch UR, Vatn M, Schreiber S. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet*. 2002; 359: 1661-5
- Hancock WW, Gao W, Faia KL, Csizmadia V. Chemokines and their receptors in allograft rejection. *Curr Opin Immunol*. 2000; 12: 511-6
- Hancock WW, Lu B, Gao W, Csizmadia V, Faia K, King JA, Smiley ST, Ling M, Gerard NP, Gerard C. Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J Exp Med*. 2000; 192: 1515-20
- Hansson GK, Libby P, Schönbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*. 2002; 91: 281-91
- Hansen-Petrik MB, McEntee MF, Jull B, Shi H, Zemel MB, Whelan J. Prostaglandin E(2) protects intestinal tumors from nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced regression in *Apc(Min/+)* mice. *Cancer Res*. 2002; 62: 403-8

- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1685-95
- Haskell CA, Hancock WW, Salant DJ, Gao W, Csizmadia V, Peters W, Faia K, Fituri O, Rottman JB, Charo IF. Targeted deletion of CX(3)CR1 reveals a role for fractalkine in cardiac allograft rejection. *J Clin Invest.* 2001; 108: 679-88
- Harman-Boehm I, Blüher M, Redel H, Sion-Vardy N, Ovadia S, Avinoach E, Shai I, Klötting N, Stumvoll M, Bashan N, Rudich A. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 2240-7
- Hazzan M, Labalette M, Copin MC, Glowacki F, Provôt F, Pruv FR, Noël C. Predictive factors of acute rejection after early cyclosporine withdrawal in renal transplant recipients who receive mycophenolate mofetil: results from a prospective, randomized trial. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16: 2509-16
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 1990; 265: 621-36
- Heliö T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P, Turunen U, Färkkilä M, Krusius T, Kontula K. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut.* 2003; 52: 558-62
- Herbert A, Liu C, Karamohamed S, Schiller J, Liu J, Yang Q, Wilson PW, Cupples LA, Meigs JB. The -174 IL-6 GG genotype is associated with a reduced risk of type 2 diabetes mellitus in a family sample from the National Heart, Lung and Blood Institute's Framingham Heart Study. *Diabetologia.* 2005; 48: 1492-5
- Herschman HR, Xie W, Reddy S. Inflammation, reproduction, cancer and all that.... The regulation and role of the inducible prostaglandin synthase. *Bioessays.* 1995; 17: 1031-7

- Higashi Y, Kanekura T, Kanzaki T. Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. *Int J Cancer*. 2000; 86: 667-71
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002; 420: 333-6
- Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003; 124: 993-1000
- Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2004 5: 971-4
- Holler E, Rogler G, Herfarth H, Brenmoehl J, Wild PJ, Hahn J, Eissner G, Schölmerich J, Andreesen R. Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2004; 104: 889-94
- Holler E, Rogler G, Brenmoehl J, Hahn J, Greinix H, Dickinson AM, Socie G, Wolff D, Finke J, Fischer G, Jackson G, Rocha V, Hilgendorf I, Eissner G, Marienhagen J, Andreesen R. The role of genetic variants of NOD2/CARD15, a receptor of the innate immune system, in GvHD and complications following related and unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet*. 2008; 35: 381-4
- Horuk R, Clayberger C, Krensky AM, Wang Z, Grone HJ, Weber C, Weber KS, Nelson PJ, May K, Rosser M, Dunning L, Liang M, Buckman B, Ghannam A, Ng HP, Islam I, Bauman JG, Wei GP, Monahan S, Xu W, Snider RM, Morrissey MM, Hesselgesser J, Perez HD. A non-peptide functional antagonist of the CCR1 chemokine receptor is effective in rat heart transplant rejection. *J Biol Chem*. 2001; 276: 4199-204

- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993; 259: 87-91
- Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 1595-9
- Hu FB, Meigs JB, Li TY, Rifai N, Manson JE. Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. 2004. *Diabetes*; 53: 693-700
- Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell*. 1997; 91: 521-30
- Inoue T, Takayanagi K, Morooka S, Uehara Y, Oda H, Seiki K, Nakajima H, Urade Y. Serum prostaglandin D synthase level after coronary angioplasty may predict occurrence of restenosis. *Thromb Haemost*. 2001; 85: 165-7
- Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004; 5: 987-95
- Janabi M, Yamashita S, Hirano K, Sakai N, Hiraoka H, Matsumoto K, Zhang Z, Nozaki S, Matsuzawa Y. Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 1953-60
- Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 197-216

- Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998; 391: 82-6
- Johnson RW, Kreis H, Oberbauer R, Brattström C, Claesson K, Eris J. Sirolimus allows early cyclosporine withdrawal in renal transplantation resulting in improved renal function and lower blood pressure. *Transplantation*. 2001; 72: 777-86
- Kai H, Kitadai Y, Kodama M, Cho S, Kuroda T, Ito M, Tanaka S, Ohmoto Y, Chayama K. Involvement of proinflammatory cytokines IL-1beta and IL-6 in progression of human gastric carcinoma. *Anticancer Res*. 2005; 25: 709-13
- Kasiske BL, Guijarro C, Massy ZA, Wiederkehr MR, Ma JZ. Cardiovascular disease after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 1996; 7: 158-65
- Kasiske BL, Chakkerla HA, Roel J. Explained and unexplained ischemic heart disease risk after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2000; 11: 1735-43
- Kasiske BL, Vazquez MA, Harmon WE, Brown RS, Danovitch GM, Gaston RS, Roth D, Scandling JD, Singer GG. Recommendations for the outpatient surveillance of renal transplant recipients. American society of transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2000; S15: S1-86
- Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D, Matas AJ. Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant*. 2003; 3: 178-85
- Kasiske BL, Maclean JR, Snyder JJ. Acute myocardial infarction and kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 900-7
- Kaufmann SH, Blum C, Yamamoto S. Crosstalk between alpha/beta T cells and gamma/delta T cells in vivo: activation of alpha/beta T-cell responses after gamma/delta T-cell modulation with the monoclonal antibody GL3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 ; 90: 9620-4

- Kawamori T, Uchiya N, Sugimura T, Wakabayashi K. Enhancement of colon carcinogenesis by prostaglandin E2 administration. *Carcinogenesis*. 2003; 24: 985-90
- Kiechl S, Wiedermann CJ, Willeit J. Toll-like receptor 4 and atherogenesis. *Ann Med*. 2003; 35: 164-71
- Kelley VE, Winkelstein A, Izui S. Effect of prostaglandin E on immune complex nephritis in NZB/W mice. *Lab Invest*. 1979; 41: 531-7
- Khuri FR, Wu H, Lee JJ, Kemp BL, Lotan R, Lippman SM, Feng L, Hong WK, Xu XC. Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2001; 7: 861-7
- Kim JA, Territo MC, Wayner E, Carlos TM, Parhami F, Smith CW, Haberland ME, Fogelman AM, Berliner JA. Partial characterization of leukocyte binding molecules on endothelial cells induced by minimally oxidized LDL. *Arterioscler Thromb*. 1994 ; 14: 427-33
- Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, Yuan M, Li ZW, Karin M, Perret P, Shoelson SE, Shulman GI. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest*. 2001; 108: 437-46
- Kim S, Iizuka K, Aguila HL, Weissman IL, Yokoyama WM. In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 2731-6
- Kimouli M, Miyakis S, Georgakopoulos P, Neofytou E, Achimastos AD, Spandidos DA. Polymorphisms of fractalkine receptor CX3CR1 gene in patients with symptomatic and asymptomatic carotid artery stenosis. *J Atheroscler Thromb*. 2009; 16: 604-10
- Kiss E, Adams J, Gröne HJ, Wagner J. Isotretinoin ameliorates renal damage in experimental acute renal allograft rejection. *Transplantation*. 2003; 76: 480-9

- Kiss E, Popovic ZV, Bedke J, Adams J, Bonrouhi M, Babelova A, Schmidt C, Edenhofer F, Zschiedrich I, Domhan S, Abdollahi A, Schäfer L, Gretz N, Porubsky S, Gröne HJ. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma can inhibit chronic renal allograft damage. *Am J Pathol.* 2010; 176: 2150-62
- Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science.* 2005; 307: 731-4
- Koh IH, Kim PC, Chung SW, Waddell T, Wong PY, Gorczynski R, Levy GA, Cohen Z. The effects of 16, 16 dimethyl prostaglandin E2 therapy alone and in combination with low-dose cyclosporine on rat small intestinal transplantation. *Transplantation.* 1992; 54: 592-8
- Krajewska M, Kościelska-Kasprzak K, Weyde W, Drulis-Fajdasz D, Madziarska K, Mazanowska O, Kuzstal M, Klinger M. Impact of donor-dependent genetic factors on long-term renal graft function. *Transplant Proc.* 2009; 41: 2978-80
- Kratchmarova I, Kalume DE, Blagoev B, Scherer PE, Podtelejnikov AV, Molina H, Bickel PE, Andersen JS, Fernandez MM, Bunkenborg J, Roepstorff P, Kristiansen K, Lodish HF, Mann M, Pandey A. A proteomic approach for identification of secreted proteins during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes. *Mol Cell Proteomics.* 2002; 1: 213-22
- Kroder G, Bossenmaier B, Kellerer M, Capp E, Stoyanov B, Mühlhöfer A, Berti L, Horikoshi H, Ullrich A, Häring H. Tumor necrosis factor-alpha- and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. *J Clin Invest.* 1996; 97: 1471-7

- Krüger B, Böger CA, Schröppel B, Obed A, Hoffmann U, Murphy BT, Fischereder M, Holler E, Banas B, Krämer BK. Impact of NOD2/CARD15 haplotypes on the outcome after kidney transplantation. *Transpl Int.* 2007; 20: 600-7
- Krüger B, Krick S, Dhillon N, Lerner SM, Ames S, Bromberg JS, Lin M, Walsh L, Vella J, Fischereder M, Krämer BK, Colvin RB, Heeger PS, Murphy BT, Schröppel B. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 3390-5
- Krüger B, Walberer A, Farkas S, Tokmak F, Obed A, Schenker P, Henning B, Schlitt HJ, Krämer BK, Banas B. The impact of "high-producer" interleukin-6 haplotypes on cardiovascular morbidity and mortality in a kidney transplant population. *Transplant Proc.* 2009; 41: 2539-43
- Kubaszek A, Pihlajamäki J, Komarovski V, Lindi V, Lindström J, Eriksson J, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Tuomilehto J, Uusitupa M, Laakso M; Finnish Diabetes Prevention Study. Promoter polymorphisms of the TNF-alpha (G-308A) and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes.* 2003; 52: 1872-6
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem.* 1991; 266: 12866-72
- Lagathu C, Bastard JP, Auclair M, Maachi M, Capeau J, Caron M. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 311: 372-9

- La Manna G, Cappuccilli ML, Cianciolo G, Conte D, Comai G, Carretta E, Scolari MP, Stefoni S. Cardiovascular disease in kidney transplant recipients: the prognostic value of inflammatory cytokine genotypes. *Transplantation*. 2010; 89: 1001-8
- Lavergne E, Combadière B, Bonduelle O, Iga M, Gao JL, Maho M, Boissonnas A, Murphy PM, Debré P, Combadière C. Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo. *Cancer Res*. 2003; 63: 7468-74
- Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, Teske GJ, Kirschning CJ, Akira S, van der Poll T, Weening JJ, Florquin S. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest*. 2005; 115: 2894-903
- Lesage S, Zouali H, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP; EPWG-IBD Group; EPIMAD Group; GETAID Group. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*. 2002; 70: 845-57
- Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest*. 2003; 111: 333-40
- Li W, Xu J, Wang X, Chen J, Zhang C, Sun K, Hui R. Cyclooxygenase-2 (COX-2) G-765C is a protective factor for coronary artery disease but not for ischemic stroke: a meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2009; 207: 492-5
- Lim JW, Kim H, Kim KH. Expression of Ku70 and Ku80 mediated by NF-kappa B and cyclooxygenase-2 is related to proliferation of human gastric cancer cells. *J Biol Chem*. 2002; 277: 46093-100

- Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet*. 2002; 360: 57-8
- Lira MG, Mazzola S, Tessari G, Malerba G, Ortombina M, Naldi L, Remuzzi G, Boschiero L, Forni A, Rugu C, Piaserico S, Girolomoni G, Turco A. Association of functional gene variants in the regulatory regions of COX-2 gene (PTGS2) with nonmelanoma skin cancer after organ transplantation. *Br J Dermatol*. 2007; 157: 49-57
- Loucaidou M, Stitchbury J, Lee J, Borrowers R, Marshall SE, McLean AG, Cairns T, Griffith M, Hakim N, Palmer A, Papalois V, Welsh K, Taube D. Cytokine polymorphisms do not influence acute rejection in renal transplantation under tacrolimus-based immunosuppression. *Transplant Proc*. 2005; 37: 1760-1
- Mackiewicz A. Cytokine, cytokine receptors and glucocorticoid network controlling N-glycosylation of acute phase proteins in vitro. *Folia Histochem Cytobiol*. 1992; 30: 165-6
- Mahic M, Yaqub S, Johansson CC, Taskén K, Aandahl EM. FOXP3+CD4+CD25+ adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *J Immunol*. 2006; 177: 246-54
- Manchanda PK, Mittal RD. Analysis of cytokine gene polymorphisms in recipient's matched with living donors on acute rejection after renal transplantation. *Mol Cell Biochem*. 2008; 311: 57-65
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006; 441: 231-4
- Mantovani A. Cancer: inflammation by remote control. *Nature*. 2005; 435: 752-3

- Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grüb M, Koenig W, Hombach V, Libby P, Plutzky J. PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ Res.* 2002; 90: 703-10
- Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster JG. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol.* 2000; 1: 298-304
- Matsuura E, Kobayashi K, Koike T, Shoenfel Y. Autoantibody-mediated atherosclerosis. *Autoimmunity Rev.* 2002 ; 1: 348-353
- Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12: 991-1045
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002; 296: 301-5
- McDermott DH, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Merrell MN, Epstein N, Quyyumi AA, Murphy PM. Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ Res.* 2001 Aug 31;89(5):401-7
- McDermott DH, Fong AM, Yang Q, Sechler JM, Cupples LA, Merrell MN, Wilson PW, D'Agostino RB, O'Donnell CJ, Patel DD, Murphy PM. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest.* 2003; 111: 1241-50
- McGuinness DH, Dehal PK, Pleass RJ. Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends Immunol.* 2003; 19: 312-9
- McLoughlin RM, Witowski J, Robson RL, Wilkinson TS, Hurst SM, Williams AS, Williams JD, Rose-John S, Jones SA, Topley N. Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. *J Clin Invest.* 2003; 112: 598-607

- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388: 394-7
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 1997; 91: 295-8
- Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med*. 2000; 343: 338-44
- Melián A, Geng YJ, Sukhova GK, Libby P, Porcelli SA.. CD1 expression in human atherosclerosis. A potential mechanism for T cell activation by foam cells. *Am J Pathol*. 1999; 155: 775-86
- Miles AM, Sumrani N, Horowitz R, Homel P, Maursky V, Markell MS, Distant DA, Hong JH, Sommer BG, Friedman EA. Diabetes mellitus after renal transplantation: as deleterious as non-transplant-associated diabetes? *Transplantation*. 1998; 65: 380-4
- Moatti D, Faure S, Fumeron F, Amara Mel-W, Seknadji P, McDermott DH, Debré P, Aumont MC, Murphy PM, de Prost D, Combadière C. Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood*. 2001; 97: 1925-8
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82: 4196-200
- Mondry A, Loh M, Laurence KB, Low N. DNA polymorphisms and renal disease: a critical appraisal of studies presented at the annual ERA/EDTA and ASN conferences in 2004 and 2005. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21: 2775-9
- Mooney RA, Senn J, Cameron S, Inamdar N, Boivin LM, Shang Y, Furlanetto RW. Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J Biol Chem*. 2001; 276: 25889-93

- Moran M, Mozes MF, Maddux MS, Veremis S, Bartkus C, Ketel B, Pollak R, Wallemark C, Jonasson O. Prevention of acute graft rejection by the prostaglandin E1 analogue misoprostol in renal-transplant recipients treated with cyclosporine and prednisone. *N Engl J Med.* 1990; 322: 1183-8
- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2001;19: 197-223
- Morita CT, Verma S, Aparicio P, Martinez C, Spits H, Brenner MB. Functionally distinct subsets of human gamma/delta T cells. *Eur J Immunol.* 1991 ; 12: 2999-3007
- Muller TF, Grebe SO, Neumann MC, Heymanns J, Radsak K, Sprenger H, Lange H. Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies. *Transplantation* 1997; 64: 1432-5
- Müller-Steinhardt M, Härtel C, Müller B, Kirchner H, Fricke L. The interleukin-6 -174 promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival. *Kidney Int.* 2002; 62: 1824-7
- Müller-Steinhardt M, Fricke L, Müller B, Ebel B, Kirchner H, Härtel C. Cooperative influence of the interleukin-6 promoter polymorphisms -597, -572 and -174 on long-term kidney allograft survival. *Am J Transplant.* 2004; 4: 402-6
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.* 2003; 349: 2326-33
- Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation.* 2006; 81: 643-54
- Nataraj C, Thomas DW, Tilley SL, Nguyen MT, Mannon R, Koller BH, Coffman TM. Receptors for prostaglandin E₂ that regulate cellular immune responses in the mouse. *J Clin Invest.* 2001; 108: 1229-35

- Neumann J, Fernandes S, Keitel E, Santos A, Santos P, Michelon T, Bittar A, Garcia V. Cytokine polymorphism and kidney graft survival at a single center. *Transplant Proc.* 2001; 33: 501
- Nguyen Y, Al-Lehibi A, Gorbe E, Li E, Haagenson M, Wang T, Spellman S, Lee SJ, Davidson NO. Insufficient evidence for association of NOD2/CARD15 or other inflammatory bowel disease-associated markers on GVHD incidence or other adverse outcomes in T-replete, unrelated donor transplantation. *Blood.* 2010; 115: 3625-3
- Niessner A, Marculescu R, Kvakani H, Haschemi A, Endler G, Weyand CM, Maurer G, Mannhalter C, Wojta J, Wagner O, Huber K. Fractalkine receptor polymorphisms V249I and T280M as genetic risk factors for restenosis. *Thromb Haemost.* 2005; 94: 1251-6
- Niino H, Otsuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, Tanabe T, Hara S, Nemoto Y, Tanaka Y, Nakashima H, Niho Y. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood.* 1997; 89: 1621-8
- Nikolova PN, Ivanova MI, Mihailova SM, Myhailova AP, Baltadjieva DN, Simeonov PL, Paskalev EK, Naumova EJ. Cytokine gene polymorphism in kidney transplantation--impact of TGF-beta 1, TNF-alpha and IL-6 on graft outcome. *Transpl Immunol.* 2008; 18: 344-8
- Noh H, Lee SW, Kang SW, Shin SK, Choi KH, Lee HY, Han DS. Serum C-reactive protein: a predictor of mortality in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int.* 1998; 18: 387-94
- Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF, Zimmermann E, Tretiakova M, Cho JH, Hart J, Greenson JK, Keshav S, Nuñez G. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut.* 2003; 52: 1591-7

- Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol.* 2000; 164: 558-61
- Pai JK, Pischon T, Ma J, Manson JE, Hankinson SE, Joshipura K, Curhan GC, Rifai N, Cannuscio CC, Stampfer MJ, Rimm EB. Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med.* 2004; 351: 2599-610
- Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2009; 227: 221-33
- Palmer SM, Burch LH, Mir S, Smith SR, Kuo PC, Herczyk WF, Reinsmoen NL, Schwartz DA. Donor polymorphisms in Toll-like receptor-4 influence the development of rejection after renal transplantation. *Clin Transplant.* 2006; 20: 30-6
- Papafili A, Hill MR, Brull DJ, McAnulty RJ, Marshall RP, Humphries SE, Laurent GJ. Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1631-6
- Pasterkamp G, Van Keulen JK, De Kleijn DP. Role of Toll-like receptor 4 in the initiation and progression of atherosclerotic disease. *Eur J Clin Invest.* 2004; 34: 328-34
- Pauleau AL, Murray PJ. Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Mol Cell Biol.* 2003; 23: 7531-9
- Pawlik A, Domanski L, Rozanski J, Florczak M, Wrzesniewska J, Dutkiewicz G, Dabrowska-Zamojcin E, Gawronska-Szklarz B. The cytokine gene polymorphisms in patients with chronic kidney graft rejection. *Transpl Immunol.* 2005; 14: 49-52
- Pawlik A, Domanski L, Rozanski J, Czerny B, Juzyszyn Z, Dutkiewicz G, Myslak M, Hałasa M, Słojewski M, Dabrowska-Zamojcin E. The association between cytokine gene polymorphisms and kidney allograft survival. *Ann Transplant.* 2008; 13: 54-8

- Pentland AP, Schoggins JW, Scott GA, Khan KN, Han R. Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition. *Carcinogenesis*. 1999; 20: 1939-44
- Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia*. 1998; 41: 1241-8
- Pisani P, Parkin DM, Muñoz N, Ferlay J. Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997; 6: 387-400
- Poli F, Boschiero L, Giannoni F, Tonini M, Ancona G, Scalamogna M, Berra S, Sirchia G. TNF-alpha IFN-gamma IL-6, IL-10, and TGF-beta1 gene polymorphisms in renal allografts. *Transplant Proc*. 2001; 33: 348-9
- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N. C-reactive protein, interleukin 6 and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2001; 286: 327-34
- Prasad GV, Kim SJ, Huang M, Nash MM, Zaltzman JS, Fenton SS, Cattran DC, Cole EH, Cardella CJ. Reduced incidence of new-onset diabetes mellitus after renal transplantation with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors (statins). *Am J Transplant*. 2004; 4: 1897-903
- Qi L, van Dam RM, Meigs JB, Manson JE, Hunter D, Hu FB. Genetic variation in IL6 gene and type 2 diabetes: tagging-SNP haplotype analysis in large-scale case-control study and meta-analysis. *Hum Mol Genet*. 2006; 15: 1914-20
- Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D. Endothelial cell-derived chemotactic activity for mouse peritoneal macrophages and the effects of modified forms of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82: 5949-53
- Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84: 2995-8

- Ramsay HM, Fryer AA, Hawley CM, Smith AG, Nicol DL, Harden PN. Factors associated with nonmelanoma skin cancer following renal transplantation in Queensland, Australia. *J Am Acad Dermatol.* 2003; 49: 397-406
- Reviron D, Dussol B, Andre M, Brunet P, Mercier P, Berland Y. TNF-alpha and IL-6 gene polymorphism and rejection in kidney transplantation recipients. *Transplant Proc.* 2001; 33: 350-1
- Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 1997; 336: 973-9
- Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2002; 347: 1557-65
- Ridker PM, Morrow DA. C-reactive protein, inflammation, and coronary risk. *Cardiol Clin.* 2003; 21: 315-25
- Rigas B, Goldman IS, Levine L. Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med.* 1993; 122: 518-2
- Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol.* 2002; 71: 173-83
- Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem.* 1964; 239: 375-80
- Robinson LA, Nataraj C, Thomas DW, Howell DN, Griffiths R, Bautch V, Patel DD, Feng L, Coffman TM. A role for fractalkine and its receptor (CX3CR1) in cardiac allograft rejection. *J Immunol.* 2000; 165: 6067-72

- Rodrigo E, Sánchez-Velasco P, Ruiz JC, Fernández-Fresnedo G, López-Hoyos M, Piñera C, Palomar R, Gómez-Alamillo C, González-Cotorruelo J, Leyba-Cobián F, Arias M. Cytokine polymorphisms and risk of infection after kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2007; 39: 2219-21
- Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol.* 2006; 80: 227-36
- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340: 115-26
- Rott D, Zhu J, Burnett MS, Zhou YF, Zalles-Ganley A, Ogunmakinwa J, Epstein SE. Effects of MF-tricyclic, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on atherosclerosis progression and susceptibility to cytomegalovirus replication in apolipoprotein-E knockout mice. *J Am Coll Cardiol.* 2003 May 21;41(10):1812-9
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D; International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001; 409: 928-33
- Sairafi D, Uzunel M, Remberger M, Ringdén O, Mattsson J. No impact of NOD2/CARD15 on outcome after SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41: 961-4
- Samstein B, Johnson GB, Platt JL. Toll-like receptor-4 and allograft responses. *Transplantation.* 2004; 77: 475-7

- Schiller NK, Boisvert WA, Curtiss LK. Inflammation in atherosclerosis: lesion formation in LDL receptor-deficient mice with perforin and Lyst(beige) mutations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1341-6
- Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med.* 2007; 13: 1324-32
- Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park).* 2002; 16: 217-26
- Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y, Yano M, Inoue M, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 1229-38
- Shao J, Sheng H, Inoue H, Morrow JD, DuBois RN. Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2000; 275: 33951-6
- Sharma S, Yang SC, Zhu L, Reckamp K, Gardner B, Baratelli F, Huang M, Batra RK, Dubinett SM. Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+ CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res.* 2005; 65: 5211-20
- Shi X, Ding M, Dong Z, Chen F, Ye J, Wang S, Leonard SS, Castranova V, Vallyathan V. Antioxidant properties of aspirin: characterization of the ability of aspirin to inhibit silica-induced lipid peroxidation, DNA damage, NF-kappaB activation, and TNF-alpha production. *Mol Cell Biochem.* 1999; 199: 93-102

- Shigeoka AA, Holscher TD, King AJ, Hall FW, Kiosses WB, Tobias PS, Mackman N, McKay DB. TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J Immunol.* 2007; 178: 6252-8
- Shimizu H, Mitomo K, Watanabe T, Okamoto S, Yamamoto K. Involvement of a NF-kappa B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Mol Cell Biol.* 1990; 10: 561-8
- Singh Ranger G, Mokbel K. COX-2 inhibitors and breast cancer. *ANZ J Surg.* 2003; 73: 565-6
- Shiojiri T, Wada K, Nakajima A, Katayama K, Shibuya A, Kudo C, Kadowaki T, Mayumi T, Yura Y, Kamisaki Y. PPAR gamma ligands inhibit nitrotyrosine formation and inflammatory mediator expressions in adjuvant-induced rheumatoid arthritis mice. *Eur J Pharmacol.* 2002; 448: 231-8
- Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, Makuch R, Eisen G, Agrawal NM, Stenson WF, Burr AM, Zhao WW, Kent JD, Lefkowitz JB, Verburg KM, Geis GS. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA.* 2000; 284: 1247-55
- Simeoni E, Vassalli G, Seydoux C, Ramsay D, Noll G, von Segesser LK, Fleury S. CCR5, RANTES and CX3CR1 polymorphisms: possible genetic links with acute heart rejection. *Transplantation.* 2005; 80: 1309-15
- Sirois-Gagnon D, Chamberland A, Perron S, Brisson D, Gaudet D, Laprise C. Association of Common Polymorphisms in the Fractalkine Receptor (CX3CR1) With Obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2010 Jun 3

- Sitarz R, Leguit RJ, de Leng WW, Polak M, Morsink FM, Bakker O, Maciejewski R, Offerhaus GJ, Milne AN. The COX-2 promoter polymorphism -765 G>C is associated with early-onset, conventional and stump gastric cancers. *Mod Pathol.* 2008; 21: 685-90
- Smak Gregoor PJ, de Sévaux RG, Ligtenberg G, Hoitsma AJ, Hené RJ, Weimar W, Hilbrands LB, van Gelder T. Withdrawal of cyclosporine or prednisone six months after kidney transplantation in patients on triple drug therapy: a randomized, prospective, multicenter study. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 1365-73
- Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 8264-8
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med.* 2000; 192: 755-60
- Smyth MJ, Crowe NY, Godfrey DI. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol.* 2001; 13: 459-63
- Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet.* 2003; 361: 226-8
- Strydom HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14: 840-56
- Strydom HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of

atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995; 92: 1355-74

Stein B, Yang MX. Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol Cell Biol*. 1995; 15: 4971-9

Stenvinkel P, Barany P, Heimbürger O, Pecoits-Filho R, Lindholm B. Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: what is the role of interleukin-6? *Kidney Int Suppl*. 2002; 80: 103-8

Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE, Jiang R, Messer CJ, Chew A, Han JH, Duan J, Carr JL, Lee MS, Koshy B, Kumar AM, Zhang G, Newell WR, Windemuth A, Xu C, Kalbfleisch TS, Shaner SL, Arnold K, Schulz V, Drysdale CM, Nandabalan K, Judson RS, Ruano G, Vovis GF. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science*. 2001; 293: 489-93

Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem*. 2001; 276: 12440-8

Subbaramaiah K, Cole PA, Dannenberg AJ. Retinoids and carnosol suppress cyclooxygenase-2 transcription by CREB-binding protein/p300-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res*. 2002; 62: 2522-30

Sullivan JS. CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival. *Lancet*. 2001; 358: 1269-

- Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T, et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*. 1997; 386: 292-6
- Takeuchi O, Akira S. Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function. *Microbes Infect*. 2002; 4: 887-95
- Tada H, Aiba S, Shibata K, Ohteki T, Takada H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun*. 2005; 73: 7967-76
- Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT, Fahey TJ 3rd. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res*. 1999; 59: 987-90
- Tuomisto K, Jousilahti P, Sundvall J, Pajunen P, Salomaa V. C-reactive protein, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha as predictors of incident coronary and cardiovascular events and total mortality. A population-based, prospective study. *Thromb Haemost*. 2006; 95: 511-8
- Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*. 2002; 14: 103-10
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*. 1997; 389: 610-4
- Vanden Berghe W, De Bosscher K, Boone E, Plaisance S, Haegeman G. The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter. *J Biol Chem*. 1999; 274: 32091-8

- Van Rees BP, Sivula A, Thorén S, Yokozaki H, Jakobsson PJ, Offerhaus GJ, Ristimäki A. Expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in intestinal type gastric adenocarcinoma and in gastric cancer cell lines. *Int J Cancer*. 2003; 107: 551-6
- Varagunam M, Finney H, Trevitt R, Sharples E, McCloskey DJ, Sinnott PJ, Raftery MJ, Yaqoob MM. Pretransplantation levels of C-reactive protein predict all-cause and cardiovascular mortality, but not graft outcome, in kidney transplant recipients. *Am J Kidney Dis*. 2004; 43: 502-7
- Vozarova B, Fernández-Real JM, Knowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD, Ricart W, Vendrell J, Richart C, Tataranni PA, Wolford JK. The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet*. 2003; 112: 409-13
- Wang D, Mann JR, DuBois RN. WNT and cyclooxygenase-2 cross-talk accelerates adenoma. *Cell Cycle*. 2004; 3: 1512-5
- Wang P, Mariman E, Keijer J, Bouwman F, Noben JP, Robben J, Renes J. Profiling of the secreted proteins during 3T3-L1 adipocyte differentiation leads to the identification of novel adipokines. *Cell Mol Life Sci*. 2004; 61: 2405-17
- Wang S, Jiang J, Guan Q, Wang H, Nguan CY, Jevnikar AM, Du C. Reduction of chronic allograft nephropathy by inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 signaling. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 295: 672-9
- Watanabe A, Hashmi A, Gomes DA, Town T, Badou A, Flavell RA, Mehal WZ. Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor 9. *Hepatology*. 2007; 46: 1509-18
- Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest*. 2006; 116: 115-24

Weitz-Schmidt G. Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23: 482-6

Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation.* 2004; 109:II2-10

Winkelmayr WC, Lorenz M, Kramar R, Födinger M, Hörl WH, Sunder-Plassmann G. C-reactive protein and body mass index independently predict mortality in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2004; 4: 1148-54

Winkelmayr WC, Schaeffner ES, Chandraker A, Kramar R, Rumpold H, Sunder-Plassmann G, Födinger M. A J-shaped association between high-sensitivity C-reactive protein and mortality in kidney transplant recipients. *Transpl Int.* 2007; 20: 505-11

Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimäki A. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res.* 1998; 58: 4997-5001

Wuttge DM, Eriksson P, Sirsjö A, Hansson GK, Stemme S. Expression of interleukin-15 in mouse and human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 2001; 159: 417-23

Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, Hashimoto S, Kawai S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in association with activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in rheumatoid synovial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 302: 18-2

Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 3815-9

Yee CS, Messner HA, Minden MD. Regulation of interleukin-6 expression in the lymphoma cell line OCI-LY3. *J Cell Physiol.* 1991; 148: 426-9

- Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature*. 1998; 396: 77-80
- Yoneda O, Imai T, Goda S, Inoue H, Yamauchi A, Okazaki T, Imai H, Yoshie O, Bloom ET, Domae N, Umehara H. Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells. *J Immunol*. 2000; 164: 4055-62
- Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*. 2001; 293: 1673-7
- Zhang H, Sun XF. Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with advanced stages of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol*. 2002; 97: 1037-41
- Zhang X, Young HA. PPAR and immune system--what do we know? *Int Immunopharmacol*. 2002; 2: 1029-44
- Zhang X, Rodriguez-Galán MC, Subleski JJ, Ortaldo JR, Hodge DL, Wang JM, Shimozato O, Reynolds DA, Young HA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and its ligands attenuate biologic functions of human natural killer cells. *Blood*. 2004; 104: 3276-84
- Zhang Y, Broser M, Rom WN. Activation of the interleukin 6 gene by Mycobacterium tuberculosis or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF-IL6 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91: 2225-9
- Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 1999; 55: 648-