

**UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE**

**ECOLE DOCTORALE**

**Thèse de Doctorat**

**Sciences de la Vie et de la Santé**

**Didier Ducloux**

**ASPECTS IMMUNOLOGIQUES DE  
L'ATHEROSCLEROSE CHEZ LE TRANSPLANTE  
RENAL**

**Thèse dirigée par le professeur Philippe SAAS**

**Soutenue le 30 Juin 2009**

Les complications athéromateuses sont fréquentes chez le transplanté rénal. L'athérosclérose est une maladie inflammatoire où tous les éléments de la réponse immune peuvent intervenir. Le transplanté rénal constitue un modèle d'étude particulièrement intéressant puisqu'il cumule un risque de complications athéromateuses élevé et un état variable d'immunosuppression obtenu par l'utilisation de molécules ayant des mécanismes d'action différents sur la réponse immunitaire. Nous avons étudié le rôle de l'immunité innée et de la polarisation lymphocytaire dans la survenue de complications athéromateuses. Nous avons montré que les mutations affectant TLR4 réduisaient le risque de complications athéromateuses et que l'existence d'une lymphopénie T CD4 était un facteur de risque de complications athéromateuses. Cette lymphopénie T CD4 peut être prédite par l'estimation de la fonction thymique quantifiée par le nombre de TREC. Enfin, nous avons étudié l'impact de la réponse inflammatoire sur le risque de survenue de diabète de novo post-transplantation, un facteur de risque cardio-vasculaire important après greffe.

## IMMUNOLOGIC MECHANISMS OF ATHEROSCLEROSIS AFTER RENAL TRANSPLANTATION

Atherosclerotic complications are frequent after renal transplantation. Atherosclerosis is now considered to be an inflammatory disease in the immunocompetent population. Nevertheless, the impact of immunosuppression on atherosclerotic processes in renal transplant recipients is unknown. We studied the influence of innate immunity and lymphocyte polarization on the occurrence of atherosclerotic complications in renal transplant patients. We showed that TLR4 polymorphisms are associated with a decreased risk of cardiovascular complications whereas CD4 T cell lymphopenia is a risk factor for such complications. NOD2/CARD15 and COX-2

polymorphisms do not influence the risk of cardiovascular disease in transplant patients. Thymic function estimated by TREC measurement predicts post-transplant CD4 T count. Finally, we showed that a greater capacity to produce IL-6 is associated with a higher risk of new-onset diabetes after transplantation. Immunologic responses contribute to cardiovascular disease after transplantation.

**Mots clés**

Transplantation rénale

Athérosclérose

Immunité innée

Lymphopénie T CD4

Polymorphismes génétiques

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, Besançon, F-25020

France; IFR133, Besançon, F-25020 France

**Mr le professeur Jean-Marc CHALOPIN**

Je vous remercie de présider mon jury de thèse.

Vous m'avez encouragé et soutenu en toutes circonstances, favorables comme difficiles, et ce travail n'aurait pu se faire sans la liberté d'entreprendre que vous m'avez accordée et la confiance que vous n'avez cessé de me témoigner. J'ai appris à vos côtés beaucoup plus que votre modestie vous le laisse penser.

**Mr le professeur Pierre TIBERGHEN**

Cher Pierre, travailler avec toi est un privilège. J'espère pouvoir un jour dire que j'ai pris un peu de ta rigueur, de ta curiosité et de ta perspicacité. Tu as mis ton énergie et ton savoir au service de ce travail qui te doit beaucoup. Je te remercie pour ton soutien indéfectible.

**Mr le professeur Jean-Michel REBIBOU**

Cher Jean-Michel, je te remercie d'avoir accepté de juger ma thèse. Tu as contribué à une partie importante de ce travail et nos discussions ont souvent donné une orientation nouvelle à ces recherches. J'espère que, dans un proche avenir, nous pourrons trouver les modalités d'une collaboration entre Dijon et Besançon. Nos relations n'ont pas toujours été sereines, mais c'est, il me semble, l'apanage des amitiés solides et durables.

**Mr le professeur Philippe SAAS**

Cher Philippe, je te remercie d'avoir accepté de diriger ma thèse. Ce travail n'existerait pas sans toi. Tu y as mis beaucoup d'énergie et d'intelligence et j'ai énormément appris à tes côtés. Ta disponibilité et ton amitié m'ont été très précieuses. Je ne doute pas que le meilleur de notre collaboration reste encore à venir.

**Mr le professeur Jacques DANTAL**

Cher Jacques, c'est un honneur pour moi que tu sois l'un des rapporteurs de ce travail. Je te remercie pour la facilité avec laquelle tu as accepté cette fonction et les délais proposés. Je souhaite vivement que nous puissions travailler ensemble dans l'avenir.

**Mr le professeur Antoine DURRBACH**

Cher Antoine, nos routes se sont souvent croisées dans le passé de Tenon à Saint-Louis. C'est un plaisir et un honneur que tu aies accepté de juger ce travail. Je ne doute pas que nous aurons l'occasion de travailler de nouveau ensemble.

**A Sylvie, Julie et Adrien**

Ce travail vous est dédié. Me supporter n'est pas toujours facile, mais votre amour et votre présence ont été les ressorts indispensables de ce travail.

**A mes parents**

**A l'ensemble du service de Néphrologie du CHU de Besançon et plus particulièrement aux étudiants de M2 qui ont contribué à ce travail Jamal, Cécile, Bérengère, Aline et Barbara.**

**A l'ensemble de l'équipe de l'INSERM U645, de l'EFS de Franche-Comté et du CIC de biothérapie 506**

## Liste des abréviations

ATG : *Antithymocytes globulins*

b-FGF : *basic-Fibroblast Growth Factor*

CMV : Cytomégalovirus

COX-2 : cyclooxygénase 2

CPA : Cellules présentatrices d'antigène

DAMP : *Damage Associated Molecular Pattern*

DC : *Dendritic cell*

GALP : Globulines anti-lymphocytaires polyclonales

HB-EGF : *Heparin Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor*

HDL : High density lipoprotein

HOMA : *Homeostasis model assessment*

HSP : *Heat shock protein*

ICAM-1 : *Intercellular adhesion molecule*

IRAK : *IL-1 Receptor-Associated Kinase*

LDL : *Low density lipoprotein*

LPS : Lipopolysaccharide

MCP-1 : *Membrane Cofactor Protein-1*

M-CSF : *Macrophage-Colony stimulating factor*

MMF : Mycophénolate Mofétil

MMP : Métalloproteinase

MyD88 : *Myeloid Differentiation primary response protein 88*

NODAT : *New onset diabetes after transplantation*

PAMP : *Pathogen Associated Molecular Pattern*

PDGF : *Platelet Derived Growth Factor*

PGE2 : Prostaglandine E2

SCA : *Syndrôme coronarien aigu*

SCID : *Severe combined immunodeficiency*

TCR : T cell receptor

TGF- $\beta$  : Transforming growth factor beta

TIMPS : *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*

TLR : *Toll like receptor*

TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor alpha

TREC : TCR rearrangement excision circles

Treg : Lymphocytes T régulateurs

VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecule*

## Table des matières

|  |     |
|--|-----|
| Avant propos .....   | 13  |
| Introduction .....   | 14  |
| I.    Athérosclérose et système immunitaire .....  | 14  |
| I.1. Histologie de la plaque d'athérome : nature et rôle des cellules inflammatoires ....    | 14  |
| I.2. Induction de la réponse immunitaire dans l'athérosclérose : place du cholestérol ...    | 21  |
| I.3. Immunité innée et athérosclérose .....  | 23  |
| I.3.1 Récepteurs de l'immunité innée .....   | 23  |
| I.3.2 Récepteurs de l'immunité innée et LDL oxydées .....                                    | 28  |
| I.3.3 Autres cellules de l'immunité innée impliquées dans l'athérosclérose ...               | 29  |
| I.4. Place de l'immunité adaptative dans l'athérosclérose ....                               | 30  |
| I.4.1. Cytokines et athérosclérose : rôle de l'orientation de la réponse lymphocytaire T ... | 32  |
| I.4.2. Athérosclérose : une place pour l'immunité humorale ? ....                            | 44  |
| I.4.2.1. Place des anticorps .....   | 44  |
| I.4.2.2. Place des lymphocytes B ....  | 45  |
| I.5 Système immunitaire et facteurs de risque cardio-vasculaire ....                         | 47  |
| II. Athérosclérose et transplantation rénale : données épidémiologiques ....                 | 49  |
| Objectifs .....  | 53  |
| Article 1 .....  | 54  |
| Article 2 .....  | 66  |
| Article 3 .....  | 102 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Article 4 .....</b>                   | <b>118</b> |
| <b>Article 5 .....</b>                   | <b>126</b> |
| <b>Article 6 .....</b>                   | <b>150</b> |
| <b>Discussion ....</b>                   | <b>163</b> |
| <b>Conclusions et perspectives .....</b> | <b>164</b> |
| <b>Bibliographie .....</b>               | <b>168</b> |

## **Avant propos**

Des progrès considérables, accomplis en particulier dans la connaissance des mécanismes de l'alloréactivité et dans l'utilisation des traitements immunosuppresseurs, ont permis de réduire l'incidence du rejet aigu et de prolonger la survie des greffons rénaux. Cependant, la morbi-mortalité reste élevée après transplantation rénale tant en ce qui concerne le risque d'infections que la survenue de cancers. Ces complications sont liées à l'absence de spécificité de l'immunosuppression et à notre incapacité à déterminer « la quantité » d'immunosuppression apportée par les traitements à chaque individu. Il existe en effet peu de marqueurs de l'immunosuppression thérapeutique. Nous avons montré que l'existence d'une lymphopénie T CD4 prolongée après administration de globulines anti-lymphocytaires polyclonales (GALP) lymphopéniantes était associée aux complications classiques de la sur-immunosuppression (infections opportunistes, cancers cutanés, cancers solides, gammopathies) (Ducloux D et al Transplantation 1998, Ducloux D et al Transplant Proc. 1998, Ducloux D et al Transpl Int. 1999)

L'athérosclérose et ses complications restent, devant les complications classiques de l'immunosuppression, la première cause de morbidité et de mortalité et la seconde cause de perte de greffon après le rejet chronique. S'il est bien connu que l'athérosclérose est une maladie inflammatoire, l'effet de l'immunosuppression (obligatoire dans le cadre de la greffe d'organe) sur l'évolution naturelle de l'athérosclérose reste mal connu. La relation entre athérosclérose et greffe de rein est le sujet de ce mémoire.

# INTRODUCTION

## **I. Athérosclérose et système immunitaire**

L'athérosclérose est une pathologie chronique des grosses artères à localisation intimale. 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 probable 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 (pour revue, Glass CK et al Cell 2001, Hansson GK et al N Engl J Med 2005).

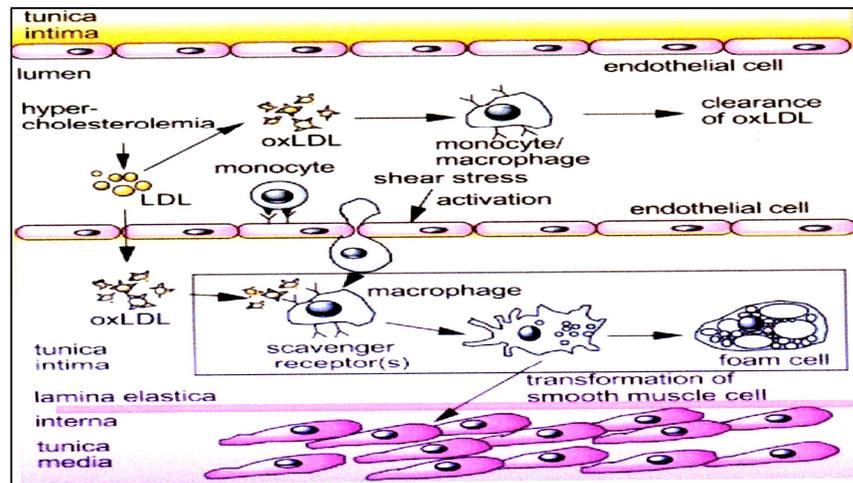
L'analyse histologique de la plaque d'athérome, l'utilisation des modèles animaux explorant l'immunité innée et adaptative, ainsi que le rôle particulier de différentes cytokines, et enfin les études épidémiologiques (Ridker PM et al Cardiol Clin 2003) ont permis de mieux comprendre les relations complexes entre réponse immunitaire et initiation/progression de la maladie athéromateuse.

### **I.1. Histologie de la plaque d'athérome : nature et rôle des cellules inflammatoires**

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire de la paroi artérielle et le système immunitaire contribue à toutes les étapes de la formation de la plaque. Schématiquement, la plaque athéromateuse évolue en plusieurs stades : la strie lipidique, des lésions intermédiaires et des lésions compliquées (Stary HC et al Arterioscler Thromb 1994, Stary HC et al Circulation 1995).

Lors de la phase initiale (strie lipidique), la plaque contient essentiellement des macrophages riches en lipides intra-cytoplasmiques, appelés cellules spumeuses (*foam cells*) et exprimant fortement à leur surface les récepteurs « *scavengers* » (CD36, CD68, SR-A) impliqués dans la phagocytose des LDL oxydées. 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 (figure). Ces molécules [sélectines P (plaquettaire) et E (endothélium), MCP-1 (*Membrane Cofactor Protein-1*), ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*)] sont fortement exprimées par les cellules endothéliales, notamment après activation de l'endothélium (G. K. Hansson *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001).

Les molécules intervenant dans la croissance et la différenciation des monocytes en macrophages jouent là aussi un rôle important. C'est le cas notamment du M-CSF (*Macrophage-Colony stimulating factor*).



**Figure 1 :** formation des stries lipidiques : étapes et mécanismes de l’infiltration monocytaire de la paroi vasculaire (d’après fig 1b E. Matsuura Autoimmunity Reviews 1 2002) :

Cette figure montre les différents facteurs impliqués dans la formation des stries lipidiques :

- les monocytes se transforment en macrophages après diapédèse, puis en cellules spumeuses après accumulation de lipides (sous la forme de LDL oxydés, oxLDL).
- les cellules endothéliales jouent un rôle important dans le recrutement et la diapédèse des monocytes.
- les cellules musculaires lisses (*smooth muscle cell*) vont aussi subir des transformations et une phase de prolifération dans l’intima

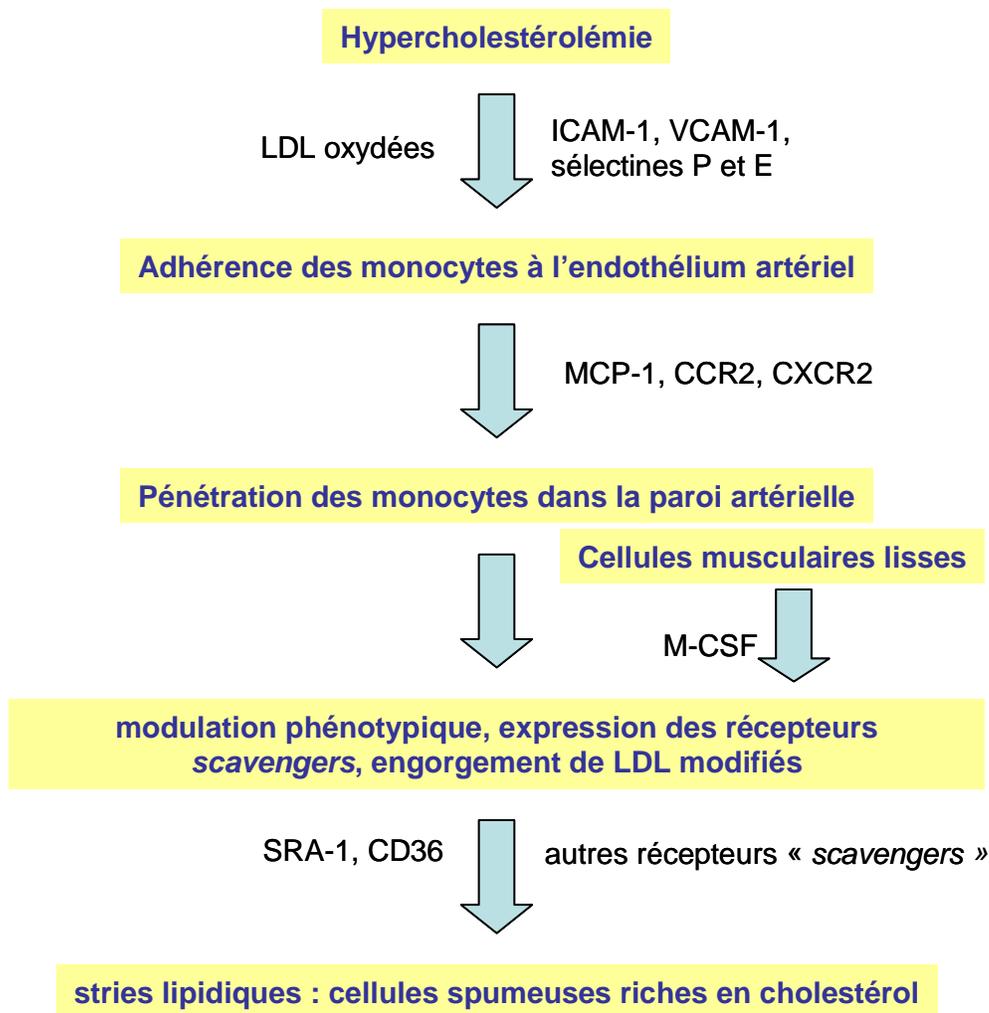
Des modèles animaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes immunologiques impliqués dans la phase de formation des stries lipidiques. Le tableau 1 en résume les principaux résultats. Ces modèles animaux sont basés sur l’utilisation de souris génétiquement susceptibles de développer une athérosclérose accélérée : les souris apoE  $-/-$  (invalidées pour le gène de l’apolipoprotéine E) ou les souris LDL<sub>R</sub>  $-/-$  (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 <sub>R</sub> <sup>-/-</sup> ou apoE <sup>-/-</sup> | Références bibliographiques |
|---|----------------------------|--|-----------------------------|
| Molécules d'adhérences  | Sélectine P <sup>-/-</sup> | Diminution x 1,25 à 2  | Collins RG et al JCI 2000   |
|   | Sélectine E <sup>-/-</sup> | Diminution x 1,3   | Collins RG et al JCI 2000   |
|   | ICAM <sup>-/-</sup>        | Diminution x 1,4   | Collins RG et al JCI 2000   |
| Facteur de croissance   | M-CSF <sup>-/-</sup>       | Diminution x 5   | Smith JD et al PNAS 1995    |
| Chimiokines et récepteurs de chimiokines (lignée monocyttaire et macrophagique) | MCP-1                      | Diminution x 5   | Gu L et al Mol cell 1998    |
|   | CCR2 <sup>-/-</sup>        | Diminution x 3   | Boring L et al Nature 1998  |
| Récepteurs « scavenger » (impliqués dans la capture des LDL oxydées)            | SRA <sup>-/-</sup>         | Diminution   | Suzuki et al Nature 1997    |
|   | CD36 <sup>-/-</sup>        | Diminution x 4   | Febbraio M et al JCI 2000   |

**Tableau 1 :** Formation comparée des stries lipidiques dans différents modèles animaux d'athérosclérose avec ou sans déficit en facteurs, d'adhérence, facteurs de croissance, chimiokines ou récepteurs « scavenger » (d'après G.K. Hansson *Circulation Research* 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. En outre, l'hypercholestérolémie est à l'origine de la formation de LDL

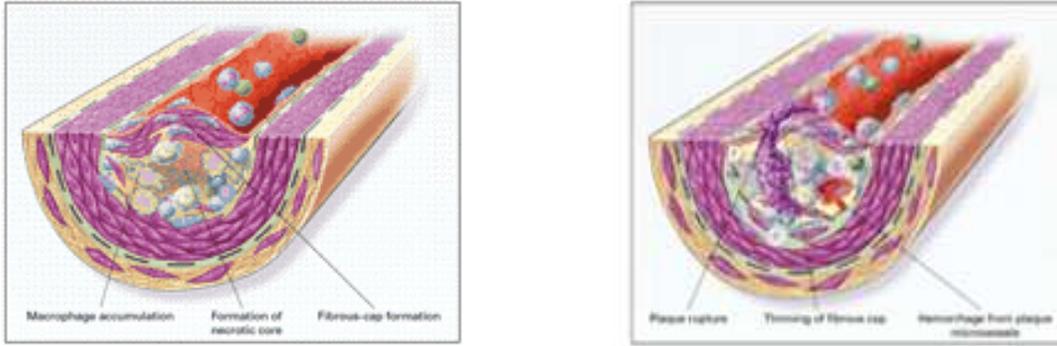
oxydées ayant des propriétés chimiotactiques sur les monocytes. Les chimiokines sécrétées par les cellules endothéliales vont favoriser la pénétration des monocytes dans la paroi artérielle. La présence de M-CSF dans le milieu (notamment sécrété par les cellules musculaires lisses) concourt à la différenciation des monocytes en macrophages. En présence de LDL modifiés, 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 intra-cytoplasmique de matériel lipidique par les macrophages qui deviennent des cellules spumeuses. Ces cellules sont à l'origine de la formation de la strie lipidique (figure 2).



**Figure 2 :** chronologie de la formation des stries lipidiques : acteurs cellulaires et moléculaires à l'origine de cette formation (D'après D.Steinberg Nature Medicine 2002).

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 lymphocytes T 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- $\gamma$  et IL-4) et certains facteurs de croissance [(PDGF (*Platelet Derived Growth Factor* ou facteur de croissance dérivé des plaquettes), HB-EGF (*Heparin Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor* ou facteur de croissance liant l'héparine apparenté à l'EGF), b-FGF (*basic-Fibroblast Growth Factor* ou facteur de croissance fibroblastique)], sécrétés par les cellules endothéliales lésées, les macrophages et les lymphocytes T activés *in situ*. Il en résulte une hypertrophie de l'intima (E .Matsuura, Autoimmunity Reviews I 2002).

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 (cf fig3 R. Ross NEJM 1999= figure 4a). 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 (figure 3).



**Figure 3 : Formation et rupture de la plaque d'athérome : (a) formation du noyau nécrotique et constitution de la coque fibreuse (d'après fig 3 R. Ross NEJM 1999) : les lésions intermédiaires évoluent 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 leucocytes, de lipides et de débris cellulaires qui forment un noyau nécrotique. (b) Rupture de la plaque d'athérome : déversement du contenu du noyau nécrotique dans le flot sanguin (d'après fig 4 R. Ross NEJM 1999) : 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.**

L'analyse statique (histologique) de la plaque d'athérome à ces différents stades identifie différents partenaires impliqués dans la progression de l'athérosclérose. Il s'agit entre autres : du cholestérol et des LDL oxydées, de cellules de l'immunité innée (monocyte/macrophage, cellules endothéliales) et adaptatives (les lymphocytes). Dans la suite de ce mémoire, nous allons aborder de manière plus fonctionnel l'implication de ces différents partenaires en reprenant des études anciennes impliquant ces partenaires et en analysant ces données avec le regard actuel. Nous prendrons notamment en compte les avancées importantes réalisées dans la compréhension de l'activation des cellules de l'immunité innée avec la caractérisation des récepteurs TLR (pour *Toll Like Receptor*) (voir I.3.1).

## **I.2. Induction de la réponse immunitaire dans l'athérosclérose : place du cholestérol**

Le cholestérol joue un rôle primordial dans l'athérogénèse. En effet, dans les modèles animaux, l'athérosclérose ne se développe pas en l'absence de cholestérol, observation également pertinente chez l'Homme (Campbell TC et al Am J Cardiol 1998, Stamler J, et al JAMA 1986). Par ailleurs, les statines réduisent l'athérosclérose et l'effet de ces traitements est proportionnel à la baisse du cholestérol (Vaughan CJ et al Circulation 2004, Grundy SM et al Circulation 2004).

Ces éléments attestent du rôle initiateur du cholestérol dans la formation de la plaque. Cet effet initiateur est aussi attribué aux LDL oxydées. D'ailleurs, dans les stries lipidiques, macrophages et LDL oxydées sont co-localisés (Napoli C J Clin Invest 1997). En outre, il n'est pas décrit d'accumulation de macrophages dans la plaque sans présence simultanée de LDL oxydées (Napoli C J Clin Invest 1997).

Plusieurs études suggèrent que les lipides oxydés et plus particulièrement les LDL oxydées sont les principaux « antigènes » de la plaque. L'oxydation des LDL génère en effet de nombreux néo-déterminants pouvant contribuer à activer une réponse immune (Pour revue, Tedgui A et al Physiol Rev 2006).

Comme nous le disions à la fin du précédent chapitre, il faut ré-interpréter certaines études anciennes en prenant en compte la caractérisation et la compréhension des récepteurs de l'immunité innée (le prochain chapitre y sera consacré). En effet, le terme « antigène » est souvent employé dans les études anciennes lorsque l'agent en question a été identifié comme à l'origine de la réponse inflammatoire/immunitaire favorisant l'athérosclérose. Cependant, ce terme « antigène » n'est pas toujours justifié, puisqu'il doit être réservé à un facteur générant une réponse immunitaire spécifique (reconnu par des lymphocytes T ou des anticorps). L'agent en question, ici les LDL oxydées, peut être à l'origine de la réponse immunitaire en se comportant

comme un adjuvant (un signal « Danger » activant les cellules de l'immunité innée (Matzinger P Annu Rev Immunol. 1994, Matzinger P Science. 2002, Iwasaki A, et al Nat Immunol. 2004, Palm NW et al Immunol Rev. 2009). Celles-ci présentent ensuite aux lymphocytes T présents tous les antigènes qu'elles contiennent. Les LDL oxydées sont de puissants stimuli inflammatoires. Comme dit précédemment, elles augmentent l'expression de molécules d'adhérence sur l'endothélium activé (Kim JA et al Arterioscler Thromb 1997). Les LDL oxydées ont également un pouvoir chimiotactique pour les monocytes, favorisent leur différenciation en macrophages, puis inhibent leur mobilité (Quinn MT et al Proc Natl Acad Sci USA 1987, Quinn MT et al Proc Natl Acad Sci USA 1985). Il a également été établi que la liaison des LDL oxydées au CD36 (un des récepteurs « *scavengers* ») induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Janabi M et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000). Par ailleurs, l'incubation de LDL oxydées avec des cellules mononucléées aboutit à l'activation des lymphocytes T caractérisées par l'expression du récepteur de l'IL-2 et de molécules HLA de classe II (Frostegard J et al Arterioscler Thromb 1992).

Les LDL oxydées peuvent donc jouer à la fois le rôle d'initiateur de la réponse inflammatoire, puis immunitaire (effet adjuvant), mais aussi servir de source d'antigènes à l'origine de l'activation de l'immunité spécifique. D'autres molécules peuvent aussi jouer le rôle d'antigènes et/ou d'agents initiateurs de la réponse inflammatoire. Ainsi, les protéines de choc thermique (*Heat shock protein*, HSP), les agents infectieux (dont principalement les infections à Cytomégalovirus et Chlamydia), l'angiotensine et de nombreux autres facteurs biologiques, jouent un rôle adjuvant dans l'athérogénèse (Pour revue : Tedgui A et al Physiol Rev 2006).

Ces autres facteurs entrent tous dans la famille des motifs moléculaires associés aux pathogènes appelés plus communément PAMP (pour *Pathogen Associated Molecular Pattern*) ou celle des DAMP (pour *Damage Associated Molecular Pattern*). Ceci fait l'objet du prochain chapitre.

### **I.3. Immunité innée et athérosclérose**

L'implication des macrophages dans l'athérogénèse a été bien démontrée. Les souris apoE -/- ayant une mutation du gène codant pour le M-CSF développent quatre à dix fois moins de plaques que les souris apoE -/- présentant le gène non muté (Smith JD et al Proc Natl Acad Sci USA 1995). La différenciation des monocytes en macrophages est une étape indispensable dans la formation de la plaque (Randolph GJ Curr Opin Lipidol. 2008).

Les macrophages jouent également un rôle au niveau de la matrice extra-cellulaire de la plaque. L'activation des macrophages s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion de métalloprotéinases (MMP : Metalloproteinase), enzymes protéolytiques dégradant la matrice extracellulaire et donc la plaque d'athérome. 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 prostaglandine E2 en réponse à une augmentation de l'activité de la cyclooxygénase 2 (COX-2) (Cipollone F et al Circulation. 2001).

Pour mieux comprendre l'implication de l'immunité innée dans l'athérosclérose, il convient maintenant d'évoquer les récepteurs présents à la surface des macrophages.

#### **I.3.1 Récepteurs de l'immunité innée**

L'activation de l'immunité innée par l'intermédiaire de récepteurs constitue une première défense contre les pathogènes. Ces récepteurs reconnaissent des motifs hautement conservés présents chez de nombreux pathogènes, appelés PAMP. Les récepteurs PRR (pour *Pattern Recognition Receptor*,) impliqués dans la reconnaissance de ces ligands exogènes reconnaissent aussi des

ligands endogènes appelés DAMP ou alarmines (Gallucci S et al Curr Opin Immunol. 2001, Kono H et al Nat Rev Immunol. 2008).

La liaison de ces signaux « Danger » avec un PRR va aboutir à l'activation de l'immunité innée (figure 4). Cette activation peut se traduire par la sécrétion de cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$ ), la migration cellulaire (avec l'acquisition de CCR7 par exemple), l'expression de molécules de costimulation (CD80, CD86,..) permettant à ces cellules de l'immunité innée d'acquérir la capacité de présenter l'antigène aux lymphocytes T (figure 4). La production d'IL-12 par les cellules dendritiques conventionnelles en réponse à la stimulation des TLR est à l'origine de la polarisation des lymphocytes T vers le profil Th1 caractérisé par la synthèse d'IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  entre autres. Ces PRR correspondent à une famille de récepteurs comprenant notamment les TLR (pour *Toll Like Receptor*) (Iwasaki A et al Nat Immunol. 2004 , Palm NW et al Immunol Rev. 2009).

Les TLR stimulent par un nombre limité de voies de signalisation, conservées par les différents TLR. Il est généralement accepté que tous les TLR (en particulier TLR2, TLR5, TLR7, TLR8 et TLR9) à l'exception de TLR3 utilisent la molécule MyD88 (pour *Myeloid Differentiation primary response protein 88*), comme protéine adaptatrice pour initier la voie de signalisation puis des kinases de la famille IRAK (pour *IL-1 Receptor-Associated Kinase*) (Miggin SM et al J Leukoc Biol. 2006, Kawai T et al Cell Death Differ. 2006). TLR3 implique les protéines adaptatrices, Trif (pour *TIR domain containing adaptor-inducing IFN- $\beta$* ) et IFN-related factor 3 (Kawai T et al Cell Death Differ. 2006).

TLR4 utilise à la fois des voies de signalisation dépendantes de MyD88 et indépendantes de MyD88 dont celle de Trif par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice TRAM (Trif-related adaptor molecule) (Miggin SM et al J Leukoc Biol. 2006, Kawai T et al Cell Death Differ. 2006).

Ces voies de signalisation aboutissent à l'activation et la translocation vers le noyau des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 (pour *activating-protein-1*) qui régulent la transcription de nombreux gènes, dont celle de cytokines pro-inflammatoires. (Miggin SM et al J Leukoc Biol. 2006, Kawai T et al Cell Death Differ. 2006).

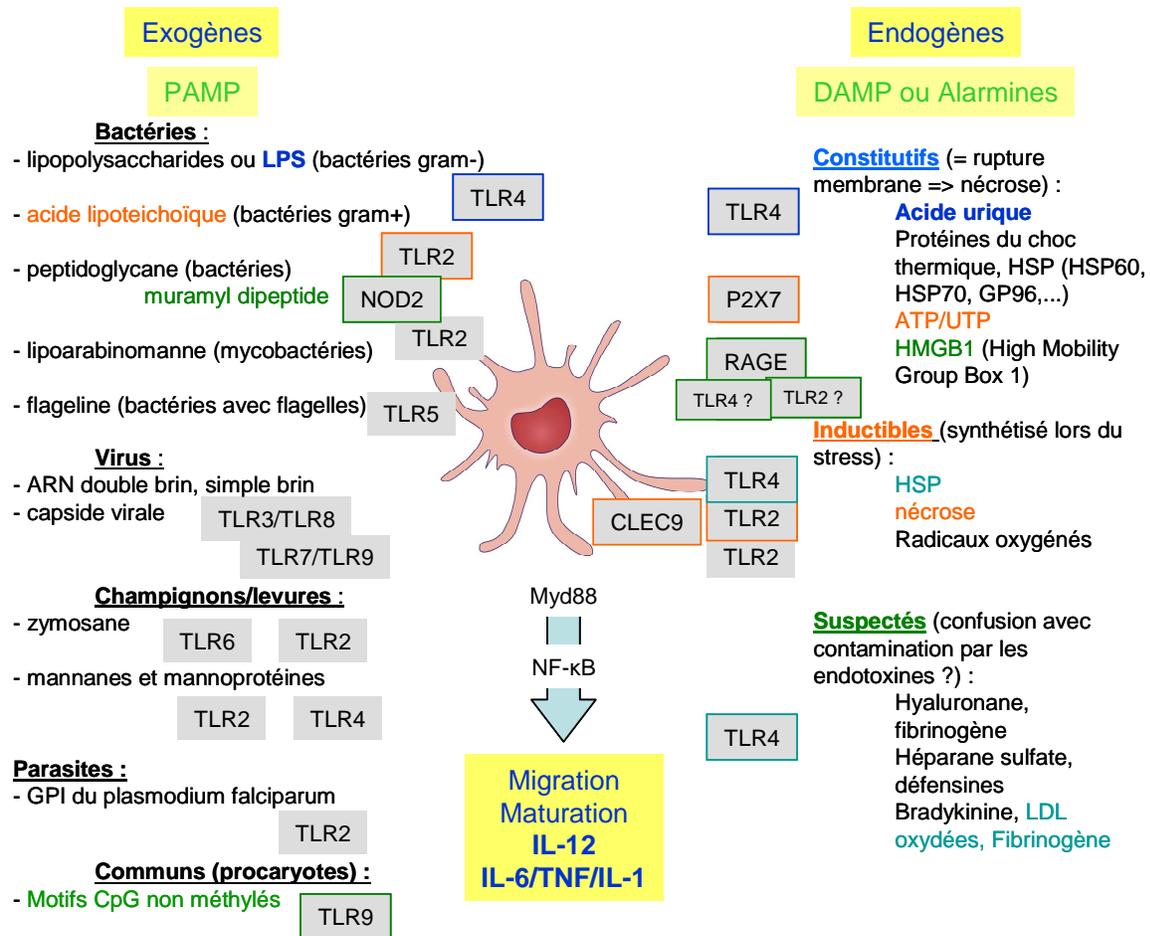


Figure 4. Les différents PRR et leurs ligands. Ces ligands peuvent être d'origine exogène (PAMP) et être principalement exprimés par les agents pathogènes (bactéries, virus, champignons ou parasites). Des exemples de PAMP sont donnés sur le schéma en regard du PRR participant à leur reconnaissance. Le LPS est le représentant « emblématique » reconnu par TLR4 ; ceci a fait l'objet de la première identification d'un rôle pour un TLR chez les mammifères (Medzhitov R et al Nature. 1997). Un motif moléculaire commun aux pathogènes procaryotes (les motifs CpG déméthylés) représente un PAMP « universel » reconnu par le TLR endosomal, TLR9. Les ligands peuvent être aussi d'origine endogène (DAMP ou alarmines) et produits par notre propre organisme en réponse à une agression. Selon Polly Matzinger (Gallucci S et al Curr Opin Immunol. 2001), il est possible de distinguer 2 grandes familles de DAMP : ceux dits constitutifs et libérés lors de la perte de l'intégrité de la membrane plasmique (ici l'exemple est l'acide urique) (Shi Y et al Nature. 2003) et ceux dits inductibles par le stress (comme les HSP). Par ailleurs, d'autres facteurs pourraient être considérés comme des DAMP. Ils sont mentionnés comme suspectés sur le schéma. Le doute repose sur le fait que l'identification n'a pas été confirmée en présence d'un agent neutralisant les endotoxines (un ligand bien connu de TLR4) (Kono H et al Rev Immunol. 2008). Un jeu de couleur permet de faire le lien entre certaines alarmines et le PRR impliqués dans leur reconnaissance. Ainsi, les cellules nécrotiques peuvent être reconnues par TLR2 ou CLEC9 (Sancho D et al Nature. 2009). Dans le cadre qui nous intéresse (TLR et athérosclérose), il faut remarquer que le TLR4 serait capable de reconnaître des DAMPs par ailleurs décrits comme favorisant l'athérosclérose : les LDL oxydées (voir chapitre suivant) et le fibrinogène. Les PRR peuvent être exprimés à la membrane plasmique ou au niveau intracellulaire (comme NOD2 ou les TLR situés dans les endosomes : TLR3, TLR7, TLR8, TLR9). Les conséquences de la stimulation des PRR sont synthétisées dans le carré jaune et passe en général par l'activation de NF-κB. **Abbréviations** : GPI : glycosylphosphatidyl inositol, RAGE, **R**eceptor for **A**dvanced **G**lycation **E**nd products.

### **I.3.2 Récepteurs de l'immunité innée et LDL oxydées**

La région oxydée des LDL pourrait être reconnue par des récepteurs des cellules de l'immunité innée. Il a été montré que les récepteurs « *scavenger* » reconnaissent les LDL oxydées, mais pas les LDL naturelles (Goldstein JL et al Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1979).

Ces récepteurs « *scavengers* » constituent une autre famille de récepteurs exprimés par les cellules phagocytaires de l'immunité innée. Ils sont impliqués dans l'élimination des cellules mourantes, cellules entrant en apoptose. La stimulation de ces récepteurs « *scavengers* » dans de l'élimination de cellules apoptotiques s'accompagnent le plus souvent d'une inhibition des fonctions de la cellule phagocytaire et parfois même de la synthèse de cytokines anti-inflammatoire, comme l'IL-10 ou le TGF- $\beta$  (Wermeling F et al J Exp Med. 2007, Erwig LP et al Cell Death Differ. 2008).

Dans le développement de l'athérosclérose, ces récepteurs « *scavengers* » permettent l'accumulation des lipides au sein du macrophage. D'autres récepteurs peuvent être à l'origine de l'activation du macrophage vers un profil inflammatoire. Ainsi, les récepteurs de la famille TLR et des protéines associées, en particulier MD2, reconnaissent également les LDL oxydées et certains phospholipides oxydés (Miller YI et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005, Erridge C et al J Biol Chem 2008).

Cette reconnaissance semble avoir un impact sur l'athérogénèse. En effet, chez la souris apoE  $-/-$ , l'inactivation de MyD88, le transducteur du signal de tous les TLR à l'exception de TLR3 (Kaisho TJ Allergy Clin Immunol 2006), réduit les lésions d'athérosclérose (Björkbacka H et al Nat Med 2004)

Des études récentes ont également montré que les polymorphismes de TLR4 (aboutissant à une plus faible activité du récepteur) diminueraient la progression de la maladie athéromateuse et le risque de complications cardio-vasculaires (Ameziane N et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003, Boekholdt SM et al Circulation 2003, Kiechl S et al N Engl J Med 2002).

Le macrophage et ces récepteurs interviennent donc dans la progression de l'athérosclérose. L'analyse du polymorphisme de ces récepteurs ou du promoteur contrôlant leur expression pourrait permettre de définir une population de patients à risque.

### **I.3.3 Autres cellules de l'immunité innée impliquées dans l'athérosclérose**

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 cellules dendritiques (DC) ont également été identifiées au sein de la plaque (Doherty TM et al Trends Immunol 2006). Ces cellules portent des PRR et pourraient également être activées par les LDL oxydées et d'autres ligands présents dans la plaque. Certaines sous-populations de DC expriment également TLR7 et TLR9 impliqués dans la réponse anti-virale (Niessner A et al Circulation. 2006, Gilliet M et al Nat Rev Immunol. 2008). TLR9 permet de percevoir les motifs CpG méthylés, caractéristiques communes des procaryotes. Certaines sous-populations de DC sont les CPA professionnelles les plus efficaces de l'organisme pour activer les lymphocytes T naïfs. Donc, l'activation des DC au sein de la plaque d'athérome peut ainsi être à l'origine de l'activation de l'immunité adaptative.

Les cellules natural killer (NK) sont également présentes dans la plaque d'athérome (Melian A et al Am J Pathol 1999, Chan WL et al Circ Res 2005, Bobryshev YV et al J Vasc Surg 2002). Les lésions athéromateuses contiennent d'ailleurs des chimiokines responsables du recrutement des cellules NK. La 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 Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001, Lesnik P et al J Clin Invest. 2003, Wuttge DM et al Am J Pathol. 2001). Les souris LDL<sub>R</sub> <sup>-/-</sup> ayant des cellules NK incapables de libérer leurs granules

(souris  $Lys^{\text{beige}}$ ) ont une réduction des lésions athéromateuses suggérant le rôle pro-athérogène de ces cellules (Schiller NK et al Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002).

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.

#### **I.4. Place de l'immunité adaptative dans l'athérosclérose**

L'immunité adaptative est mise en jeu lorsque des épitopes antigéniques spécifiques sont reconnus par des récepteurs tels que le TCR (T-cell receptor) ou le BCR (B-cell receptor). De nombreux travaux ont montré l'existence d'une expansion oligoclonale de lymphocytes T dans les lésions athéromateuses (Caligiuri G et al Circulation 2000, Stemme S et al Proc Natl Acad Sci USA 1995).

Ceci suggère qu'un nombre limité d'antigènes au sein des lésions athéromateuses est à l'origine d'une prolifération de lymphocytes T spécifiques. L'antigène le plus important serait sans doute un constituant des LDL oxydées.

De nombreux travaux soutiennent le rôle majeur de l'immunité adaptative dans l'athérogénèse. L'existence d'un déficit en lymphocytes T et B réduit les lésions athéromateuses de 40 à 80%. Ceci a été constaté chez les souris apoE <sup>-/-</sup> ou LDL<sub>R</sub> <sup>-/-</sup> croisées avec des souris immunodéficientes RAG <sup>-/-</sup> ou SCID (Dansky HM et al Proc Natl Acad Sci USA 1997, Daugherty A et al J Clin Invest 1997, Reardon CA et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001, Song L et al J Clin Invest 2001, Zhou X et al Circulation 2000). Le transfert de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez des souris apoE <sup>-/-</sup> x SCID <sup>-/-</sup> rétablit des lésions athéromateuses similaires à celles observées chez les souris immunocompétentes confirmant l'effet pro-athérogène des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Zhou X et al Circulation 2000).

Les différents modèles animaux explorant cette phase (souris invalidées pour certaines cytokines ou souris ne présentant pas de lymphocytes) et mettant en évidence l'importance de l'immunité adaptative dans la progression des lésions d'athérosclérose sont rappelés dans le tableau 2.().

| Modèles                                  | Immunité adaptative         | Effets sur l'athérome comparés aux souris apoE <sup>-/-</sup> | Références bibliographiques     |
|--|-----------------------------|---|---------------------------------|
| RAG1 <sup>-/-</sup>                      | Lymphocytes=0               | diminution  | Dansky HM et al<br>PNAS 1997    |
| RAG2 <sup>-/-</sup>                      | Lymphocytes=0               | diminutio   | Daughtery HM et al<br>JCI 1997  |
| Ac anti-CD154                            | Lymphocytes T<br>Inactivés* | diminution  | Mach F et al Nature<br>1998     |
| CD154 <sup>-/-</sup> apoE <sup>-/-</sup> | Lymphocytes T<br>Inactivés* | diminution x 5  | Lutgens E et al Nat<br>Med 1999 |

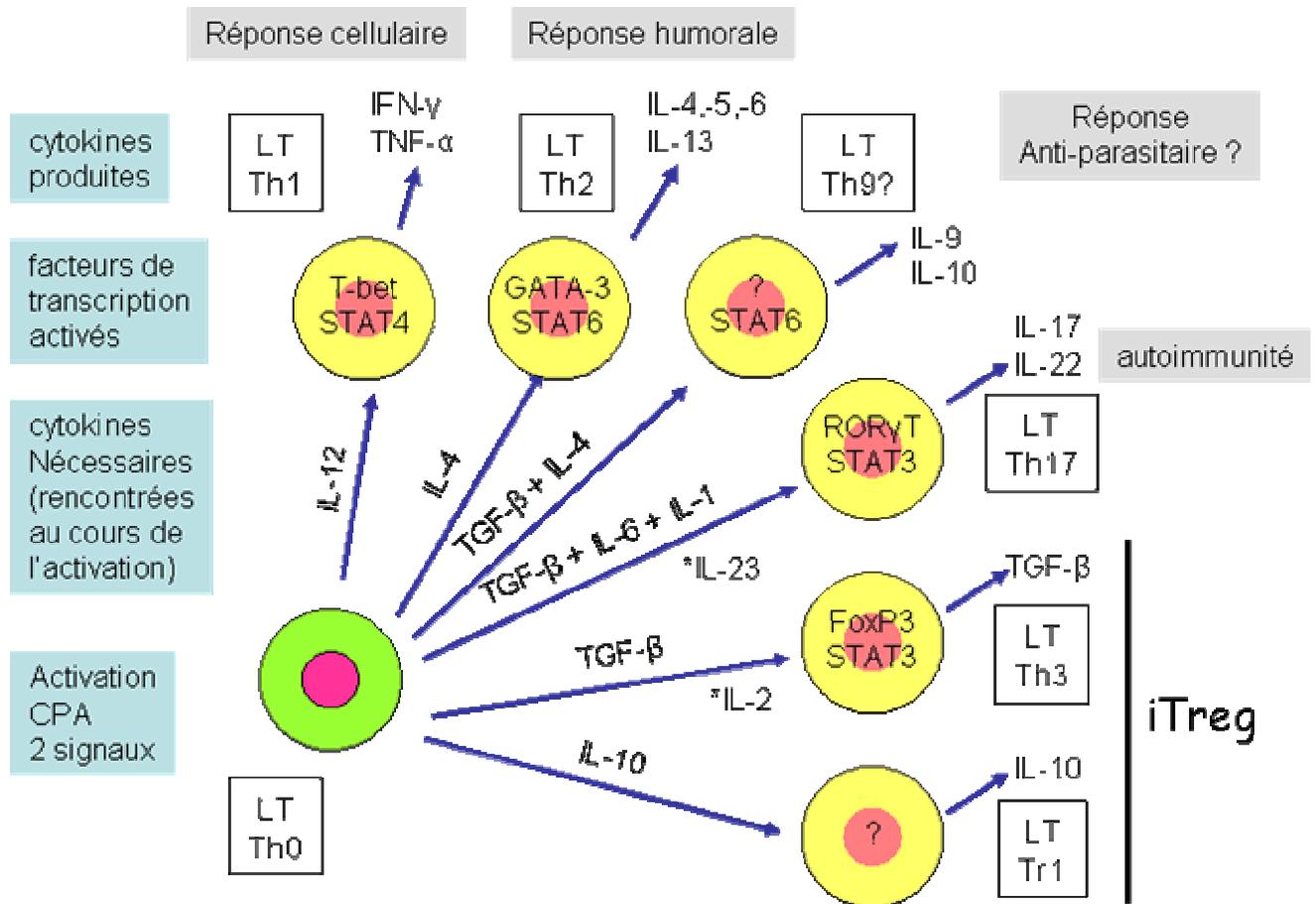
**Tableau 2:** Modèles animaux explorant le rôle de l'immunité adaptative dans la formation des lésions athéromateuses (d'après tableau 2 G. K. Hansson. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 ; 21 : 1876-1890)

\* L'activation des lymphocytes B et des CPA est diminuée du fait de l'absence de CD154 (CD40L). Le CD40L est important pour la commutation isotypique.

Ces expériences consistent à invalider l'ensemble des lymphocytes T. Les lymphocytes T correspondent à un ensemble hétérogènes de sous-populations avec des fonctions différentes, comme la cytotoxicité, la production de cytokines proinflammatoires ou encore la suppression. Nous allons voir dans le prochain chapitre comment ses différentes sous-populations lymphocytaires sont impliquées dans l'athérosclérose.

#### **I.4.1. Cytokines et athérosclérose : rôle de l'orientation de la réponse lymphocytaire T**

La polarisation de la réponse lymphocytaire T CD4 peut suivre plusieurs voies avec des conséquences fonctionnelles très différentes (figure 5). L'orientation de la réponse immunitaire vers un versant d'immunité à médiation cellulaire avec un profil de sécrétion cytokinique pro-inflammatoire Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) domine au sein des lésions athéromateuses (Frostegard J et al Atherosclerosis 1999).



### Figure 5 : Polarisation de la réponse lymphocytaire T CD4.

Après activation, le lymphocyte T CD4 naïf (Th0) peut suivre différentes orientations :

- Th1 en présence d'IL-12, principalement secrétée par la cellule dendritique sous l'effet de l'IFN- $\gamma$  libéré par les cellules NK. Cette voie se poursuit par la différenciation et l'activation des lymphocytes T CD8 cytotoxiques. A noter que cette voie Th1, permet aussi la synthèse et sécrétion d'anticorps liant le complément (cytolytique).
- Th2 en présence d'IL-4 secrétée principalement par les mastocytes. Cette voie favorise la réponse humorale et la synthèse d'immunoglobulines. Elle est impliquée dans les réponses d'hypersensibilité ou dirigées contre les helminthes.
- une nouvelle voie Th9, impliquerait la production de TGF- $\beta$  et d'IL-4. Elle pourrait intervenir dans des réponses anti-parasitaires (tout comme la voie Th2).
- Th17, en présence d'IL-6 (et/ou IL-1 $\beta$ ) et TGF- $\beta$ . Cette voie pro-inflammatoire a été impliquée dans différentes pathologies : psoriasis, polyarthrite rhumatoïde, l'asthme et le modèle expérimental de la sclérose en plaque (EAE).
- Th3 et Tr1, correspondent à des Treg induits. Ceci est réalisé sous l'effet du TGF- $\beta$  ou de l'IL-10. Sur ce schéma, sont répertoriées l'environnement cytokinique nécessaire pour la polarisation des lymphocytes T CD4, les facteurs de transcriptions impliqués et les principales cytokines sécrétées après polarisation. Sur ce schéma, n'est pas représenté la cellule présentatrice d'antigène (CPA) initiatrice de l'activation lymphocytaire \*, cytokine impliquée dans l'expansion et non la polarisation. Modifiée d'après, P Saas et al., Transfu Clin Biol., 2008.

Il est aujourd'hui bien démontré que cette réponse Th1 est pro-athérogène. Chez la souris apoE<sup>-/-</sup> ou LDL<sub>R</sub><sup>-/-</sup> également invalidée pour le gène du récepteur de l'IFN- $\gamma$ , on note une diminution de 60% de la taille des lésions d'athérosclérose (Gupta S et al. J Clin Invest 1997, Buono C et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003). Des études ont également montré que l'injection d'IFN- $\gamma$  à des souris apoE<sup>-/-</sup> aggravait les lésions athéromateuses (Whitman SC et al Am J Pathol 2000).

L'IFN- $\gamma$  est une cytokine de type 1 produite par les lymphocytes T CD4 de type 1, des lymphocytes T CD8 et les cellules NK après activation synergique par l'IL-12 et l'IL-18. L'IL-12 et l'IL-18 semblent être également pro-athérogènes chez la souris apoE<sup>-/-</sup>. L'IL-12 interviendrait principalement aux stades précoces de l'athérogénèse (Davenport P et al Am J Pathol 2003). La principale source d'IL-12 est la cellule dendritique conventionnelle (CDC). Chez la souris apoE<sup>-/-</sup>, le déficit en IL-12 réduit les lésions d'athérosclérose (Davenport P et al Am J Pathol 2003, Zhao L et al J Biol Chem 2002) tandis que l'injection d'IL-12 augmente ces lésions dans le même modèle. L'administration d'IL-18 quant à elle accroît l'étendue des plaques chez la souris apoE<sup>-/-</sup> (Whitman SC et al Circ Res 2002). La surexpression de l'inhibiteur endogène de l'IL-18, l'IL-18 binding protein (IL-18BP), réduit les lésions d'athérosclérose et modifie profondément la composition des plaques leur attribuant un phénotype plus stable (Mallat Z et al Circ Res 2001). Il a été suggéré que l'effet pro-athérogène de l'IL-18 est dépendant de l'IFN- $\gamma$ . En effet, cet effet est aboli chez les souris apoE<sup>-/-</sup> IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> (Whitman SC et al Circ Res 2002). Cependant, l'effet pro-athérogène de l'IL-18 peut être observé en l'absence de lymphocytes T (Tenger C et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005). Il a en effet été montré que l'injection intra-péritonéale d'IL-18 à des souris apoE<sup>-/-</sup> Scid/Scid aggrave les lésions athéromateuses tout en s'accompagnant d'une élévation des concentrations d'IFN- $\gamma$ , dont l'origine est probablement les cellules NK (Tenger C et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005)..

Le TNF- $\alpha$ , autre cytokine de type 1, favorise la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, l'activation des macrophages et augmente l'expression des molécules d'adhérence endothéliale et pourrait par ces mécanismes favoriser le développement de la plaque,(Canault M et al J Pathol 2008) en affectant les premières étapes de sa formation. Les propriétés anti-thrombotiques des cellules endothéliales sont profondément altérées par l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$ , qui augmentent l'activité procoagulante de type facteur tissulaire et suppriment l'activité anticoagulante relayée par le système thrombomoduline-protéine C, en diminuant l'expression de la thrombomoduline. Ces cytokines modifient aussi les propriétés fibrinolytiques des cellules endothéliales en diminuant la production de l'activateur du plasminogène de type tissulaire (tPA) et en augmentant la production de l'inhibiteur du tPA, le PAI-1. Ainsi, les cytokines pro-inflammatoires de la plaque, produites entre autres par les lymphocytes de type 1 activés, pourraient aussi intervenir dans les complications thrombotiques associées à l'athérosclérose (Mallat Z et al Circ Res 2001).

Par ailleurs, il a été montré que les souris apoE  $-/-$  TNF $\alpha$   $-/-$  développent moins de lésions athéromateuses que les souris apoE  $-/-$  (Ohta H et al Atherosclerosis 2005). L'effet athérogène du TNF- $\alpha$  pourrait être réduit dans certaines circonstances du fait de l'action inhibitrice du TNF- $\alpha$  sur l'expression du gène du récepteur « scavenger » par les macrophages. Ceci pourrait réduire la capture de LDL oxydées par ces mêmes cellules (Van Lenten BJ et al J Immunol 1992, Hsu HY et al J Biol Chem 1996). Ce dernier mécanisme pourrait être un mécanisme de rétrocontrôle tentant d'empêcher la formation de cellules spumeuses. Cependant, tous ces éléments montrent sans équivoque que l'orientation de la réponse lymphocytaire vers un profil de type 1 contribue à aggraver les lésions d'athérosclérose.

Le schéma inflammatoire de l'athérosclérose ressemble de très près à celui habituellement décrit dans les pathologies inflammatoires chroniques. Il existe un infiltrat inflammatoire composé de lymphocytes, de DC et de macrophages, suivi par une prolifération des cellules mésenchymateuses (Ross R N Engl J Med 1999). Comme dans toute réaction inflammatoire, il est attendu que l'athérosclérose s'accompagne de la production de cytokines anti-inflammatoires qui participent à la résolution de l'inflammation.

Les cytokines de type 1 et 2 exercent entre elles une régulation croisée. La production d'IL-4 (Type 2) empêche la polarisation de type 1 et la production d'IL-12, IL-18 ou IFN- $\gamma$  diminue la réponse de type 2. Un profil de sécrétion cytokinique de type 2 est plus rarement exprimé dans les plaques athéromateuses que le profil de type 1 (Frostegard J et al Atherosclerosis 1999). L'IL-4 est principalement produite par les lymphocytes T CD4 Th2, les éosinophiles, les cellules basophiles et les mastocytes. Les effets de l'IL-4 sont généralement considérés comme anti-inflammatoires par opposition à la réponse de type 1. Cependant, de nombreux travaux suggèrent que l'IL-4 pourrait avoir un effet pro-athérogène, en particulier en augmentant l'expression de VCAM-1 (Galea P et al J Immunol 1993, Lee YW et al J Mol Cell Cardiol 2001, Lusinskas FW et al J Cell Biol 1994) et MCP-1 (Lee YW et al Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003, Rollins BJ et al Am J Pathol 1991). D'ailleurs, la réalisation d'une greffe de moelle osseuse provenant de souris IL-4  $-/-$  à des souris LDL<sub>R</sub>  $-/-$  diminue les lésions athéromateuses (King VL et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002). Enfin, les plaques d'athérome sont réduites chez les souris apoE  $-/-$  x IL-4  $-/-$  par rapport aux souris uniquement apoE  $-/-$  (Davenport P et al Am J Pathol 2003).

Il est intéressant de noter que dans les modèles animaux d'athérosclérose, l'hypercholestérolémie prolongée est associée à un « *switch* Th2 » avec la production d'IL-4 (Zwacka RM et al Nature Med 1998). L'utilisation de modèles animaux apoE  $-/-$  x IL-12  $-/-$  et apoE  $-/-$  x IL-4  $-/-$  suggère que les réponses de type 1 et 2 sont toutes deux pro-athérogènes. Les lymphocytes de type 1

jouent principalement un rôle dans les phases de formation de la plaque, les lymphocytes de type 2 durant les phases plus tardives de développement des lésions athéromateuses (Davenport P et al Am J Pathol 2003)..

Ainsi, même si l'athérosclérose se développe plutôt dans un contexte de type 1, il n'y a pas d'argument solide suggérant que favoriser la réponse de type 2 pourrait limiter la progression des lésions. D'ailleurs, l'existence chez l'homme d'une maladie de type 2 (l'asthme par exemple) ne protège pas de la survenue d'une maladie de type 1 (maladie coronaire par exemple). Le concept de balance « Th1/Th2 » est probablement une réduction simpliste des interactions lymphocytaires au cours du processus athéromateux. Néanmoins, ceci n'exclut pas un certain degré de contre-régulation entre les systèmes type 1 et type 2 dans l'athérosclérose. En effet, alors qu'aux stades tardifs de l'athérosclérose, le déficit en IL-4 diminue les lésions, le déficit en IL-12 aggrave les lésions, suggérant qu'à cette phase, la réponse de type 1 pourrait moduler l'effet type 2 pro-athérogène (Davenport P et al Am J Pathol 2003). De plus, l'identification récente d'autres voies de polarisation « effectrices » (Th17, Th9) permet également de sortir de cette dichotomie « Th1/Th2 » (Dardalhon V et al Nat Immunol. 2008, Veldhoen M et al Nat Immunol. 2008, Korn T et al Annu Rev Immunol. 2009). Par ailleurs, l'activation des lymphocytes T CD4 naïfs peut aussi aboutir à des réponses régulatrices.

Les réponses régulatrices Th3 (TGF- $\beta$ ) et Tr1 (IL-10) sont susceptibles de modifier l'évolution de la plaque athéromateuse. Les souris doublement invalidées pour le gène de l'apoE et le gène de l'IL-10 ont une incidence accrue de plaques ulcérées et de thromboses coronaires par rapport aux souris simplement apoE -/- (Hanson GK Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001). A l'inverse, l'induction d'une réponse lymphocytaire de type Tr1 ou la délivrance locale ou systémique d'IL-10 à l'aide d'adénovirus diminue l'importance des lésions athéromateuses chez les souris apoE -/- (Mallat Z et al Circulation 2003, Von Der Thusen JH et al FASEB J 2001). L'IL-10 est présente dans les plaques d'athérosclérose humaine et son expression locale est inversement corrélée aux

signes d'inflammation (appréciée par l'expression de NO synthase-II) et à la mort des cellules par apoptose (Mallat Z et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999).

Le TGF- $\beta$  limite quant à lui le recrutement des leucocytes et favorise la synthèse de collagène et de matrice extra-cellulaire (Noble NA et al Prog Growth Factor Res 1992). Il aurait donc plutôt un effet fibrosant favorisant la stabilisation des plaques préformées et prévenant ainsi la rupture de la paroi et le risque de thrombose vasculaire (Cipollone F et al Stroke 2004). L'injection d'anticorps anti-TGF- $\beta$  chez des souris apoE  $-/-$  accélère l'athérosclérose (Hanson GK Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001). Il en est de même, lorsque des souris apoE  $-/-$  sont croisées avec des souris ayant un déficit de la signalisation du TGF- $\beta$  au sein des lymphocytes T (souris ayant un déficit de la signalisation du récepteur II du TGF- $\beta$ , RTGF- $\beta$  II  $-/-$ ) (Robertson AK et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006).

L'immunisation avec la protéine du choc thermique 65 (*heat shock protein* [HSP65]) aggravant l'athérosclérose, il a été suggéré que l'induction de tolérance vis à vis de HSP65 pourrait moduler le développement de l'athérosclérose expérimentale. Harats et al ont mis en évidence une réduction de la taille des lésions après administration orale d'HSP65 à des souris LDL<sub>R</sub>  $-/-$  immunisée avec *Mycobacterium Tuberculosis* ou recevant une alimentation riche en graisses suggérant que l'induction de tolérance vis à vis de HSP65 pourrait être anti-athérogène (Harats D et al J Am Coll Cardiol 2002).

Dans cette étude, il était également observé un *switch* Th2 avec production d'IL-4 (Harats D et al J Am Coll Cardiol 2002). Maron et al ont également montré une réduction des lésions athéromateuses après administration orale ou nasale de HSP65 (Maron R et al Circulation 2002). Lorsque l'administration se faisait par voie nasale, il était également mis en évidence une augmentation de la production d'IL-10 (Maron R et al Circulation 2002). Par ailleurs, le rôle du

TGF- $\beta$  dans la tolérance orale est bien connu (Chen W et al *Curr Med Chem.* 2007). Ceci suggère un rôle de la réponse T suppressive, mais en explorent mal les mécanismes impliqués. Complétant ces résultats, Mallat et al ont généré des clones Tr1 spécifiques de l'ovalbumine et les ont administrés à des souris apoE -/- (Mallat Z et al *Circulation* 2003). Les auteurs ont observé une suppression de la réponse de type 1 et une augmentation de la production d'IL-10 par les lymphocytes T périphériques stimulés (Mallat Z et al *Circulation* 2003). L'induction de cette réponse Tr1 était associée à une réduction du développement des lésions athéromateuses accompagnée d'une diminution de l'accumulation de macrophages et de lymphocytes T sans modification des contenus en collagène et cellules musculaires lisses des plaques. Cette dernière étude montre que le transfert de lymphocytes Tr1, non spécifiques d'un antigène connu de la plaque, module la réponse immune et limite le développement des plaques chez la souris apoE -/- . Néanmoins, cette étude n'apporte pas de réponse sur le rôle des lymphocytes T régulateurs endogènes.

Il a par ailleurs été montré que le transfert de splénocytes sans Treg centraux (Treg<sub>n</sub>) aggrave les lésions d'athérosclérose chez les souris apoE -/- x RAG -/- par rapport au transfert de splénocytes contenant des Treg<sub>n</sub> (Ait Oufella H et al *Nat Med* 2006). Cet effet pro-athérogène est aboli après reconstitution d'un compartiment normal de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, qui représentent essentiellement des Treg<sub>n</sub> chez la souris naïves (Ait Oufella H et al *Nat Med* 2006). L'effet protecteur rapporté est associé à une production accrue d'IL-10 par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et à une augmentation des fonctions suppressives Treg dépendantes du TGF- $\beta$ . Il est ainsi possible qu'un déficit inné ou acquis des fonctions T régulatrices participe au développement de l'athérosclérose, comme cela a été décrit dans la polyarthrite rhumatoïde (Flores-Borja F et al *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008). Plus récemment, il a été mis en évidence une balance entre les Treg périphériques ou induits (iTreg), dits aussi Th3 et les lymphocytes T Th17 sécrétant une cytokine spécifique, l'IL-17. Les Treg Th3 et les lymphocytes Th17 sont générés tous deux en

présence de TGF- $\beta$  (Wahl SM Curr Opin Immunol. 2007). Il a été montré que les patients ayant un syndrome coronarien aigu avaient un nombre accru de lymphocytes Th17, une production augmentée de cytokines liées à la polarisation Th17 (IL-17, IL-6, IL-23), et une expression plus importante du facteur de transcription ROR $\gamma$ , spécifique des lymphocytes T Th17 (Cheng X et al Clin Immunol. 2008). Par ailleurs, chez ces mêmes patients, il était observé une diminution du nombre de lymphocytes Treg, une production diminuée de cytokines liées aux Treg (IL-10, TGF- $\beta$ ), et une expression plus faible du facteur de transcription FoxP3 (Cheng X et al Clin Immunol. 2008). Ces résultats suggèrent clairement une rupture de la balance Th17/Treg en faveur d'un phénotype pro-inflammatoire Th17.

Par ailleurs, chez la souris apoE  $-/-$  x IL-18  $-/-$ , l'hypercholestérolémie accélère l'athérosclérose *via* la polarisation Th17 (Pejnovic N et al Mol Immunol. 2009) Enfin, il a été montré que l'IL-17 est produite par les lymphocytes T infiltrant la plaque d'athérome (Eid RE et al Circulation. 2009).

Les différents types de lymphocytes T régulateurs sont représentés dans la figure 6.

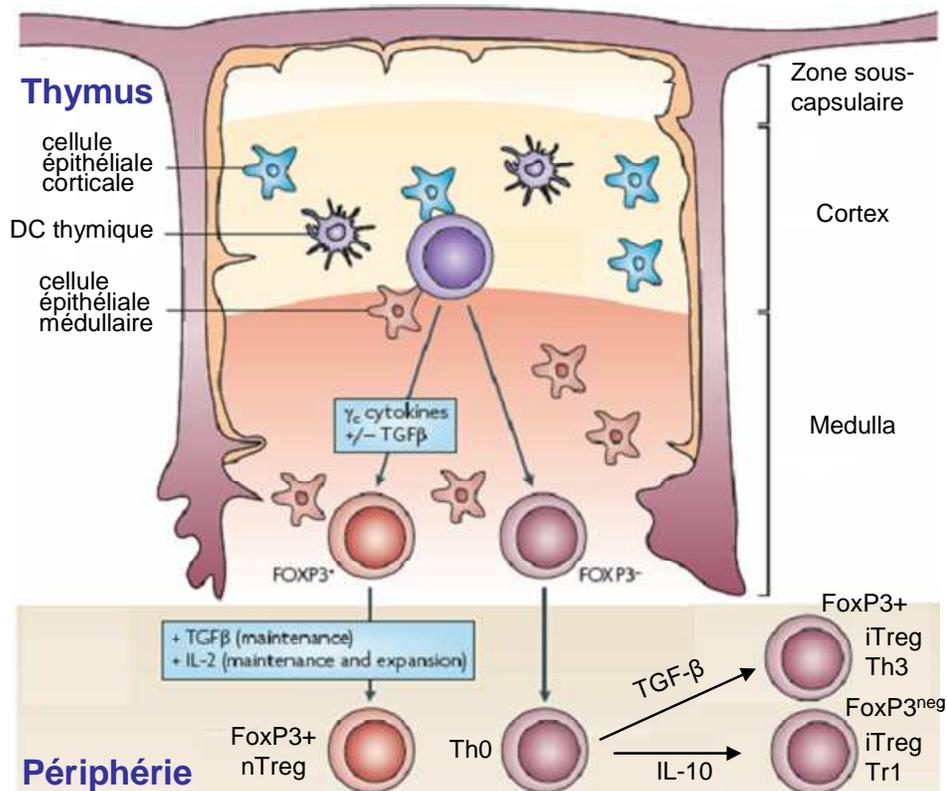
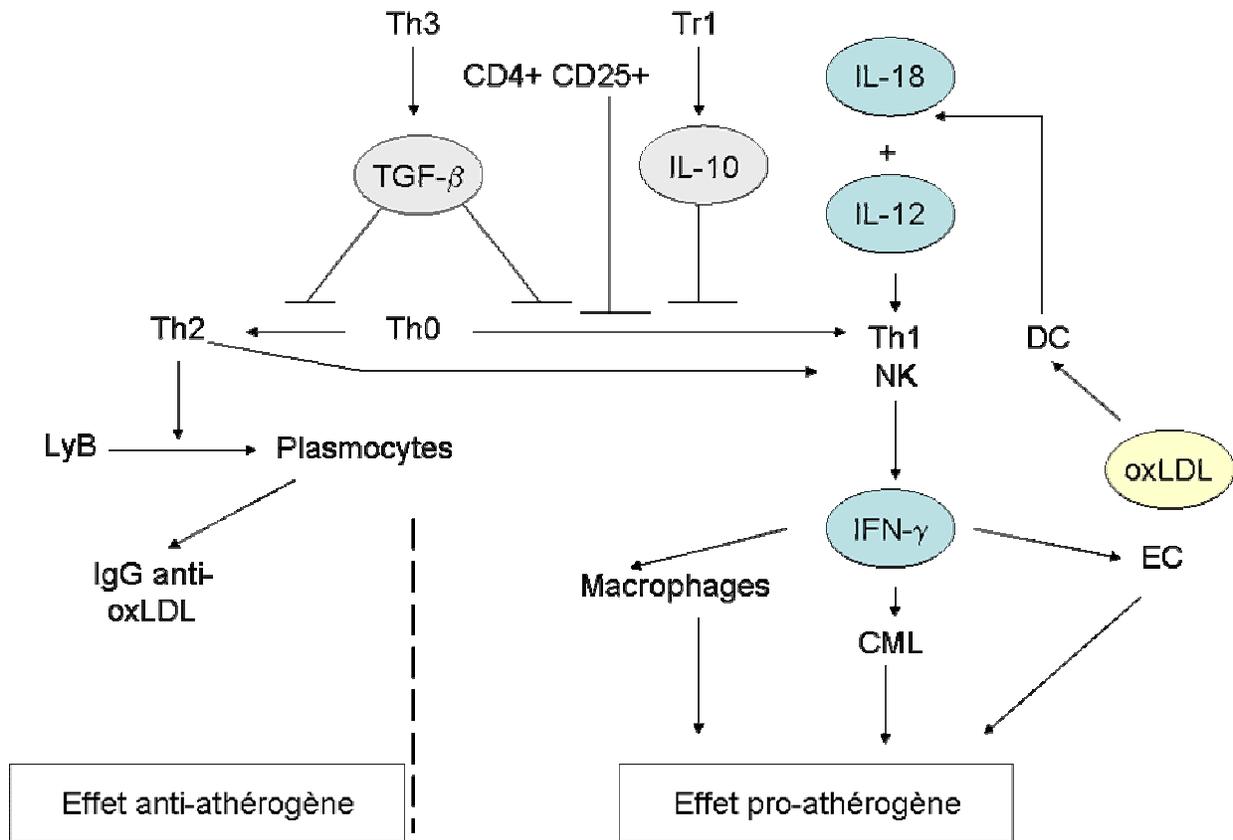


Figure 6 : Les différentes populations de lymphocytes T régulateurs CD4 (Treg). On distingue 2 grandes familles de Treg : les Treg centraux ou nTreg générés au sein du thymus (à gauche) et les Treg périphériques (iTreg) générées à partir d'un lymphocyte T CD4 naïf (Th0) en périphérie sous l'action de cytokines comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (à droite). Il est très difficile voire impossible à ce jour de différencier les nTreg des lymphocytes Th3 (générés en présence de TGF- $\beta$ ) d'un point de vue phénotypique et fonctionnel, puisqu'ils expriment tous deux : le CD25, FoxP3, pas de CD127 et dépendent tous deux du TGF- $\beta$ . En revanche, il est possible de distinguer les Tr1 (générés en présence d'IL-10), car ils n'expriment pas FoxP3. Leur mécanisme de suppression implique l'IL-10. (Modifiée d'après Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? Nat Rev Immunol. 2009)

Une nouvelle population de lymphocytes T CD4+, les Th9 (sécrétant de l'IL-9 et de l'IL-10) récemment mis en évidence, aurait un rôle dans l'inflammation tissulaire (Dardalhon V et al Nat Immunol. 2008).

et serait une population issue des Th2 par « reprogrammation » *via* l'action du TGF- $\beta$  et de l'IL-4 (Veldhoen M et al Nat Immunol. 2008). Il n'existe néanmoins pas à ce jour de travaux sur le rôle potentiel de cette population Th9 dans le processus athéromateux.

(Un récapitulatif simplifié de l'influence de la polarisation des lymphocytes T CD4+ est fourni dans la figure 7)



**Figure 7 : Schéma simplifié des effets des différentes voies de polarisation des lymphocytes**

### **T CD4 sur la plaque d'athérome**

Les LDL oxydées sont reconnues par des PRR à la surface des macrophages et des cellules dendritiques (DC). L'IL-18 et l'IL-12, produites par les DC, agissent de façon synergique sur les lymphocytes de type 1 et les cellules NK. Ces cellules produisent de l'IFN- $\gamma$  dont l'action est pro-athérogène. L'action des lymphocytes de type 2 est plus ambivalente. Ils aggravent l'athérosclérose via l'augmentation de l'expression de VCAM-1 et MCP-1, mais pourraient avoir une action anti-athérogène via la production par les plasmocytes d'IgG anti-LDL oxydées dépendante de l'activation des lymphocytes de type 2. Les Treg inhibent les voies Th1 et Th2 et ont donc une action anti-athérogène.

CML : cellules musculaires lisses

## **I.4.2. Athérosclérose : une place pour l'immunité humorale ?**

### **I.4.2.1. Place des anticorps**

Outre la réponse immunitaire cellulaire, l'athérosclérose a également été associée à une activation globale de l'immunité à médiation humorale (Caligiuri G et al Lab Invest 2003). Parmi les nombreux anticorps spécifiques décrits dans la littérature, une élévation du titre d'anticorps dirigés contre les LDL oxydées est caractéristique des patients athéromateux (Salonen JT et al Lancet 1992). Ces anticorps peuvent former des complexes avec les LDL oxydées circulantes et activer la cascade du complément, contribuant ainsi aux dommages infligés aux vaisseaux. Néanmoins, ces complexes peuvent également favoriser l'élimination des LDL oxydées par les monocytes circulants et par les macrophages présents dans les plaques d'athérome ou en périphérie (notamment dans la rate). Que des titres réduits d'anticorps anti-LDL oxydées après splénectomie soient associés à une augmentation marquée de la taille de la lésion des souris déficientes en apolipoprotéine E (Caligiuri G et al J Clin Invest 2002)

renforce cette hypothèse. De plus, l'immunisation des souris athéroscléreuses avec des LDL oxydées augmente le titre d'anticorps spécifiques et conduit à une réduction de la taille des lésions chez la souris (Freigang S et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998, Zhou X et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001).

Cependant, chez l'Homme, le taux d'anticorps anti-LDL oxydées est corrélé à la progression de l'athérosclérose carotidienne (Salonen JT et al Lancet 1992, Palinski W et al J Int 2000). De plus, un certain nombre d'anticorps anti-LDL oxydées reconnaissent des motifs cardiolipines et sont donc apparentés aux anticorps anti-phospholipides qui augmentent la captation des LDL oxydées par les macrophages (Hasunuma Y et al Clin Exp Immunol 1997)

et ont un effet thrombogène (Hugues JR et al Thromb Res 1998).

D'ailleurs, chez l'Homme, de nombreuses études ont retrouvé une association entre des titres élevés d'anticorps anti-phospholipides et une augmentation du risque d'évènements athéromateux (Vaarala O et al *Circulation* 1995, Wu R et al *Arterioscler Thromb Vascul Biol* 1997, Brey RL et al *Stroke* 2001, Bili A et al 2000, Zuckerman E et al *Am J Med* 1996).

Le rôle précis de la réponse humorale dans la progression de l'athérosclérose chez l'Homme est donc difficile à déterminer.

#### **I.4.2.2. Place des lymphocytes B**

Dans les modèles expérimentaux de maladies immunitaires à médiation cellulaire ou type I, une réponse humorale dirigée contre les auto-antigènes confère une protection: il a été démontré que les complexes anticorps-antigènes dirigent les autoantigènes vers les lymphocytes B, ce mode de présentation entraînant une réponse cellulaire de type 2, protectrice (Saoudi A et al *J Exp Med* 1995, Taylor-Robinson AW et al *Infect Immun* 1994).

Dans les modèles d'athérosclérose, les lymphocytes B de souris âgées, ayant développées des lésions d'athérosclérose, assurent une protection quand elles sont transférées à des souris jeunes, mais susceptibles de développer la maladie (hypercholestérolémiques) (Caligiuri G et al *J Clin Invest* 2002). Au contraire, les lymphocytes B de jeunes souris qui n'ont pas encore développé la maladie ne confèrent pas de protection. Les lymphocytes B ne sont donc pas capables de prévenir le déclenchement de la maladie, laquelle est dominée par une réponse immunitaire de type 1. Cependant, en parallèle de la progression de la maladie, les souris souffrant d'athérosclérose développent une maturation des lymphocytes B qui contribue possiblement à réduire la progression des lésions chez les souris âgées.

Comme les lymphocytes T, les lymphocytes B correspondent à différentes populations cellulaires munies de différentes fonctions. Certains lymphocytes B exercent aussi une fonction régulatrice

avec la production d'IL-10 et d'autres des cytokines pro-inflammatoires voire même de l'IL-12 (pour revue : Gray D et al Eur J Immunol. 2007).

Les études que nous rapportons ci-dessus n'ont pas évalué la part des différentes populations de lymphocytes B dans l'athérosclérose.

L'athérosclérose est donc une pathologie inflammatoire dans laquelle le système immunitaire jouerait un rôle prépondérant à la fois dans le contrôle et la progression des plaques d'athérome. Tout déséquilibre affectant le système immunitaire peut donc modifier le processus de l'athérogénèse.

## I.5 Système immunitaire et facteurs de risque cardio-vasculaire

De nombreux paramètres, non-immunologiques, influencent également l'athérogénèse. Il s'agit principalement de facteurs métaboliques (dyslipidémies, diabète, ...), mécaniques (hypertension artérielle) ou affectant la coagulation (hyperhomocystéinémie). Ces paramètres ont eux-mêmes des déterminants très variés, innés ou acquis. Néanmoins, la réponse immune peut également avoir des effets sur différents facteurs eux-mêmes impliqués dans l'athérogénèse.

Concernant le métabolisme lipidique, l'IFN- $\gamma$  diminue l'efflux de HDL cholestérol ce qui pourrait contribuer à son potentiel athérogène (Panousis CG et al J Lipid Res 2000). A l'opposé, le TGF- $\beta$  augmente l'efflux de cholestérol lié à l'apolipoprotéine A1 (Panousis CG et al J Lipid Res 2001).

Néanmoins, les interactions entre système immunitaire et facteurs de risque cardio-vasculaire traditionnels les mieux connues concernent le risque de diabète. Les phénomènes inflammatoires jouent en effet un rôle majeur dans la régulation de la sensibilité à l'insuline. Ainsi, les souris n'exprimant pas le TNF- $\alpha$  ont une meilleure sensibilité à l'insuline (Uysal KT et al Nature 1997).

Le TNF- $\alpha$  stimule par ailleurs la phosphorylation (conduisant à l'inhibition) des résidus sérines-thréonines présents sur les IRS-1 (pour *Insulin Receptor Substrate-1*), les récepteurs de l'insuline (Paz K et al J. Biol. Chem 1997, Aguirre V et al J. Biol. Chem 2000) D'autre part, la surexpression d'IL-6 chez l'animal conduit à un état d'insulino-résistance caractérisée par des taux élevés d'insuline et une diminution de la capture du glucose au niveau tissulaire (Franckhauser S et al Diabetologia. 2008).

Chez l'Homme, plusieurs études suggèrent que le polymorphisme -174(G $\rightarrow$ C) du promoteur du gène de l'IL-6, qui est associé à une réduction du taux de transcription de l'IL-6, prévient le risque de diabète de type 2 (Kubaszek A et al Diabetes 2003, Herbert A et al Diabetologia 2005,

Vozarova B et al Human Genet 2003). Dans une autre étude plus récente, le risque de diabète était uniquement augmenté chez les femmes (Balkau B et al Diabetes Care. 2008).

A l'inverse, les concentrations d'IL-10 mesurées *in vitro* après stimulation par le LPS seraient associées au risque de développer un diabète de type 2. Les faibles producteurs ont un risque multiplié par trois par rapport aux forts producteurs (van Exel E et al Diabetes 2002). La capacité de production d'IL-10 prédite par les polymorphismes A-592C and T-819C influence également le risque de survenue d'un diabète de type 2. Les patients ayant les plus grandes capacités de sécrétion semblent avoir un risque plus faible de diabète de type 2 (Chang YH et al Hum Immunol 2005). Cet effet semble en rapport avec une augmentation de l'insulino-résistance chez les patients faibles producteurs d'IL-10 (Scarpelli D et al Diabetes. 2006, Blüher M et al 2005).

Il est intéressant de constater que le paradigme réponse inflammatoire (IL-6) pro-athérogène / réponse anti-inflammatoire (IL-10) anti-athérogène semble également pertinent pour qualifier les effets de la réponse immunitaire sur les facteurs de risque cardio-vasculaire.

## **II. Athérosclérose et transplantation rénale : données épidémiologiques**

Les données épidémiologiques les plus fiables concernent essentiellement les syndromes coronariens aigus (SCA). Plusieurs travaux récents ont montré que l'incidence des SCA était particulièrement importante dans la première année suivant la transplantation. 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 J Am Soc Nephrol 2006). Gill et al (Gill JS et al J Am Soc Nephrol 2005) ont montré, sur une cohorte de 604 patients en attente de transplantation, qu'alors que l'incidence des événements 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).

Dans notre registre, l'incidence des événements 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. Meier-Kriesche et al ont montré à partir des données USRDS que l'excès de mortalité cardio-vasculaire était lui aussi maximal dans le premier trimestre suivant la transplantation (Meier-Kriesche HU et al Am J Transplant. 2004). Après la première année de transplantation, l'incidence des SCA est plus faible, mais reste élevée par rapport à la population générale. Dans l'étude de Kasiske et al, l'incidence cumulée de l'infarctus du myocarde à 36 mois était de 8.7% (Kasiske BL et al J Am Soc Nephrol 2006). Dans cette étude, un excès de risque d'infarctus du myocarde était observé chez les patients transplantés par rapport à ceux restés sur la liste d'attente jusqu'à 15 mois après la transplantation ; au delà, le risque devenait supérieur chez les patients n'ayant pas bénéficié d'une transplantation.

Ces données doivent probablement être modulées. Dans notre registre, l'incidence après la première année est de 0,56 % (données non publiées). Dans une étude s'appuyant sur les données

du registre USRDS, l'incidence des SCA était de 0,65% (13). Il est à noter que l'incidence des évènements coronariens dans l'étude ALERT (Jardine AG et al Am J Kidney Dis. 2005) est également plus faible que dans l'étude de Kasiske et al (Kasiske BL et al J Am Soc Nephrol 2006).

Il existe en fait une assez grande dispersion du risque coronarien (Kasiske BL et al J Am Soc Nephrol 1996, Bentdal OH et al Clin Transpl 1998, Ponticelli C et al Kidney Int 2002, Ducloux D et al Kidney Int. 2004, Fernandez-Fresnedo G et al Transplant Proc 2003). De l'ensemble de ces études, on peut caractériser le risque coronarien des transplantés comme un risque moyen à élevé (compris entre 5 et 15% à 10 ans).

L'incidence des événements cardiovasculaires est donc plus élevée après transplantation rénale que dans la population générale (Kasiske BL et al 1996, Kasiske BL et al J Am Soc Nephrol 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 Kidney Int. 2004, Kasiske BL et al 1996, Kasiske BL et al J Am Soc Nephrol 2000).

Nous avons contribué à identifier d'autres facteurs dits non traditionnels tels que l'hyperhomocystéinémie (Ducloux D et al J Am Soc Nephrol. 2000) et l'existence d'un état pro-coagulant (Kazory A et al Thromb Haemost. 2004) comme des éléments pouvant expliquer l'athérosclérose accélérée du transplanté rénal. Néanmoins, peu de données existent concernant le rôle du système immunitaire dans la progression de l'athérosclérose après transplantation. Le transplanté rénal constitue pourtant « un modèle d'étude » particulièrement intéressant, puisqu'il cumule un risque de complications athéromateuses élevé et un état variable d'immunosuppression obtenu par l'utilisation de molécules ayant des mécanismes d'action différents sur la réponse immunitaire.

Les immunosuppresseurs sont indispensables pour prévenir le rejet aigu et prolonger la survie des greffons. Leurs effets secondaires sont bien connus et en particulier leur impact sur différents facteurs de risque cardio-vasculaire a été étudié en détail. Cependant, l'impact direct de l'immunosuppression sur l'athérosclérose reste mal connu chez l'homme. Beaucoup d'immunosuppresseurs ont des effets métaboliques qui augmentent le nombre de facteurs de risque ou aggravent ces mêmes facteurs de risque déjà présents (Gill JS Clin J Am Soc Nephrol. 2008) et pourraient par ce biais influencer la maladie athéromateuse. L'effet pro- ou anti-athérogène d'un immunosuppresseur directement en relation avec son effet sur la réponse immunitaire est difficile à prédire, puisqu'il devrait résulter de son effet sur des mécanismes pro-inflammatoires (réponse Th1 et Th17) et anti-inflammatoires (Treg).

Les mécanismes d'action des immunosuppresseurs utilisés en transplantation pourraient interférer directement avec les voies impliquées dans l'athérosclérose (Pour revue : Taylor AL Crit Rev Oncol Hematol. 2005). Les globulines anti-lymphocytaires polyclonales sont à l'origine d'une lymphodéplétion intéressant particulièrement les lymphocytes T CD4 (Muller TF Transplantation 1997). Ces cellules sont très représentées au sein de la plaque et leur rôle dans l'athérogénèse est bien démontré (Hanson GK Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001). Une réduction prolongée du taux de lymphocytes T CD4 pourrait avoir des effets anti-athérogènes.

Le Tacrolimus et la Ciclosporine inhibent la calcineurine dont le rôle est d'activer des facteurs de transcription de l'interleukine-2 (IL-2) dont NFAT (Taylor AL Crit Rev Oncol Hematol. 2005). Ces immunosuppresseurs bloquent donc la synthèse d'IL-2 et d'autres cytokines et maintiennent les lymphocytes T en phase G0 (Taylor AL Crit Rev Oncol Hematol. 2005). En théorie, ces effets pourraient être anti-athérogènes. Par ailleurs, les anti-calcineurines augmentent la synthèse de TGF- $\beta$  ayant un rôle également anti-athérogène (Taylor AL Crit Rev Oncol Hematol. 2005). Les corticoïdes ont des effets immunosuppresseurs qui pourraient également influencer l'athérogénèse principalement par l'augmentation du TGF- $\beta$  et de l'apoptose des lymphocytes T

CD4. Néanmoins, anti-calcineurines et corticoïdes ont des effets métaboliques pro-athérogènes qui empêchent de spéculer sur l'effet net de ces traitements sur l'évolution de la plaque.

Le Mycophénolate Mofétil (MMF) pourrait également agir directement sur le processus athéromateux en inhibant la glycosylation et l'expression de molécules d'adhésion (VCAM, ICAM), en favorisant l'apoptose des lymphocytes T et des monocytes et en inhibant la prolifération des cellules musculaires lisses (Taylor AL Crit Rev Oncol Hematol. 2005).

Les inhibiteurs de mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) bloquent la prolifération et la survie des lymphocytes T activés par l'IL-2 (Taylor AL Crit Rev Oncol Hematol. 2005). Le Sirolimus semble par ailleurs permettre l'expansion de lymphocytes T de type régulateurs (Battaglia M J Immunol. 2006). Comme le MMF, les inhibiteurs de mTOR bloquent la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. Néanmoins, l'effet des inhibiteurs de mTOR sur le métabolisme lipidique réduit probablement l'impact de ces propriétés.

Ainsi, les différents immunosuppresseurs pourraient moduler le processus athéromateux.

Néanmoins, l'effet net sur l'athérosclérose est difficile à définir compte tenu d'effets métaboliques pro-athérogènes inhérents à leur utilisation et au risque d'infections pouvant favoriser l'athérogénèse. Enfin, l'association constante de plusieurs molécules dans les protocoles immunosuppresseurs rend illusoire l'analyse de l'effet particulier de l'un d'eux en situation clinique.

## Objectifs

Nous avons décidé d'envisager les effets de différents aspects de la réponse immunitaire sur l'athérosclérose du transplanté rénal. Ce travail répond en fait à deux questions principales :

- Les phénomènes immunologiques modifiant le cours évolutif de l'athérosclérose chez des sujets immunocompétents sont-ils opérants chez le transplanté rénal recevant des immunosuppresseurs ?
- Existe-t-il, après transplantation rénale, des mécanismes originaux, non observés chez les sujets sains ?

Nous avons donc d'une part étudié le rôle de l'immunité innée et de la polarisation lymphocytaire dans l'athérosclérose après transplantation rénale. D'autre part, nous avons étudié l'influence de la déplétion lymphocytaire induite par les globulines anti-lymphocytaires polyclonales utilisées comme traitement d'induction immunosuppresseur sur l'athérosclérose du transplanté.

Nous avons par ailleurs exploré le rôle de l'inflammation sur la survenue d'un diabète *de novo* après transplantation, le diabète étant un facteur traditionnel de risque cardio-vasculaire.

**Article 1**

**CD4 CELL LYMPHOPENIA AND ATHEROSCLEROSIS IN RENAL TRANSPLANT  
RECIPIENTS.**

**Ducloux D, Challier B, Saas P, Tiberghien P, Chalopin JM.**

**J Am Soc Nephrol. 2003 Mar;14(3):767-72.**

## **Immunité adaptative**

Nous avons initialement tenté de déterminer si l'intensité de l'immunosuppression était prédictive du risque de complications athéromateuses. La première étape consistait à identifier un marqueur objectif d'immunosuppression.

Muller et al avaient montré sur un faible nombre de patients que l'utilisation de globulines anti-lymphocytaires polyclonales pouvait s'accompagner d'une lymphopénie T CD4 prolongée (Muller TF et al Transplantation 1997). Nous avons mis en évidence que cette lymphopénie T CD4 persistante est un phénomène fréquent après utilisation de globulines anti-lymphocytaires polyclonales et que les patients lymphopéniques ont un risque accru de complications liées à l'immunosuppression (cancers cutanés, autres cancers solides, infections opportunistes tardives) (et Annexes I) (Ducloux D et al Transpl Int 2002, Ducloux D et al Transplantation 1998, Ducloux D et al Transplant Proc 1998).

La lymphopénie T CD4 est donc un marqueur de sur-immunosuppression chez les patients ayant reçu des globulines anti-lymphocytaires polyclonales. L'intérêt potentiel de ce marqueur dans l'athérosclérose était renforcé par la constatation que les patients ayant une lymphopénie T CD4, soit après irradiation massive (survivants de Nagasaki et Hiroshima), soit au cours de l'infection due au VIH semblent plus susceptibles de développer des complications athéromateuses (Krishnaswamy G et al Cardiol Rev 2000, Constans J et al Ann Med 1995, Tabib A et al Coron Artery Dis 2000, Depairon M et al 2001).

D'autre part, l'analyse du registre américain de transplantation (USRDS) a montré un risque accru de décès d'origine cardio-vasculaire chez les transplantés rénaux ayant reçu des globulines anti-lymphocytaires polyclonales (Meier-Kriesche H et al. J Am Soc Nephrol 2002).

Nous avons donc étudié chez 302 patients stables, transplantés depuis au moins un an et ayant reçu une induction avec des globulines anti-lymphocytaires polyclonales la relation entre lymphopénie T CD4 persistante et évènements athéromateux.

# CD4 Cell Lymphopenia and Atherosclerosis in Renal Transplant Recipients

DIDIER DUCLOUX,\* BRUNO CHALLIER,<sup>§</sup> PHILIPPE SAAS,<sup>#</sup>  
PIERRE TIBERGHEN,<sup>#</sup> and JEAN-MARC CHALOPIN\*

Departments of \*Nephrology and Renal Transplantation, <sup>§</sup>Medical Information, Saint Jacques Hospital; and <sup>#</sup>Blood Transfusion Center of Franche-Comté; INSERM E0119/UPRES EA2284, University of Franche-Comté; Besançon, France.

**Abstract.** Several animal studies suggest that T cell-mediated immunodeficiency may play a role in the progression of atherosclerosis. This study examined the association between lymphocyte subsets and atherosclerotic events in renal transplant recipients. A total of 302 consecutive renal transplant recipients were enrolled in this prospective study. Peripheral blood lymphocyte subsets were quantified and analyzed with respect to other known cardiovascular risk factors. The patients were followed for a mean duration of  $23.5 \pm 4.5$  mo. Mean CD4, CD8, and CD19 cell levels were  $511 \pm 290/\text{mm}^3$ ,  $553 \pm 596/\text{mm}^3$ , and  $66 \pm 62/\text{mm}^3$ , respectively. CD4 levels were positively related to transplant duration ( $r = 0.32$ ;  $P = 0.02$ ) and inversely related to age ( $r = 0.35$ ;  $P = 0.01$ ). Twenty-five

atherosclerotic events (AE) occurred in 25 patients (8.3%). CD4 levels were lower in patients who experienced CVE ( $288 \pm 170/\text{mm}^3$  versus  $531 \pm 290/\text{mm}^3$ ;  $P < 0.0001$ ). Cox regression analysis showed that patients in the three upper quartiles of CD4 cell count had a decreased risk of CVE compared with those in the lowest quartile. There was a linear increase in risk of CVE with decreasing CD4 cell count ( $P < 0.0001$ ). A CD4 cell count in the highest quartile ( $>663/\text{mm}^3$ ) divided the risk of CVE by 10 as compared with the lowest quartile. In conclusion, CD4 lymphocytopenia is an independent risk factor for the development of cardiovascular complications in renal transplant recipients, suggesting that impaired immune response promotes accelerated atherogenesis in this population.

Stable renal transplant recipients (RTR) have disproportionately high rates of arteriosclerotic outcomes (1). An increased prevalence of traditional cardiovascular risk factors cannot fully explain this increased incidence of CVE in the transplant population (2), and our group has recently emphasized the role of nontraditional cardiovascular risk factors, such as hyperhomocysteinemia (3). A recent study from the USRDS registry showed an increased cardiovascular mortality in RTR having received polyclonal antilymphocyte globulins (4), suggesting either that intense immunosuppression may accelerate native atherosclerosis or that polyclonal antithymocyte globulins exerts specific long-term detrimental effects on the course of atherosclerosis. Nevertheless, interpretation of this finding is challenged by the fact that the atherosclerotic lesion contains large number of immune cells, particularly macrophages and T cells. Furthermore, atherosclerosis is associated with systemic immune responses, including inflammation.

On the other hand, several animal studies have shown that immunosuppression may accelerate native atherosclerosis (5-8).

Moreover, an increased incidence of cardiovascular events has been reported in AIDS patients (9), and recent reports suggest a correlation between intensity of immunodeficiency and presence of atherosclerotic plaques (10). Lastly, a significant decrease in CD4 cells has been described in the blood of atomic bomb survivors, and an increased incidence of myocardial infarction in this population has been found to be associated with a lower proportion of CD4 cells (11).

Muller *et al.* (12) demonstrated that polyclonal antilymphocyte globulins may induce persistent changes in lymphocyte subsets characterized by low CD4 cell count and CD8 cell expansion. Our group has recently demonstrated that CD4 cell count is a potent marker of excessive immunosuppression in RTR (13,14). We postulated that T cell-mediated immunodeficiency as reflected by CD4 lymphocytopenia may be associated with atherosclerosis in RTR. We therefore prospectively examined the relation between peripheral blood CD4 cell counts and atherosclerotic events (AE) in a large population of stable RTR.

## Materials and Methods

### Patients Characteristics

Participants in the study were 302 consecutive, stable RTR (*i.e.*, transplant duration  $> 12$  mo; no acute rejection, serum creatinine  $< 400 \mu\text{mol/L}$ ).

Twenty patients were treated with azathioprine and prednisone alone, and 219 patients were treated with azathioprine and prednisone in similar doses as well as cyclosporine or tacrolimus. Thirty-one patients were treated with mycophenolate mofetil and prednisone, and

Received September 20, 2002. Accepted October 30, 2002.

Correspondence to Dr. Didier Ducloux, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, Saint Jacques Hospital, Besançon, France. Phone: 33-3-81-21-87-82; Fax: 33-3-81-21-87-81; E-mail: dducloux@chm-besancon.fr

1046-6673/1403-0767

Journal of the American Society of Nephrology

Copyright © 2003 by the American Society of Nephrology

DOI: 10.1097/01.ASN.0000048718.43419.44

32 patients were treated with mycophenolate mofetil and prednisone in similar doses as well as cyclosporine or tacrolimus.

#### Cardiovascular Risk Factors

Age, gender, weight, size, BP, hemodialysis duration before transplantation, diabetes mellitus, smoking status, past history of cardiovascular events (CVE), immunosuppressive treatment (use of calcineurin inhibitors), and different biologic parameters were assessed upon inclusion.

#### Definition of Past History of CVE

**Coronary heart disease:** myocardial infarction; coronary revascularization including coronary artery bypass surgery or percutaneous transluminal coronary angioplasty; typical history of angina with abnormal 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.

#### Nutritional Status

Albumin concentration was determined. Body mass index (BMI) was calculated ( $\text{weight}/[\text{size}]^2$ ).

#### Smoking Behavior

Subjects were categorized as current smokers or nonsmokers.

#### Blood Pressure

BP was measured using a semiautomatic device, based on an oscillometric method with the patients in a sitting position after resting more than 5 min. Pulse pressure (Systolic BP - Diastolic BP) was calculated.

#### Left Ventricular Hypertrophy (LVH)

LVH was defined by a Sokolow index  $\geq 35$ .

#### Lipid Profile

Triglycerides and total and HDL cholesterol serum concentrations were measured. LDL cholesterol was calculated using the method described by Friedwald.

#### Homocysteine

Total plasma homocysteine (tHcy) was measured using a previously described method (2). Briefly, venous blood samples were drawn after an overnight fast. The blood sample was centrifuged within 15 min, and plasma was stored frozen at  $-20^\circ\text{C}$ . Hcy concentration, the sum of the acid-soluble (that is reduced Hcy, homocystine, disulphide, and homocysteine-cysteine mixed disulphide) and protein-bound moieties, was measured by HPLC. This assay involves the following steps: reduction of the sample with tri-n-butylphosphine, precipitations of proteins, alkalization of the supernatant with sodium borate, derivitization with 7-fluoro-2-oxa-1,3 diazole-4 sulfonate, followed by 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid, and HPLC separation with fluorescence detection. The normal values of plasma Hcy concentration ranged from 7 to  $15 \mu\text{mol/L}$ . The precision of the assay corresponds to a coefficient of variation  $< 3\%$ .

#### C-Reactive Protein

C-reactive protein was measured by Nephelometry (Kit Beckman).

#### Renal Function

Serum creatinine concentration and urinary protein excretion were measured. Creatinine clearance was calculated using the Gault-Cockcroft formula.

#### PTH, Vitamin D, Ca, Ph

PTHi was measured using an immunoradiometric assay, with a normal range between 15 and 80 pg/ml. Calcium and phosphorus were measured by standard autoanalyzer techniques.

#### Cytomegalovirus

CMV serology (ELISA) was performed at the entry in the study.

#### Lymphocyte Subsets

Lymphocytes subsets were measured by flow cytometry. Total blood samples were incubated with FITC-conjugated anti-CD4, phycoerythrin (PE)-conjugated, anti-CD8, FITC-anti-CD3 (5diacclone, Besançon, France), PE-anti-CD19 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) monoclonal antibodies, and appropriate Ab controls. After red cell lysis, sample analysis was performed on a FACSCalibur (Becton-Dickinson) using CellQuest software (Becton-Dickinson).

#### Atherosclerotic Events

**Coronary Heart Disease.** Myocardial infarction documented by serial 12-lead electrocardiogram evidence or Q-wave infarction and appropriate myocardial enzyme elevations; coronary revascularization, including coronary artery bypass surgery or percutaneous transluminal coronary angioplasty; typical history of angina with abnormal coronarography.

**Stroke/Cerebrovascular Disease.** Both nonhemorrhagic and hemorrhagic strokes confirmed by neurologic examination findings consistent with new-onset focal neurologic deficits, with or without computed tomography or magnetic resonance imaging evidence of cerebral infarction; symptomatic extracranial artery stenosis resulting in carotid endarterectomy.

**Abdominal Aortic or Lower Extremity Arterial Disease.** Abdominal aortic repair; lower extremity revascularization via bypass surgery or angioplasty; lower extremity amputation; new onset of intermittent claudication confirmed by Doppler or arteriography findings.

Two physicians independent of the study were responsible for CVE ascertainment. This analysis was performed without knowledge of baseline characteristics.

#### Statistical Analyses

Arithmetic mean was calculated and expressed as  $\pm$  SD. Using log rank tests on Kaplan-Meier nonparametric estimates of the survival without AE distribution, we selected variables with a  $P \leq 0.20$ . The selected variables were included into a Cox proportional hazards model, and a backward stepwise selection process was performed, this time at a classical  $\alpha = 0.05$ . The time elapsed since kidney transplantation was bound to vary between patients; therefore, this duration was forced into the Cox model as a covariate. Gender and age being potential confounding variables, they were also entered into the Cox model, no matter the significance of their relationships with CVE. Age was split into two classes separated by the median age (51 yr) of the cohort, CD4 and CD8 counts were split into quartiles (CD4 limits: 299, 471, and  $663/\text{mm}^3$ ; CD8 limits: 283, 440, and  $637/\text{mm}^3$ ), as was serum homocysteine (limits: 13.1, 16.9, and  $21.0 \mu\text{mol/L}$ ). Tobacco consumption was accounted for as currently smoking *versus* non-smoking. Variables that were split into quartiles were replaced by

dummy variables in the Cox model, which tested quartile 2 versus quartile 1, quartile 3 versus quartile 1, and quartile 4 versus quartile 1. 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 CVE is increased) or less than 1 (*i.e.*, risk of CVE is decreased). Assumptions of Cox models (log-linearity, proportionality of risk in time) were met in this analysis.

**Results**

The patients were followed for a mean duration of 23.5 ± 4.5 mo. Their mean age was 50 ± 13.5 yr, and 190 (63%) were men. Diabetes and LVH were present in 51 patients (17%) and 25 (8.2%), respectively. Seventy patients (23.1%) were current smokers. Mean transplant duration and hemodialysis duration were 72 ± 55 and 28 ± 37 mo, respectively. Two hundred and sixty-seven patients (88.4%) had a positive CMV serology, but no patient exhibited CMV replication. Categorical variables are described in Table 1, continuous variables in Table 2.

*Lymphocyte Subsets*

Mean CD4 and CD8 levels were 511 ± 290/mm<sup>3</sup> and 553 ± 596/mm<sup>3</sup>, respectively. Mean CD4/CD8 ratio was 1 ± 0.92. Mean CD19 level was 66 ± 62/mm<sup>3</sup>.

There was a positive correlation between CD4 levels and transplant duration (*r* = 0.32; *P* = 0.02). By contrast, CD4 cell count was inversely related to age (*r* = 0.35; *P* = 0.01).

*Cardiovascular Events*

Twenty-five AE (8.3%) occurred in 25 patients (cerebrovascular disease, 3; coronary heart disease, 16; peripheral vascular disease, 6). Ten patients (3.3%) died, four (1.3%) of cardiovascular causes. CD4 levels were lower in patients who expe-

Table 2. Description of continuous variables

| Variable                      | Mean    | Standard Deviation | Median |
|-------------------------------|---------|--------------------|--------|
| Age (yr)                      | 49.82   | 13.59              | 51.00  |
| Transplant duration (mo)      | 72.48   | 55.75              | 68.50  |
| SCt Clearance (ml/min)        | 49.68   | 18.02              | 49.03  |
| UPE (g/d)                     | 0.46    | 0.91               | 0.10   |
| PTH (pg/ml)                   | 97.00   | 133.87             | 61.50  |
| Vitamin D (ng/ml)             | 17.07   | 14.49              | 13.00  |
| Phosphorus (mmol/L)           | 1.17    | 0.21               | 1.16   |
| Calcium (mmol/L)              | 2.44    | 0.14               | 2.44   |
| Hemoglobin (g/100 ml)         | 12.94   | 1.76               | 13.00  |
| Fibrinogen (g/L)              | 3.85    | 0.90               | 3.80   |
| LDL cholesterol (g/L)         | 1.26    | 0.36               | 1.23   |
| HDL cholesterol (g/L)         | 0.57    | 0.21               | 0.54   |
| Total serum cholesterol (g/L) | 2.13    | 0.47               | 2.11   |
| Triglycerides (g/L)           | 1.54    | 1.11               | 1.28   |
| Serum homocysteine (μmol/L)   | 18.15   | 6.96               | 16.90  |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )      | 24.42   | 4.35               | 23.81  |
| SBP (mmHg)                    | 135.85  | 19.07              | 140.00 |
| DBP (mmHg)                    | 80.56   | 10.09              | 80.00  |
| PP (mmHg)                     | 55.94   | 15.47              | 55.00  |
| Glycemia (mmol/L)             | 5.49    | 1.52               | 5.10   |
| CD3 (/mm <sup>3</sup> )       | 1059.64 | 645.36             | 915.00 |
| CD4 (/mm <sup>3</sup> )       | 511.34  | 290.40             | 471.00 |
| CD8 (/mm <sup>3</sup> )       | 552.61  | 595.91             | 439.50 |
| CD4/CD8 ratio                 | 1.30    | 0.93               | 1.13   |
| CD19 (/mm <sup>3</sup> )      | 66.43   | 61.77              | 49.00  |
| CRP (mg/L)                    | 4.51    | 4.12               | 3.00   |
| Serum albumin (g/L)           | 43.64   | 4.31               | 44.00  |

Table 1. Description of categorical variables

| Variable                        | Category | Frequency (%) |
|---------------------------------|----------|---------------|
| Gender                          | Male     | 191 (63.25%)  |
|                                 | Female   | 111 (36.75%)  |
| History of cardiovascular event | Yes      | 25 (8.28%)    |
|                                 | No       | 277 (91.72%)  |
| Tobacco consumption             | Yes      | 72 (23.84%)   |
|                                 | No       | 230 (76.16%)  |
| Diabetes                        | Yes      | 69 (22.85%)   |
|                                 | No       | 233 (77.15%)  |
| Left ventricle diameter         | ≥35 mm   | 24 (7.95%)    |
|                                 | <35 mm   | 278 (92.05%)  |
| CMV serology                    | Negative | 35 (11.6%)    |
|                                 | Positive | 267 (88.4%)   |

rienced AE (288 ± 170/mm<sup>3</sup> versus 531 ± 290/mm<sup>3</sup>; *P* < 0.0001).

Quartiles were defined according to CD4 cell count (Table 1). There was a linear increase in the risk of AE from the lower quartile to the higher quartile of CD4 cell (20.8% versus 8.1% in Q2 [*P* < 0.0001] and versus 4% in Q3 [*P* < 0.0001], 1.3% in Q4 [*P* < 0.0001]).

In univariate analysis, age (*P* < 0.0001), male gender (*P* = 0.02), a past history of cardiovascular disease (*P* < 0.0001), smoking status (*P* = 0.04), diabetes mellitus (*P* = 0.11), low creatinine clearance (*P* = 0.01), urinary protein excretion (*P* = 0.03), high phosphorus concentration (*P* = 0.09), low calcium concentration (*P* = 0.02), high fibrinogen concentration (*P* = 0.07), LDL cholesterol (*P* = 0.07), low HDL cholesterol (*P* = 0.01), tHcy (*P* = 0.0002), systolic BP (*P* = 0.05), pulse BP (*P* = 0.06), glycemia (*P* = 0.07), low CD4 level (*P* < 0.0001), high CD8 level (*P* = 0.02), low CD4/CD8 ratio (*P* = 0.01), low CD19 level (*P* = 0.003), CRP (*P* = 0.0001), and low albumin concentration (*P* = 0.008) were associated with AE.

After backward stepwise selection, the variables which remained in the Cox proportional hazards model, *i.e.*, which were linked to AE with *P* values < 0.05, were as follows: CD4 cell count, age, tobacco consumption, history of AE, serum homo-

cysteine. Gender and duration since transplantation were kept in the model.

Cox regression analysis revealed that age above the median (RR, 5.84; 95% CI, 1.64 to 20.75), a previous history of cardiovascular disease (RR, 4.24; 95% CI, 1.68 to 10.71), and current smoking (RR, 2.99; 95% CI, 1.27 to 7.02) were risk factors for AE. Patients in the higher quartile of tHcy have a significantly greater risk of AE than those in the lowest quartile (RR, 5.77; 95% CI, 1.28 to 26.08).

Patients in the three upper quartile of CD4 cell count had a decreased risk of AE compared with those in the lowest quartile (Table 3). Importantly, the RR for AE progressively decreased from the lowest to the highest quartile with RR values of 0.34 (CI, 0.13 to 0.92), 0.10 (CI, 0.02 to 0.46) and 0.10 (CI, 0.01 to 0.80) for the 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, and 4<sup>th</sup> quartiles, respectively.

RR and their 95% CI of CVE for each variable in the Cox model are displayed in Table 3, along with *P* values.

## Discussion

There is a high incidence of cardiovascular complications in the organ transplant population. In our cohort of RTR, the cumulative risk for developing AE was 4.1% within 1 yr, which is comparable to a previous report of our group (3). Both traditional and nontraditional CV risk factors are prevalent in our population and contribute for this increased incidence of atherosclerotic events. Nevertheless, we postulated that immunosuppression by itself may contribute *per se* to accelerate atherogenesis in this RTR population.

Our major result is the demonstration of a negative independent relationship between posttransplant peripheral blood CD4 cell counts and the occurrence of AE. Importantly, this relationship persisted after adjustment for traditional and nontraditional cardiovascular risk factors. However, the association between CD4 cell counts and occurrence of AE demonstrated in our study does not prove causal relationship.

The probability of AE increased linearly with the decrease in CD4 cell levels, and a CD4 cell count in the highest quartile (>663/mm<sup>3</sup>) divided the risk of AE by 10 as compared with the lowest quartile. Our group has previously demonstrated that CD4 lymphocytopenia is a marker of over-immunosuppression in the renal transplant population (13,14). As a consequence, our results may suggest that immunosuppression by itself contributes to accelerated atherosclerosis in renal transplant recipients.

Our study provides new insight into the pathogenesis of accelerated transplant-related atherosclerosis. In a study by Fyfe *et al.* (5), atherosclerosis developed at an accelerated rate in class I MHC-deficient mice. Furthermore, Nilsson *et al.* (6) demonstrated a 58% decrease in degree of atherosclerosis in rabbits immunized against oxidized or native LDL. Other animal studies have also suggested that T lymphocytes may have a protective role against atherosclerosis progression (7). Rats in which T lymphocytes have been eliminated by a monoclonal antibody treatment develop larger proliferative arterial lesions after balloon-catheter injury. Larger lesions also develop in athymic *nu/nu* rats when compared with *nu/+* littermates with normal T cell levels. These results strongly suggest that T lymphocytes can modulate smooth muscle proliferation during vascular repair in experimental models. Lastly, Roselaar *et al.* (8) demonstrated that Cyclosporin A-induced suppression of cell-mediated immunity increased the development of macrophage-rich atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. Nevertheless, these results remained difficult to interpret because Cyclosporin also interacts with numerous traditional cardiovascular risk factors such as hypertension and hyperlipidemia (15,16). However, a direct role of Cyclosporin is unlikely in our study. Treatment with Cyclosporin was not associated with AE, and our previous reports did not support a link between CD4 cell counts and Cyclosporin treatment.

Table 3. Cox model: relative risks (RR) of cardiovascular event (CVE) and 95% CI

| Variable                    | RR <sup>a</sup>                          | 95% CI | <i>P</i>      |                    |
|-----------------------------|--|--------|---------------|--------------------|
| CD4 (/mm <sup>3</sup> )     | <299 (1st quartile)                      | 1      | —             |                    |
|                             | 299; 471 ( <i>versus</i> 1st quartile)   | 0.34   | 0.13 to 0.92  | 0.033              |
|                             | 471; 663 ( <i>versus</i> 1st quartile)   | 0.10   | 0.02 to 0.46  | 0.003              |
|                             | ≥663 ( <i>versus</i> 1st quartile)       | 0.10   | 0.01 to 0.80  | 0.030              |
| Age                         | <51 yr                                   | 1      | —             |                    |
|                             | ≥51 yr                                   | 5.84   | 1.64 to 20.75 | 0.006              |
| Tobacco consumption         | No                                       | 1      | —             |                    |
|                             | Yes                                      | 2.99   | 1.27 to 7.02  | 0.012              |
| History of CVE              | No                                       | 1      | —             |                    |
|                             | Yes                                      | 4.24   | 1.68 to 10.71 | 0.002              |
| Serum homocysteine (μmol/L) | <13.1 (1st quartile)                     | 1      | —             |                    |
|                             | 13.1; 16.9 ( <i>versus</i> 1st quartile) | 2.35   | 0.46 to 12.03 | 0.307 <sup>b</sup> |
|                             | 16.9; 21.0 ( <i>versus</i> 1st quartile) | 1.31   | 0.21 to 8.02  | 0.772 <sup>b</sup> |
|                             | ≥21.0 ( <i>versus</i> 1st quartile)      | 5.77   | 1.28 to 26.08 | 0.023              |

<sup>a</sup> Cox model is adjusted for duration since kidney transplant and gender.

<sup>b</sup> Nonsignificant at  $\alpha = 5\%$

Lesser data concerning a potential role for immunodeficiency in the pathogenesis of atherosclerosis progression are available in humans. Nevertheless, recent studies have focused on an increased incidence of AE in AIDS patients (9,17) with findings suggesting that lymphopenia could be associated with an increased risk of AE. An increased prevalence of traditional cardiovascular risk factor is observed in this population. However, this increase in risk factors is apparently not sufficient to explain the observed difference in AE and a matched population (10). A role for protease inhibitor-induced hyperlipidemia has been evoked (17) but not confirmed by more recent reports (18,19). Constans *et al.* (10) have reported that HIV-positive patients with atherosclerotic plaques had significantly lower CD4 cell count than those without plaques, suggesting a relationship between the intensity of immunodeficiency and the progression of atherosclerosis. Lastly, as previously reported in atomic bomb survivors, the intensity of CD4 lymphocytopenia in atomic bomb survivors has been found to be associated with an found increased incidence of myocardial (11). These findings observed both in AIDS patients and in atomic bomb survivors therefore strongly suggest an association between CD4 lymphocytopenia and atherosclerosis.

Hypothetically, a type 2 immune polarization could be occurring in RTR who undergo lymphocyte reconstitution post-polyclonal antithymocyte globulins-related lymphocyte depletion. In such cases, the lack of Th2 expansion in RTR with CD4 lymphocytopenia might contribute to the increased incidence of AE in this group of recipients. Indeed, T1 immune response, as induced in response to bacteria pathogens, has been reported to play a role in promoting atherosclerosis (20). On the other hand, a predominantly type 2 response mitigates the course of atherosclerosis. Indeed, IL-10<sup>-/-</sup> C57BL/6J mice exhibit increased fatty streak development (21) and overexpression of IL-10 inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice (22). Furthermore, BALB/c mice, a mouse strain skewed toward CD4<sup>+</sup> Th2 type immune responses, are atherosclerosis resistant (23). Studies to examine this hypothesis are presently underway.

The reasons for the persistence of low CD4 cell count in some renal transplant recipients and not in others remain unclear. In addition, polyclonal antilymphocyte globulins (12) and suppression of cell-mediated immunity by infectious agents other than HIV has long been recognized as a cause of CD4 lymphocytopenia. A variety of acute and chronic infections may be associated with CD4 cell depletion, which is usually transient and accompanied by CD8 lymphocytosis (24). As mentioned previously, bacterial and viral pathogens have been also identified as inciting agents in the pathogenesis of atherosclerosis. *In vitro*, cytomegalovirus and chlamydia pneumoniae promote a proinflammatory and a procoagulant phenotype in vascular cells (25). Moreover, viruses can augment cell accumulation through apoptosis alterations (26). Thus, one can also speculate that CD4 lymphocytopenia could be a surrogate marker for the presence of viral or bacterial infections. Alternatively, diminished cell-mediated immune response may favor chronic infections involved in the pathogen-

esis of atherosclerosis. However, one must stress that we found no relationship between CMV status and CVE.

To conclude, our study strongly suggests that CD4 lymphocytopenia is an independent cardiovascular risk factor in RTR. Factors such as polyclonal anti-lymphocyte globulins treatment, quality of immune reconstitution, bacterial or viral infections may be directly or indirectly contributive. Further studies should better characterize the associations between CD4 lymphocytopenia and AE in RTR.

## References

1. Kasiske BL, Gujarró C, Massy Z, Wiederkehr MR, Ma JZ: Cardiovascular disease after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 7: 158–165, 1996
2. Kasiske BL, Chakera HA, Roel J: Explained and unexplained ischemic heart disease risk after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 11:1735–1743, 2000
3. Ducloux D, Motte G, Challier B, Gibey R, Chalopin JM: Serum total homocysteine and cardiovascular disease in chronic, stable renal transplant recipients: A prospective study. *J Am Soc Nephrol* 11: 134–137, 2000
4. Meier-Kriesche H, Arndorfer JA, Kaplan B: Association of antibody induction with short- and long-term cause-specific mortality in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 13: 769, 2002
5. Fyfe AI, Qiao JH, Lusic AJ: Immune-deficient mice develop typical atherosclerotic fatty streaks when fed atherogenic diet. *J Clin Invest* 94: 2516–2521, 1994
6. Nilsson J, Calara F, Regnström J: Immunization with homologous oxidized low density lipoprotein reduces neointimal formation after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits. *J Am Coll Cardiol* 30: 1886–1891, 1997
7. Hansson GK, Holm J, Holm S, Fotev Z, Hedrich HJ, Fingerle J: T lymphocytes inhibit the vascular response to injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10530–10534, 1991
8. Roselaar SE, Schonfeld G, Daugherty A: Enhanced development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by suppression of cell-mediated immunity. *J Clin Invest* 96: 1389–1394, 1995
9. Krishnaswamy G, Chi DS, Kelley JL, Sarubbi F, Smith JK, Peiris A: The cardiovascular and metabolic complications of HIV infection. *Cardiol Rev* 8: 260–268, 2000
10. Constans J, Marchand JM, Conri C, Peuchant E, Seigneur M, Rispoli P, Lasseur C, Pellegrin JL, Leng B: Asymptomatic atherosclerosis in HIV-positive patients: A case-control ultrasound study. *Ann Med* 27: 683–685, 1995
11. Kusunoki Y, Kyoizumi S, Yamaoka M, Kasagi F, Kodama K, Seyama T: Decreased proportion of CD4 T cells in the blood of atomic survivors with myocardial infarction. *Radiat Res* 152: 539–543, 1999
12. Müller 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* 64: 1432–1435, 1997
13. Ducloux D, Carron PL, Rebibou JM, Aubin F, Fournier V, Bresson-Vautrin C, Blanc D, Humbert P, Chalopin JM: CD4 lymphocytopenia as a risk factor for skin cancers in renal transplant recipients. *Transplantation* 65: 1270–1272, 1998
14. Ducloux D, Carron PL, Racadot E, Rebibou JM, Bresson-Vautrin C, Saint-Hillier Y, Chalopin JM: T-cell immune defect and B-cell activation in renal transplant recipients with monoclonal gammopathies. *Transplant Int* 12: 250–253, 1999

15. Hillbrands LB, Demacker PNM, Hoitsma AJ, Stalenhoef AFH, Koene RAP: The effects of cyclosporine and prednisone on serum lipid and (apo)lipoprotein levels in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 5: 2073-2078, 1995
16. Sorof JM, Sullivan EK, Tejani A, Portman RJ: Antihypertensive medication and renal allograft failure: A North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study Report. *J Am Soc Nephrol* 10: 1324-1330, 1999
17. Tabib A, Leroux C, Mornex JF, Loire R: Accelerated coronary atherosclerosis and arteriosclerosis in young human-immunodeficiency-virus-positive. *Coron Artery Dis* 11: 41-46, 2000
18. Maggi P, Serio G, Epifani G, Fiorentino G, Saracino A, Fico C, Perilli F, Lillo A, Ferraro S, Gargiulo M, Chirianni A, Angarano G, Regina G, Pastore G: Premature lesions of the carotid vessels in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitors. *AIDS* 14: 123-128, 2000
19. Depairon M, Chessex S, Sudre P, Rodondi N, Doser N, Chave JP, Riesen W, Nicod P, Darioli R, Telenti A, Mooser V; Swiss HIV Cohort Study: Premature atherosclerosis in HIV-infected individuals-focus on protease inhibitor therapy. *AIDS* 15: 329-334, 2001
20. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA: Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 347:185-192, 2002
21. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, Soubrier F, Esposito B, Duez H, Fievet C, Staels B, Duverger N, Scherman D, Tedgui A: Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* 85: 17-24, 1999
22. Pinderski LJ, Fischbein MP, Subbanagounder G, Fishbein MC, Kubo N, Cheroutre H, Curtiss LK, Berliner JA, Boisvert WA: Overexpression of interleukin-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes. *Circ Res* 90: 1064-1071, 2001
23. Huber SA, Sakkinen P, David C, Newell MK, Tracy RP: T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia. *Circulation* 103: 2610-2616, 2001
24. Williams RC Jr, Koster FT, Kilpatrick KA: Alteration in lymphocyte cell surface markers during various human infections. *Am J Med* 75: 807-811, 1983
25. van Geelen AG, Slobbe-van Drunen ME, Muller AD, Brugge-man CA, Van Dam-Mieras MC: Membrane related effects in endothelial cells induced by human cytomegalovirus. *Arch Virol* 140: 1601-1612, 1995
26. Tanaka K, Zou JP, Takeda K, Ferrans VJ, Sandford GR, Johnson TM, Finkel T, Epstein SE: Effects of human cytomegalovirus immediate-early proteins on p53-mediated apoptosis in coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* 99: 1656-1659, 1999

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

## **Discussion et conclusion**

Notre travail montre l'existence d'une relation entre lymphopénie T CD4 et risque de complications athéromateuses. La lymphopénie T CD4 apparaît comme un facteur de risque indépendant des autres facteurs de risque traditionnels et non traditionnels.

Ce résultat va à l'inverse de toutes les données sur l'athérosclérose montrant que l'immunosuppression réduit la progression des lésions. Il est à noter que cette relation entre lymphopénie T CD4 et complications athéromateuses a été retrouvée dans d'autres populations ayant une lymphopénie d'étiologie différente ((Krishnaswamy G et al *Cardiol Rev* 2000, Constans J et al *Ann Med* 1995, Tabib A et al *Coron Artery Dis* 2000, Depairon M et al 2001).).

Si la relation entre lymphopénie T CD4 et athérosclérose est causale, elle n'est probablement pas directe. Des mécanismes indirects doivent être considérés. L'hypothèse la plus simple était que la lymphopénie T CD4 favorise la survenue et la persistance d'infections sub-cliniques entretenant un état inflammatoire chronique. Les infections par des agents potentiellement impliqués dans la pathogénie de l'athérosclérose (CMV, Chlamydiae, ...) pourraient également être stimulées. Nos travaux précédents confirment d'ailleurs l'excès d'infections chez les patients ayant une lymphopénie T CD4 (Ducloux D et al *Transplant Proc.* 1998). Il est également possible que la reconstitution lymphocytaire favorise en premier lieu l'émergence d'une population Th3 ou Tr1, anti-inflammatoire et anti-athérogène. Ainsi, les patients gardant une lymphopénie ne bénéficieraient pas de cet effet protecteur de la reconstitution.

Certains biais de notre travail doivent être considérés. La durée de transplantation à l'entrée dans l'étude était variable. Même si nous avons ajusté toutes les analyses pour la durée de transplantation, il eut sans doute été plus approprié d'inclure tous les patients à la même date de transplantation. Nous n'avons considéré qu'une analyse des lymphocytes T CD4 et il est possible

qu'il y ait eu des variations après l'inclusion. Notre étude teste la valeur prédictive d'une seule analyse, mais ne permet pas de spéculer sur l'impact de l'évolution du nombre de lymphocytes après la première année de transplantation. Il existe par ailleurs plusieurs sous-populations de lymphocytes T exprimant le marqueur CD4. Ces différents lymphocytes T CD4 ont des fonctions très variables parfois prédites par l'existence d'autres marqueurs de surface (cellules naïves et mémoire), mais pas nécessairement (Th1, Th2, Th17, ...). Nous n'avons pas étudié ces différentes sous-populations. Il est indispensable de mieux caractériser les proportions respectives des différents lymphocytes T exprimant CD4 au cours d'une reconstitution rapide et chez les patients ayant une reconstitution plus lente afin de mieux comprendre les rapports entre lymphopénie T CD4 et athérosclérose.

D'autres questions restaient en suspens. La reconstitution lymphocytaire après utilisation de globulines anti-lymphocytaires polyclonales est très variable d'un patient à l'autre (tableau 1 de l'article – données non publiées). Les raisons de cette variabilité inter-individuelle sont mal connues.

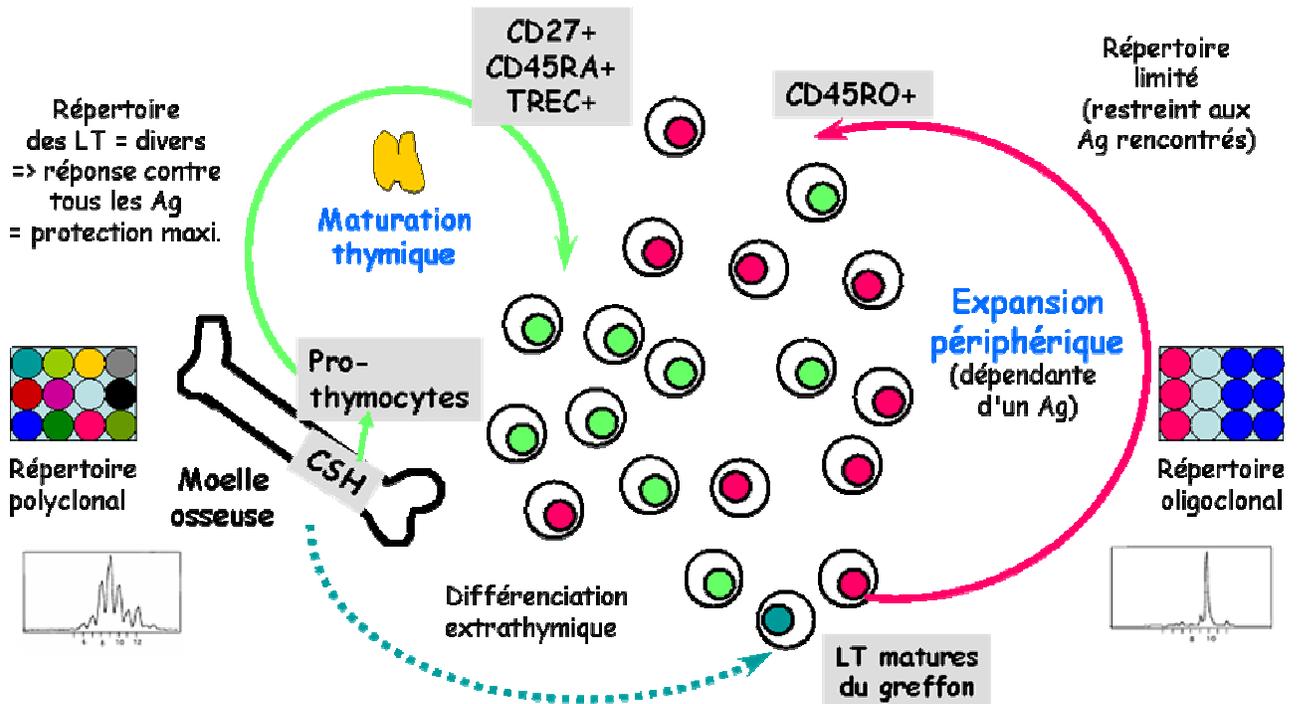
Les lymphocytes T peuvent être générés selon deux mécanismes (figure 8) : Une production accrue par le thymus (thymopoïèse) ou une expansion clonale en rapport avec une prolifération homéostatique. La voie la plus efficace de génération des lymphocytes T est la thymopoïèse. Lorsque la déplétion des lymphocytes T périphériques est très profonde, l'activité thymique peut contribuer à la reconstitution de ces populations en générant des lymphocytes T naïves *de novo*, CD4 auxiliaires, CD8 et des Treg centraux ou nTreg. Durant la thymopoïèse, les progéniteurs T d'origine médullaire traversent le thymus, acquièrent le phénotype T, prolifèrent et subissent une maturation dans le thymus. Le récepteur TCR est généré durant la thymopoïèse par réarrangement aboutissant à une grande diversité du répertoire T.

L'activité thymique peut être appréciée de différentes façons : la mesure des lymphocytes T naïfs sur la base du phénotype CD45RA+ CD45RO-, la quantification des TREC et l'analyse de la diversité du répertoire du TCR.

## Reconstitution du pool de lymphocytes T CD4

**Rappel :** différenciation des LT dépendante du thymus

Voies de différenciation pour faire face "au vide" de l'ablation des LT suite au conditionnement



Adapté d'après Mackall CL et al., Immunol Today, 1997, 18 : 245

Figure 8 : Les lymphocytes T peuvent être générés selon deux mécanismes. Une production accrue par le thymus (thymopoïèse) ou une expansion clonale périphérique en rapport avec une prolifération homéostatique. La voie la plus efficace de génération des lymphocytes T est la thymopoïèse. Lorsque la déplétion des lymphocytes T périphériques est très profonde, l'activité thymique peut contribuer à la reconstitution de ces populations en générant des lymphocytes T naïves *de novo*, CD4 auxiliaires, CD8 et des Treg centraux ou nTreg. Ce type de reconstitution aboutit à une perte de diversité du répertoire du TCR. Durant la thymopoïèse, les progéniteurs T

d'origine médullaire traversent le thymus, acquièrent le phénotype T, prolifèrent et subissent une maturation dans le thymus. Une réponse thymique adaptée rétablit un profil gaussien d'abord dans les lymphocytes T naïfs puis dans les lymphocytes T mémoires ().

- Analyse du phénotype de surface :

Le phénotype CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>-</sup> a été initialement utilisé pour quantifier les lymphocytes T naïfs (Mackall CL et al N Engl J Med 1995, Mackall CL et al Blood 1993). Néanmoins, il s'est avéré que cette définition des lymphocytes T naïfs était insuffisante car certains lymphocytes T ayant un tel phénotype « naïf » peuvent être issue d'une expansion périphérique (Williams K et al Semin Immunol 2007) et des lymphocytes activés peuvent retrouver un même phénotype « naïf » (Williams K et al Semin Immunol 2007).

Ce problème a été résolu par l'utilisation de marqueurs additionnels (CCR7<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>) et par la démonstration que la conversion de lymphocytes T activés ou mémoires n'aboutissait pas à générer des populations réellement naïves (Ge Q et al Proc Natl Acad Sci U S A 2002).

Le marqueur CD31 est également un marqueur des lymphocytes T naïfs et peut être utilisé pour identifier cette population (Ashman LK et al Tissue Antigens. 1991). Il a récemment été montré que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> triés contenaient la majorité des TREC attestant de la validité de ce marquage pour identifier les lymphocytes T naïfs (Junge S et al Eur J Immunol. 2007).

- Impact de la fonction thymique :

L'analyse de activité thymique peut également être caractérisée par la quantification des cercles d'excision générés par le réarrangement du TCR (TREC pour *TCR rearrangement excision circles*) (Douek DC et al Lancet 2000). Les TREC sont formés d'ADN épisomal, excisé de la chaîne  $\delta$  du TCR, organisé en cercles lors du réarrangement des gènes VDJ des chaînes du TCR.

Ces cercles sont maintenus stables pendant la division cellulaire et ne sont pas dupliqués aboutissant à une progressive dilution dans les cellules filles. Les TREC peuvent être mesurés par PCR dans les cellules T périphériques et leur quantification reflète l'activité thymique. Les TREC ont été utilisés pour confirmer l'involution thymique au cours du vieillissement (Gruver AL et al J Pathol. 2007). Ainsi chez les sujets âgés qui présentent une fonction thymique moins efficace, le nombre de TREC est réduit (Gruver AL et al J Pathol. 2007).

- Analyse de la diversité du répertoire du TCR :

La thymopoïèse peut également être mesurée par l'appréciation de la diversité du répertoire du TCR par l'analyse de la variation de la longueur de la région CDR3 de la chaîne  $\beta$  du TCR. La région CDR3 forme le site de contact avec le complexe CMH peptide et joue un rôle prépondérant dans la reconnaissance de l'antigène. La très grande diversité de la région CDR3 résulte de l'insertion aléatoire de nucléotides durant le processus de réarrangement VDJ du TCR. Ce phénomène aboutit à une répartition gaussienne des longueurs du CDR3. La reconstitution « périphérique » ou prolifération homéostatique après une déplétion sévère des lymphocytes T aboutit à un profil oligoclonal de la distribution des longueurs de CDR3. Une réponse thymique adaptée rétablit un profil gaussien d'abord dans les lymphocytes T naïfs puis dans les lymphocytes T mémoires (Hakim FT et al J Clin Invest 2005; 115: 930–9, Wu CJ et al Blood 2000).

Nous avons réalisé une nouvelle étude sur la même cohorte de patients afin de pouvoir mieux comprendre cette lymphopénie T CD4 et à mieux apprécier le risque pour les patients transplantés.

## Article 2

### PROLONGED ATG-INDUCED T CELL CD4 LYMPHOPENIA, THYMIC FUNCTION, AND DEATH AFTER RENAL TRANSPLANTATION

Ducloux D, Courivaud C, Bamoulid J, Vivet B, Chabroux A, Deschamps M, Ferrand C, Rebibou  
JM, Tiberghien P, Chalopin JM, Saas P

Manuscript en préparation pour J Am Soc Nephrol

Nous avons donc conduit une seconde étude ayant pour but de déterminer :

1- Les facteurs prédictifs de la reconstitution lymphocytaire T CD4 et en particulier le rôle de la thymopoïèse

2- La nature de la relation, causale ou indirecte, entre évènements athéromateux et lymphopénie T CD4.

Une relation directe entre lymphopénie T CD4 et progression de la maladie athéromateuse est peu probable. Les lymphocytes T CD4 sont en effet fortement impliqués dans la formation de la plaque et nos données ne sont pas soutenues par les modèles expérimentaux (voir introduction).

Deux types de relation indirecte peuvent être envisagés.

La lymphopénie T CD4 pourrait favoriser la survenue d'infections sub-cliniques générant une réponse inflammatoire systémique pro-athérogène et/ou d'infections à germes localisés au sein de la plaque (*chlamydia*, CMV). Dans ce cas, les agents infectieux expriment des PAMP à l'origine de l'activation de l'immunité innée et la libération de cytokines pro-inflammatoires. La capture de ces agents infectieux par les CPA de la plaque peut aboutir à une présentation aux lymphocytes T dans des contextes de danger. Ceci aboutit à l'activation de la réponse adaptative de type I préférentiellement. Nous avons analysé la réponse inflammatoire chez les patients lymphopéniques et non lymphopéniques par la mesure de la protéine C réactive (CRP).

La lymphopénie T CD4 pourrait également correspondre à un défaut d'expansion d'une population lymphocytaire T CD4 anti-inflammatoire et anti-athérogène de type Treg. Nous avons étudié la proportion de lymphocytes T CD4 exprimant les marqueurs CD25 et FoxP3 mais n'exprimant pas le CD127 chez les patients lymphopéniques et non lymphopéniques. L'analyse de l'expression du CD127 permet de faire la différence entre des lymphocytes T activés exprimant de manière transitoire FoxP3 en plus du CD25 et les Treg (Liu W et al J Exp Med. 2006, Seddiki N et al J Exp Med. 2006, Michel L et al J Clin Invest. 2008).

3- Enfin, l'impact de la lymphopénie T CD4 sur la survie des patients après transplantation rénale n'était pas déterminé par nos travaux précédents.

Afin de répondre à ces questions, nous avons conduit une seconde étude incluant les mêmes patients pour une période de suivi de 92 mois. La survie a été analysée dans cette cohorte en fonction de l'existence ou non d'une lymphopénie T CD4 et d'autres facteurs classiques de morbi-mortalité.

Au sein de cette cohorte, la nature de la reconstitution lymphocytaire et ses déterminants ont été étudiés chez 77 patients. La proportion de lymphocytes T CD4 exprimant Foxp3 mais pas le CD127 a également été déterminée chez 43 de ces 77 patients en fonction de la disponibilité du matériel biologique.

# **PROLONGED ATG-INDUCED T CELL CD4 LYMPHOPENIA, THYMIC FUNCTION, AND DEATH AFTER RENAL TRANSPLANTATION**

**Didier DUCLOUX<sup>a,b,d</sup> MD Cécile COURIVAUD<sup>a,b</sup> MD, Jamal BAMOULID<sup>a,b</sup> MD,  
Bérengère VIVET<sup>a,b</sup> MD, Aline CHABROUX<sup>a,b</sup> MD, Marina DESCHAMPS<sup>a,c</sup> PhD, Jean-  
Michel REBIBOU<sup>a,b</sup> MD PhD, Pierre TIBERGHIE<sup>a,c,d</sup> MD PhD, Jean-Marc  
CHALOPIN<sup>a,b,d</sup> MD, Philippe SAAS<sup>a,c</sup> PhD,**

<sup>a</sup>INSERM, UMR645, Besançon, F-25020 France; Université de Franche-Comté, Besançon, F-25020 France; IFR133, Besançon, F-25000 France

<sup>b</sup>CHU Saint Jacques, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, F-25030, Besançon, France

<sup>c</sup>EFS Bourgogne Franche-Comté, Plateforme de Biomonitoring, Besançon, F-25020 France.

<sup>d</sup>CHU Saint Jacques, CIC Biothérapie, F-25030 Besançon, France

-

C Courivaud and J Bamoulid contributed equally to this work.

**Correspondence to Dr Didier DUCLOUX**

**Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, Saint Jacques Hospital;  
Besançon, France**

**Tel: 33 3 81 21 87 82**

**Fax: 33 3 81 21 87 81**

**e-mail : dducloux@chu-besancon.fr**

## **Abstract**

**Background:** Prolonged CD4 T cell lymphopenia after polyclonal antithymocyte globulins (ATG) increases the rate of different post-transplant outcomes. We examined the association between CD4 T cell counts, thymic function, and death in renal transplant recipients (RTR).

**Methods:** Three hundred and two consecutive renal transplant recipients were enrolled in this prospective study. Peripheral blood lymphocyte subsets were quantified and analyzed with respect to other known cardiovascular risk factors.

**Results:** The patients were followed for a mean duration of  $92 \pm 7$  months. Eighty one patients (27%) had CD4 T cell count  $< 300 \text{ mm}^3$ . Thymic function as estimated by TREC (T cell receptor excision circles) was predictive of efficient CD4 T cell reconstitution. Thirty six patients (11.9%) died during follow-up. This corresponded to 17 deaths per 1000 patients/year. We observed a higher death rate in patients with persistent long-term (i.e.  $>$  one year) CD4 T cell lymphopenia (24.1 % vs 7.6 %;  $p < 0.001$ ). This excess of death in lymphopenic patients was mainly due to a higher rate of cardiovascular and cancer-related death: cancer (8.8% vs 2.7% in non-lymphopenic patients;  $p = 0.046$ ), and AE (10.1% vs 3.1% in non-lymphopenic patients;  $p = 0.031$ ). Cox regression analysis revealed that patients with CD4 T cell lymphopenia had an independent increased risk of death (RR, 4.63; 95% CI, 1.91 to 10.65;  $p = 0.001$ ). Remettre dans le sens du papier

**Conclusions:** Prolonged ATG-induced CD4 T cell lymphopenia is an independent risk factor for death in RTRs.

## **Introduction**

Broad T cell depletion by polyclonal antithymocyte globulins (ATG) has been used for many years as a part of immunosuppressive treatment in transplantation. These polyclonal Abs are a complex mixture of Abs with multiple specificities directed to both T cells and non T cells (1, 2). They produce profound T cell depletion via complement-dependent lymphocyte lysis and Fas/Fas ligand mediated apoptosis (3, 4). Although T cell regeneration after ATG generally occur in the months following ATG administration, Muller et al (5) reported that ATG may induce persistent changes in lymphocyte subsets characterized by low CD4 cell count and CD8 cell expansion. Our group has reported that impaired reconstitution of T cell-mediated immunity after ATG in renal transplantation represents a major cause of morbidity. Indeed, renal transplant recipients (RTRs) with persistent CD4 T cell lymphopenia exhibit a higher rate of late opportunistic infections (6). More recently, we reported an increased rate of atherosclerotic events (AE) in patients with impaired CD4 T cell reconstitution (9). Nevertheless, whether impaired immune reconstitution after ATG influences patient survival remains to be determined.

To date, reasons for persistent CD4 T cell lymphopenia in some RTRs remain unknown. T cell regeneration after ATG may occur by several mechanisms, including thymic-dependent and thymic-independent pathways. It has been mostly reported that T cell depletion leads to homeostatic proliferation of residual T cells and their conversion into alloantigen-reactive memory-like T cells (10, 11). Nevertheless, whether thymic function plays a role in immune reconstitution following ATG-induced T cell depletion is unknown in organ transplantation. However, previous data in hematopoietic transplantation after myeloablative conditioning regimen has identified that thymic function at time of transplantation (assessed by T cell receptor excision circles, TRECs) is a significant factor influencing CD4 T cell reconstitution as well as transplantation outcomes (12, 13, 14).

In this study, we studied whether prolonged ATG-induced CD4 T cell lymphopenia may affect patient survival. Furthermore, we investigated in a subset of patients whether pre-transplant TRECs number may predict prolonged ATG-induced CD4 T cell lymphopenia.

## **Patients and Methods**

### **Study design and populations**

We analyzed a prospective cohort of 302 consecutive, stable RTR (*i.e.* transplant duration > 12 months; no acute rejection, serum creatinine < 400  $\mu\text{mol/l}$ ) from a previously reported study (). All these patients had received ATG as induction therapy. Characteristics of the study population have been previously described in details (9) (tables 1 and 2).

Of note, transplant duration at inclusion was at least 12 months.

Rajouter la deuxième cohorte TREC / cinétique (100)

Troisième étude sur available matériel (43)

### **Lymphocyte subsets**

Absolute numbers of blood B and T cells, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were determined by single platform flow cytometry using TetraCXP® method, Flow-Count fluorospheres and FC500® cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) according to manufacturer's recommendations (15). Naive CD4 T cells were also assessed as CD45RA<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD45RO<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> cells using the following antibodies: FITC-conjugated CD45RA (clone HI100), phycoerythrin-CD62L (Dreg56) (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), ECD-CD45RO (UCHL1), PC7-CD3 (13B8.2) and allophycocyanin-CD3 (UCHT1) (Beckman Coulter, Villepinte, France).

### **TRECs**

Pre-transplant TRECs were assessed in 100 patients and kinetics of reconstitution was prospectively analyzed in this population. The signal-joint TREC were quantified in PBMC using real-time quantitative PCR on LightCycler (Roche Diagnostics, Meylan, France), as

previously described (16). A series of standard dilutions of a plasmid containing the signal-joint breakpoint was used to quantify TREC in each patient and control DNA sample. Cycle threshold was assessed using the second derivative method with the LightCycler software 3.5.3. Each DNA sample was run in duplicate. Quantification of a reference gene (GAPDH) was carried out in the same conditions. Results were expressed as the mean of duplicate TREC copies number normalized by GAPDH gene copies number.

### **Foxp3 analysis**

In the TREC sub-study, the frequency of CD4+CD25+Foxp3+ T cells was analyzed one year post-transplant in 43 patients.

### **Confounding factors**

Age, gender, weight, size, blood pressure, hemodialysis duration before transplantation, diabetes mellitus, smoking status, past history of cardiovascular events (CVE), immunosuppressive treatment (use of calcineurin inhibitors) and different biological parameters (including: serum creatinine, PTH, vitamin D, phosphorus, calcium, haemoglobin, fibrinogen, total cholesterol, LDL and HDL cholesterol, triglycerides, homocystéine [tHcy], glucose) were assessed upon inclusion.

Methods of assessment and definitions of these variables were previously described in details (9).

### **Death**

All death and causes of death were assessed.

Main causes of death (CVE, cancer, infection) and their relationships with CD4 T cell count were also analyzed.

Death was considered to be of cardiovascular origin if due to myocardial infarction, stroke, abdominal aneurysm rupture, critical lower limb ischemia, or sudden death in the presence of coronary heart disease. Death occurred in the immediate suites of coronary revascularization, carotid endarterectomy, lower extremity revascularization via bypass surgery or angioplasty, or abdominal aortic repair were also considered to be of cardiovascular origin.

- Atherosclerotic events were defined as follow:

*Coronary heart disease:* Myocardial infarction documented by serial 12-lead electrocardiogram evidence or Q-wave infarction and appropriate myocardial enzyme elevations; coronary revascularization including coronary artery bypass surgery or percutaneous transluminal coronary angioplasty; typical history of angina with abnormal coronarography.

*Stroke/cerebrovascular disease:* Both nonhemorrhagic and hemorrhagic strokes confirmed by neurologic examination findings consistent with new onset focal neurologic deficits, with or without computed tomography or magnetic resonance imaging evidence of cerebral infarction; symptomatic extracranial artery stenosis resulting in carotid endarterectomy.

*Abdominal aortic or lower extremity arterial disease:* Abdominal aortic repair; lower extremity revascularization via bypass surgery or angioplasty; lower extremity amputation; new onset of intermittent claudication confirmed by doppler or arteriography findings.

Two physicians independent of the study were responsible for CVE ascertainment. This analysis was performed without knowledge of baseline characteristics.

All the patients with cancer were first referred to our unit. Autre formulation

### **Statistical analysis**

Arithmetic mean was calculated and expressed as  $\pm$  SD.

Using log rank tests on Kaplan Meier nonparametric estimates of the survival distribution, we selected variables with a *p* value lower than, or equal to, 0.20. The selected variables were

included into a Cox proportional hazards model, and a backward stepwise selection process was performed, this time at a classical  $\alpha=0.05$ . The time elapsed since kidney transplantation was bound to vary between patients; therefore this duration was forced into the Cox model as a covariate. Gender and age being potential confounding variables, they were also entered into the Cox model, no matter the significance of their relationships with death. Age was split into tertiles (<44, 44-57, >57). Creatinine clearance was split in two classes (<49 ml/min,  $\geq$ 49 ml/min), CRP (<3 mg/l,  $\geq$ 3 mg/l [median value]), and urinary protein excretion (<0.10 g/d,  $\geq$ 0.10 g/d). CD4 T cell lymphopenia was considered when CD4 T cell count was less than 300/mm<sup>3</sup> according to our previous work (9). Tobacco consumption was accounted for as currently smoking versus non-smoking definition variables. Results are expressed as hazard ratio (HR) and 95 % confidence interval, 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, either greater than 1 (i.e. risk of death is increased) or less than 1 (i.e. risk of death is decreased). Assumptions of Cox models (log-linearity, proportionality of risk in time) were met in this analysis.

# Results

## Main cohort

### Study population

The patients were followed for a mean duration of  $92 \pm 7$  months. Patients' characteristics have been described previously (9).

Categorical variables are depicted in Table 1, continuous variables in Table 2.

### Lymphocyte subsets

Mean CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell levels were  $511 \pm 290/\text{mm}^3$  and  $553 \pm 596/\text{mm}^3$ , respectively.

Mean CD4/CD8 ratio was  $1 \pm 0.92$ . Mean CD19<sup>+</sup> B cell level was  $66 \pm 62/\text{mm}^3$ .

There was a positive correlation between CD4 T cell levels and transplant duration ( $r=0.32$ ;  $p=0.02$ ). By contrast, CD4 T cell count was inversely related to age ( $r=0.35$ ;  $p=0.01$ ).

Eighty one patients (27%) had CD4 T cell count  $< 300 \text{ mm}^3$ . Patients with CD4 T cell lymphopenia differed from those with normal CD4 T cell count for age ( $53.9 \pm 12.6$  vs  $48.4 \pm 13.7$  years, respectively;  $p=0.001$ ), transplant duration ( $54 \pm 44$  vs  $79 \pm 58$  months, respectively;  $p=0.001$ ), fibrinogen levels ( $4.02 \pm 0.90$  vs  $3.79 \pm 0.90$  g/l, respectively;  $p=0.057$ ), LDL cholesterol levels ( $1.33 \pm 0.37$  vs  $1.24 \pm 0.37$  g/l, respectively;  $p=0.051$ ), tHcy levels ( $19.6 \pm 8.9$  vs  $17.6 \pm 6.1$   $\mu\text{mol/L}$ , respectively;  $p=0.027$ ), CRP levels ( $5.7 \pm 4.6$  vs  $4.3 \pm 3.3$  mg/l, respectively;  $p=0.011$ ), CD19<sup>+</sup> B cell counts ( $48 \pm 46$  vs  $73 \pm 65/\text{mm}^3$ ;  $p=0.002$ ), and pulse pressure ( $59.4 \pm 15.8$  vs  $54.7 \pm 15.2$  mm Hg, respectively;  $p=0.018$ ). Analyse multivari e

### Death

Thirty six patients (11.9%) died during the follow-up. This corresponds to 17 deaths per 1000 patients/year. Of them, thirteen (36%) died from cancer, fourteen (39%) from atherosclerotic

disease, seven (19%) from infectious causes, one from pulmonary embolism (3%), and one (3%) from trauma.

We observed a higher mortality in patients with persistent CD4 T cell lymphopenia (24.1 % vs 7.6 %;  $p < 0.001$ ). Survival according to CD4 T cell levels is depicted in figure 1.

Forty four AE occurred during the follow-up. AE were more frequent in patients with CD4 lymphopenia (29.1% vs 9.4%;  $p < 0.001$ ). There was a significant higher death rate due to AE in patients with CD4 T cell lymphopenia (10.1% vs 3.1%, respectively;  $p = 0.031$ ).

Sixty cancers occurred during the study follow-up. Cancers were more frequent in patients with CD4 lymphopenia (30.4% vs 16.1%;  $p = 0.010$ ). There was also a significant higher death rate due to cancer in patients with CD4 T cell lymphopenia (8.8% vs 2.7%, respectively;  $p = 0.046$ ).

Other causes of death were not differently distributed between patients with and without CD4 T cell lymphopenia.

In univariate analysis, age ( $p = 0.003$ ), smoking status ( $p = 0.04$ ), diabetes mellitus ( $p = 0.017$ ), low creatinine clearance ( $p = 0.006$ ), high fibrinogen level (0.017), high CRP level ( $p = 0.001$ ), and low CD4 T cell levels ( $p < 0.001$ ) were predictive of death.

After backward stepwise selection, the variables which remained in the Cox proportional hazards model i.e. which were linked to AE with  $p$  values  $< 0.05$  were: CD4 T cell counts, age, CRP levels. Gender and duration since transplantation were kept in the model.

Cox regression analysis revealed that age in the upper tertile (RR, 3.15; 95% CI, 1.11 to 15.27;  $p = 0.047$ ) and CRP levels above the median (RR, 5.22; 95% CI, 1.63 to 16.70;  $p = 0.005$ ) were risk factors for death. Patients with CD4 T cell lymphopenia also had an independent increased risk of death (RR, 4.63; 95% CI, 1.91 to 10.65;  $p = 0.001$ ). Relative risks (RR) and their 95 % confidence intervals (95 % CI) of CVE for each variable in the Cox model are displayed in Table 3, along with  $p$  values.

Thirteen patients (16%) with CD4 T cell lymphopenia lost their graft during the study period.

Seven of them died before the end of follow-up (cancer, 2; CVE, 3). During the same period, six of the 35 patients without CD4 T cell lymphopenia who returned on dialysis died (17% vs 54%;  $p=0.029$ ). Of note, death-censored graft loss was similar in patients with and without CD4 T cell lymphopenia.

## **Pre-transplant Thymic function and lymphocyte reconstitution**

### Kinetics of reconstitution

Lymphocyte reconstitution was prospectively studied in 100 patients.

The proportion of patients with CD4 T cell lymphopenia decreased with time post-transplant (59%, 44%, 33%, and 27% at 1, 2, 3, and 4 year post-transplant respectively).

At one year post-transplant, the frequencies of Treg (CD4+CD25+Foxp3+/CD4+ T cells) were significantly higher in patients with CD4 T cell lymphopenia (1.56 +/- 0.74 vs 0.97 +/- 0.57%;  $p=0.027$ ).

### TREC

Pre-transplant thymic function was assessed by TREC quantification. TRECs were not normally distributed. Median was 996 [5-44300]. TRECs were significantly higher in younger patients (median 1450 [65-44300] vs 431 [5-18800];  $p=0.001$ ) and we observed a strong inverse correlation between TRECs and age ( $r=-0.44$ ;  $p<0.001$ ).

There was a strong positive correlation between pre-transplant TRECs and CD4 T cell counts at one, two, three, and five years post-transplant. TRECs also predicted post-transplant naive CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> T cell recovery.

Pre-transplant CD4 T cell count does not predict post-transplant CD4 T cell counts.

In multivariate analysis, only pre-transplant TRECs were predictive of CD4 T cell counts at one year. More precisely, RTRs with TRECs > 10000 had a significantly reduced risk of CD4 T cell lymphopenia than those with TRECs < 10000 (RR, 0.16 95% CI, 0.03 to 0.89;  $p=0.036$ ). Of note,

80% of RTRs with pre-transplant TRECS > 10000 had normal CD4 T cell reconstitution one-year post-transplant whereas only 34% of those with pre-transplant  $\leq$  10000 had normal CD4 T cell reconstitution. The positive and negative predictive values for this threshold were 80 and 63%, and 100% and 52% at one and two years post-transplant, respectively.

Because pre-transplant thymic function influences CD4 T cell reconstitution, we also analyzed death according to pre-transplant TRECs. Patients were divided in three groups according to TREC values (T1 [5-392], T2 [400-1990], T3 [2080-44300]). We observed a trend towards a linear increase in death rate with decreasing levels of TRECs. Whereas annual death rate was 0.44% in T3, it was 0.91% and 2.4% in T2 and T1, respectively (p for trends=0.09).

## Discussion

Our study demonstrated that impaired CD4 T cell immune reconstitution after ATG is a risk factor for death in RTRs even after adjustment for confounding factors. The influence of CD4 T cell lymphopenia on survival persisted even after return on dialysis and immunosuppressive withdrawal. We previously reported that RTRs with persistent CD4 T cell lymphopenia have an increased risk of opportunistic infections (6), cancer (7, 8), and atherosclerotic disease (9). Our present result adds to the clinical impact of immune reconstitution following ATG in RTRs and underlines the need for both pre-transplant recognition of patients at risk of impaired immune reconstitution and post-transplant monitoring of CD4 T cell after ATG to guide preventive measures. We also showed that pre-transplant thymic function as assessed by TRECs impacts on CD4<sup>+</sup> T cell reconstitution and death.

An excess of cardiovascular death is the main reason for the increased death rate observed in patients with impaired immune reconstitution. We also confirmed in this long-term study that patients with CD4 T cell lymphopenia have an increased risk of AE. We previously suggested that an anti-inflammatory immune response (type 2, T regulatory 1 (TR1), or TH3) could be occurring in RTRs who undergo efficient lymphocyte reconstitution after ATG-related lymphocyte depletion. Thus, the lack of expansion of such anti-inflammatory CD4 lymphocyte populations in RTRs with CD4 T cell lymphocytopenia might contribute to the increased incidence of AE in this group of recipients. Recent studies outlined the role of natural T regulatory lymphocytes (Treg) in atherosclerosis (17, 18, 19). All these studies suggest that atherosclerosis is a type 1 related-disease and that a shift towards a T regulatory response reduce the progression of the disease. Our hypothesis was reinforced by recent data suggesting that ATG may expand Treg (at least *in vitro*), mainly by inducing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells. ATG

may induce peripheral conversion of T cells in Treg but also Treg generation in the thymus (20, 21). Our present results do not confirm our initial hypothesis. Indeed, the frequency of CD4+CD25+Foxp3+ T cells was higher in patients with CD4 lymphopenia. In fact, some recent studies also showed that lymphopenia is a strong modulator of Treg (23, 24). CD4+CD25+Foxp3+ can occur through thymic-dependent and thymic-independent pathways. A thymic origin is unlikely in our population. Indeed, patients with prolonged CD4 T cell lymphopenia have pre-transplant depressed thymic function and none of them had robust post-transplant CD4+CD45RA+ expansion. Treg expansion probably occurs through peripheral expansion. This Treg expansion may serve to maintain self-tolerance during lymphopenia. A number of inflammatory conditions are associated with a higher percentage of Treg (25). Patients with CD4 T cell lymphopenia have both higher frequency of CD4+CD25+Foxp3+ T cells and higher CRP levels than patients with normal reconstitution. This could suggest that the suppressive response is enhanced but insufficient to control inflammation. Persistent sub-clinical infections in patients with CD4 T cell lymphopenia may generate chronic inflammation and accelerated atherosclerosis.

We found that both cancer rate and cancer-related death rate are increased in patients with CD4 T cell lymphopenia. This result may be explained by both the inability to eliminate or suppress viral infections with a subsequent increase rate of virus-induced tumours and a defect of elimination of tumour cells. These two mechanisms could be directly attributed to CD4 T cell lymphopenia. However, recent studies demonstrate that tumor cells can recruit Treg cells to inhibit antitumor immunity in the tumor microenvironment (26). It can be speculated that the increased frequency of Treg in patients with CD4 T cell lymphopenia could contribute to cancer occurrence. This could have important therapeutic implications for immunotherapy of cancer in RTRs.

As progenitor T cells undergo T cell receptor (TCR) gene rearrangement in the thymus, chromosomal sequences are excised to produce episomal DNA byproducts termed TCR rearrangement excisional circles (TRECs). TRECs in circulating T cells are therefore a useful tool to identify these cells as recent thymic emigrants. This permits to appreciate thymic function (27). In addition to analysis in HIV patients, TREC determination was performed in patients after allogeneic hematopoietic cell transplantation. In this setting, pre-transplant TREC levels was found as a factor predicting T cell reconstitution both in adults and in pediatric patients (12, 13, 14). Here, we showed that pre-transplant TREC number predicts CD4 T cell reconstitution after ATG. Interestingly, a low number of TRECs in the pre-transplant period characterizes a very high risk population for the later development of ATG-induced CD4 T cell lymphopenia. Therefore, reconstitution after ATG is at least in part dependent of thymic function. Nevertheless, for a continuous variable used as a predictive factor, defining thresholds is mandatory for clinical practice. Thresholds should have both good positive and negative predictive values to help physicians in patients' management. We found a TREC threshold  $> 10000$  to be highly predictive of efficient reconstitution (PPV=80% at one year and 100% at two years). The possibility to select patients with low or high risk of immune reconstitution impairment through pre-transplant TRECs could offer the opportunity to use ATG with more safety. Indeed, we also showed in a small subset of patients a trend towards an association between low pre-transplant TREC count and death after transplantation. Finally, our study suggests that pre-transplant TREC determination may not only minimize the risk of prolonged CD4 T cell lymphopenia but also contribute to reduce mortality after transplantation.

Our study has some limitations pour l'analyse de la survie. We included prevalent patients and consequently a survival bias is possible. Future studies should target incident patients to confirm our results. Furthermore, we considered only one determination of CD4 T cell levels and CD4 T

cell kinetics could give better information. CD4 T cell levels were not measured at the same post-transplant time. Even when we adjusted all our analysis on transplant duration, further studies should consider CD4 T cell levels at a same post-transplant time.

To conclude, our study strongly suggests that prolonged CD4 T cell lymphocytopenia is an independent risk factor for death in RTRs having received ATG. As pre-transplant thymic function may predict immune reconstitution after ATG, TREC number should be determined to estimate the benefit/risk ratio of such a treatment.

## **Acknowledgments**

This study was supported by grants from the Fondation de France (Appel d'offre 2007, to PS), the DHOS/INSERM/INCa (Appel d'offre Recherche Translationnelle 2008, to DD and PS).

## Tables

**Table 1: Description of categorical variables**

| Variable                | Category     | Frequency (%) |
|-------------------------|--------------|---------------|
| Gender                  | Male         | 191 (63.25 %) |
|                         | Female       | 111 (36.75 %) |
| History of AE           | Yes          | 25 (8.28 %)   |
|                         | No           | 277 (91.72 %) |
| Tobacco consumption     | Yes          | 72 (23.84 %)  |
|                         | No           | 230 (76.16 %) |
| Diabetes                | Yes          | 69 (22.85 %)  |
|                         | No           | 233 (77.15 %) |
| Left ventricle diameter | $\geq 35$ mm | 24 (7.95 %)   |
|                         | $< 35$ mm    | 278 (92.05 %) |
| CMV serology            | negative     | 35 (11.6%)    |
|                         | positive     | 267 (88.4%)   |

Abbreviations used: AE, atherosclerotic events; CMV, cytomegalovirus

**Table 2: Description of continuous variables**

| Variable  | Mean    | Standard Deviation | Median        |
|---|---------|--------------------|---------------|
| Age (years)   | 49.82   | 13.59              | 51.00         |
| Transplant duration (months) at<br>time of analysis | 72.48   | 55.75              | 68.50 (range) |
| SCt Clearance (ml/min)                              | 49.68   | 18.02              | 49.03         |
| U.P.E. (g/day)                                      | 0.46    | 0.91               | 0.10          |
| PTH (pg/ml)   | 97.00   | 133.87             | 61.50         |
| Vitamin D (ng/ml)                                   | 17.07   | 14.49              | 13.00         |
| Phosphorus (mmol/l)                                 | 1.17    | 0.21               | 1.16          |
| Calcium (mmol/l)                                    | 2.44    | 0.14               | 2.44          |
| Hemoglobin (g/100ml)                                | 12.94   | 1.76               | 13.00         |
| Fibrinogen (g/l)                                    | 3.85    | 0.90               | 3.80          |
| LDL cholesterol (g/l)                               | 1.26    | 0.36               | 1.23          |
| HDL cholesterol (g/l)                               | 0.57    | 0.21               | 0.54          |
| Total serum Cholesterol (g/l)                       | 2.13    | 0.47               | 2.11          |
| Triglycerides (g/l)                                 | 1.54    | 1.11               | 1.28          |
| Serum homocysteine ( $\mu\text{mol/l}$ )            | 18.15   | 6.96               | 16.90         |
| BMI ( $\text{kg/m}^2$ )                             | 24.42   | 4.35               | 23.81         |
| SBP (mm Hg)   | 135.85  | 19.07              | 140.00        |
| DBP (mm Hg)   | 80.56   | 10.09              | 80.00         |
| PP (mm Hg)  | 55.94   | 15.47              | 55.00         |
| Glycemia (mmol/l)                                   | 5.49    | 1.52               | 5.10          |
| CD3 <sup>+</sup> T cells (/mm <sup>3</sup> )        | 1059.64 | 645.36             | 915.00        |
| CD4 <sup>+</sup> T cells (/mm <sup>3</sup> )        | 511.34  | 290.40             | 471.00        |

|   |        |        |        |
|---|--------|--------|--------|
| CD8 <sup>+</sup> T cells (/mm <sup>3</sup> )  | 552.61 | 595.91 | 439.50 |
| CD4/CD8 ratio                                 | 1.30   | 0.93   | 1.13   |
| CD19 <sup>+</sup> B cells (/mm <sup>3</sup> ) | 66.43  | 61.77  | 49.00  |
| CRP (mg/l)                                    | 4.51   | 4.12   | 3.00   |
| Serum albumin (g/l)                           | 43.64  | 4.31   | 44.00  |

---

Abbreviations used: BMI, body mass index; CRP, C reactive protein; DBP, diastolic blood pressure, ; PP, pulse pressure; SBP, systolic blood pressure, ; U.P.E, urinary protein excretion, .

Table 3: Cox model: relative risks (RR) of death and 95% Confidence Intervals

| Variable                                     | Hazard ratio <sup>1</sup> | 95 % CI | p value             |
|--|---------------------------|---------|---------------------|
| CD4 <sup>+</sup> T cells (/mm <sup>3</sup> ) | ≥ 300                     | 1       | -                   |
|  | < 300                     | 4.63    | [1.91; 10.65] 0.001 |
| Age  | < 43 years                | 1       | -                   |
|  | 43 to 57 years            | 1.42    | [0.79; 3.51] 0.311  |
|  | > 57 years                | 3.15    | [1.11; 15.27] 0.042 |
| CRP  | < 3 mg/l                  | 1       | -                   |
|  | ≥ 3 mg/l                  | 5.22    | [1.63; 16.7] 0.005  |

<sup>1</sup> Cox model is adjusted for duration since kidney transplant and gender.

## References

1. Bonnefoy-Berard N, Vincent C, Revillard JP. Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation* 51: 669-673, 1991
2. Rebellato LM, Gross U, Verbanac KM, Thomas M. A comprehensive definition of the major antibody specificities in polyclonal rabbit antilymphocyte globulin. *Transplantation* 57: 685-694, 1994
3. Preville X, Flacher M, LeMauff B, Beauchard S, Davelu P, Tiollier J, Revillard JP. Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a non human primate model. *Transplantation* 71: 460-468, 2001
4. Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N. Induction of Fas(Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood* 91: 2360-2368, 1998
5. 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* 64: 1432-1435, 1997
6. Ducloux D, Carron PL, Racadot E, Rebibou JM, Bresson-Vautrin C, Saint-Hillier Y, Chalopin JM. CD4 lymphocytopenia in long-term renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 30:2859-60, 1998  
and an increased incidence of cancers (7, 8).
7. Ducloux D, Carron PL, Rebibou JM, Aubin F, Fournier V, Bresson-Vautrin C, Blanc D, Humbert P, Chalopin JM. CD4 lymphocytopenia as a risk factor for skin cancers in renal transplant recipients. *Transplantation* 65: 1270-1272, 1998

8. Ducloux D, Carron PL, Motte G, Ab A, Rebibou JM, Bresson-Vautrin C, Tiberghien P, Saint-Hillier Y, Chalopin JM. Lymphocyte subsets and assessment of cancer risk in renal transplant recipients. *Transpl Int* 15:393-6, 2002

More recently, we reported an increased rate of atherosclerotic events (AE) in patients with impaired CD4 T cell reconstitution (9).

9. Ducloux D, Challier B, Saas P, Tiberghien P, Chalopin JM. CD4 cell lymphopenia and atherosclerosis in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol.* 14:767-72, 2003

10. Pearl JP, Parris J, Hale DA, Hoffmann SC, Bernstein WB, McCoy KL, Swanson SJ, Mannon RB, Roederer M, Kirk AD. Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion. *Am J Transplant.* 5: 465-74, 2005

11. Neujahr DC, Chen C, Huang X, Markmann JF, Cobbold S, Waldmann H, Sayegh MH, Hancock WW, Turka LA. Accelerated memory cell homeostasis during T cell depletion and approaches to overcome it. *J Immunol* 176: 4632-4639, 2006

12. Hochberg EP, Chillemi AC, Wu CJ, Neuberger D, Canning C, Hartman K, Alyea EP, Soiffer RJ, Kalams SA, Ritz J. Quantitation of T-cell neogenesis in vivo after allogeneic bone marrow transplantation in adults. *Blood* 98: 1116-21, 2001

13. Clave E, Rocha V, Talvensaaari K, Busson M, Douay C, Appert ML, Rabian C, Carmagnat M, Garnier F, Filion A, Socié G, Gluckman E, Charron D, Toubert A. Prognostic value of pretransplantation host thymic function in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 105: 2608-13, 2005

14. Chen X, Barfield R, Benaim E, Leung W, Knowles J, Lawrence D, Otto M, Shurtleff SA, Neale GA, Behm FG, Turner V, Handgretinger R. Prediction of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients. *Blood* 105: 886-93, 2005

15. Reimann KA, O'Gorman MR, Spritzler J, Wilkening CL, Sabath DE, Helm K, Campbell DE. Multisite comparison of CD4 and CD8 T-lymphocyte counting by single- versus multiple-platform methodologies: evaluation of Beckman Coulter flow-count fluorospheres and the tetraONE system. The NIAID DAIDS New Technologies Evaluation Group. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 344-51, 2000
16. Larosa F, Marmier C, Robinet E, Ferrand C, Saas P, Deconinck E, Bulabois CE, Rohrlich PS, Ledu K, Helias P, Tiberghien P, Cahn JY. Peripheral T-cell expansion and low infection rate after reduced-intensity conditioning and allogeneic blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 35: 859-68, 2005
17. Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J, Merval R, Esposito B, Cohen JL, Fisson S, Flavell RA, Hansson GK, Klatzmann D, Tedgui A, Mallat Z. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med*. 12: 178-80, 2006
18. Heller EA, Liu E, Tager AM, Yuan Q, Lin AY, Ahluwalia N, Jones K, Koehn SL, Lok VM, Aikawa E, Moore KJ, Luster AD, Gerszten RE. Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells. *Circulation* 113: 2301-12, 2006
19. Gotsman I, Grabie N, Gupta R, Dacosta R, Macconmara M, Lederer J, Sukhova G, Witztum JL, Sharpe AH, Lichtman AH. Impaired Regulatory T-Cell Response and Enhanced Atherosclerosis in the Absence of Inducible Costimulatory Molecule. *Circulation* 114: 2047-55, 2006
20. Lopez M, Clarkson MR, Albin M, Sayegh MH, Najafian N. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol*. 17: 2844-53, 2006
21. Ruzek MC, Waire JS, Hopkins D, Lacorcia G, Sullivan J, Roberts BL, Richards SM, Nahill SR, Williams JM, Scaria A, Dzuris J, Shankara S, Garman RD. Characterization of in vitro antimurine thymocyte globulin-induced regulatory T cells that inhibit graft-versus-host disease

in vivo. *Blood* 111: 1726-34, 2008

22. Minamimura K, Gao W, Maki T. CD4+ regulatory T cells are spared from deletion by antilymphocyte serum, a polyclonal anti-T cell antibody. *J Immunol.* 176: 4125-32, 2006

23. Zhang H, Chua KS, Guimond M, Kapoor V, Brown MV, Fleisher TA, Long LM, Bernstein D, Hill BJ, Douek DC, Berzofsky JA, Carter CS, Read EJ, Helman LJ, Mackall CL.

Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells.

*Nat Med.* 2005; 11: 1238-43

24. Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, Cravedi P, Cugini D, Monteferrante G, Aiello S, Cassis L, Gotti E, Gaspari F, Cattaneo D, Perico N, Remuzzi G. Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 1007-18

25. Han GM, O'Neil-Andersen NJ, Zurier RB, Lawrence DA. CD4+CD25high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol.* 2008; 253: 92-101

26. Wang HY, Wang R-F. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 217-223

27. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396: 690-695, 1998

## **Discussion et conclusion**

Le principal résultat de cette étude est que la persistance d'une lymphopénie T CD4 après déplétion lymphocytaire par des globulines anti-lymphocytaires polyclonales est un facteur majeur de mortalité après transplantation. L'excès de mortalité est principalement lié à une augmentation des décès de causes cardio-vasculaires et néoplasiques. Ce résultat confirme l'impact de la lymphopénie T CD4 déjà démontré sur les risques d'infections, de cancers et d'évènements athéromateux après transplantation et justifie d'essayer de mieux reconnaître les sujets à risque de lymphopénie T CD4 persistante afin d'envisager des traitements d'induction alternatifs aux globulines anti-lymphocytaires polyclonales chez ces patients.

Notre étude montre que la fonction thymique permet de prédire la qualité de la reconstitution après globulines anti-lymphocytaires polyclonales. Nous avons analysé l'activité thymique en pré-transplantation par la quantification des TREC et en post-transplantation par la génération de lymphocytes T naïfs CD45RO- CD45RA+ CD62L+. Le taux de TREC avant greffe est corrélé au pourcentage de lymphocytes T naïfs un an après la transplantation et prédit la survenue d'une lymphopénie T CD4. Ces résultats suggèrent que la fonction thymique est importante pour la reconstitution lymphocytaire après déplétion par globulines anti-lymphocytaires polyclonales.

Une expansion périphérique homéostatique pourrait intervenir probablement chez certains patients qui recouvrent un nombre de lymphocytes T CD4+ normal ou proche de la normale, alors même que le taux de TREC avant greffe est faible et le pourcentage de lymphocytes naïfs après greffe réduit. Néanmoins, la lymphopénie s'accompagne d'une diminution de la diversité du TCR et seule la reconstitution issue de la thymopoïèse permet de restaurer cette diversité (Hakim FT et al J Clin Invest 2005, Dumont-Girard F et al Blood 1998). Sans un pool de lymphocytes T naïfs, dérivées du thymus, la réponse vaccinale et l'élimination des agents

infectieux sont diminuées (Roux E et al Blood 2000, Dumont-Girard F et al Blood 1998, Lewin SR et al Blood 2002).

De plus, la récupération de la diversité du répertoire des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peut prévenir la survenue d'une auto-immunité (Muraro PA et al Trends Immunol 2006). De fait, seule la thymopoïèse peut assurer la récupération d'une immunité efficace. En conséquence, la connaissance de la fonction thymique avant l'utilisation de globulines anti-lymphocytaires est primordiale pour prédire les capacités de reconstitution quantitative et qualitative du patient et le risque de complications issues d'un défaut de reconstitution. Le suivi des lymphocytes T naïfs et/ou l'analyse de la diversité du TCR pourraient guider plus précisément la prévention anti-infectieuse chez les patients immunodéprimés ayant eu une déplétion lymphocytaire.

La quantification des TREC dans la première année suivant l'administration de globulines anti-lymphocytaires aurait également pu être permis de mieux préciser la part de l'activité thymique dans la reconstitution. Nous avons observé chez quelques patients une lymphopénie T CD4 persistante et un faible pourcentage de lymphocytes T naïfs malgré des TREC élevés avant greffe. Chez ces patients, la contribution thymique à la reconstitution a pu être modifiée par d'autres facteurs. La disponibilité en progéniteurs T peut être modifiée par les immunosuppresseurs (Almeida AR et al J Exp Med 2001) utilisés pendant la greffe. L'environnement en cytokines, facteurs de croissance et hormones peut également influencer le développement des thymocytes. L'interleukine-7 (IL-7), produite par les cellules épithéliales thymiques, est un facteur de survie pour les thymocytes (Peschon JJ et al J Exp Med 1994, Bolotin E et al Blood 1996, Mackall CL et al Blood 2001, Li A et al Gene Ther 2006). La part de ces facteurs dans la reconstitution lymphocytaire après déplétion par les globulines anti-lymphocytaires n'a pas été étudiée à ce jour. Ainsi, la qualité de la thymopoïèse dépend également d'interactions entre thymocytes et stroma thymique. Ces interactions sont indispensables pour la différenciation et la maturation des thymocytes. Différents facteurs sont

impliqués dans ces interactions dont la prostaglandine E2 (Rocca B et al J Immunol. 1999). La synthèse de PGE2 est sous le contrôle d'une enzyme, COX-2. Récemment, un polymorphisme G → C dans le promoteur du gène de COX-2 a été identifié avec l'allèle C associé à une plus faible activité du promoteur et à des taux de réduits de PGE2 (Cipollone F et al JAMA 2004). Nous avons étudié l'influence du polymorphisme de COX-2 sur la reconstitution lymphocytaire TCD4 suivant la déplétion induite par l'ATG. Nous avons montré que la capacité de production de PGE2 prédite par le polymorphisme du promoteur du gène de COX-2 module la reconstitution lymphocytaire T CD4. La PGE2 a été impliquée dans l'homéostasie hématopoïétique chez zebra fish (Rocca BJ et al Immunol. 1999) et dans la récupération de la myélotoxicité du 5-fluorouracyl chez la souris (Lorenz M et al Experimental Hematology 1999). Aucune étude à ce jour n'avait vérifié l'implication de la PGE2 et de COX-2 dans l'homéostasie lymphocytaire chez l'homme. De nombreux traitements peuvent influencer la synthèse de PGE2 (stéroïdes, mycophénolate mofétil) et ainsi modifier la qualité de la reconstitution.

La thymopoïèse n'est pas la seule voie de reconstitution après déplétion lymphocytaire induite par les globulines anti-lymphocytaires. Chez des babouins rendus lymphopéniques par irradiation et les globulines anti-lymphocytaires, l'injection d'IL-7 permet d'obtenir des valeurs de lymphocytes T CD4 plus élevés qu'avec le placebo (Lu H et al Clin Immunol. 2005). D'autre part, après déplétion lymphocytaire par des anticorps anti-CD4 et anti-CD8 monoclonaux dans un modèle de greffe de cœur chez la souris, il a été montré une prédominance des lymphocytes T mémoires dans les jours suivant la déplétion (David C et al J Immunol 2006). Ce résultat serait expliqué par une plus grande résistance de ces cellules à la déplétion d'une part et par une prolifération homéostatique d'autre part. Cette expansion de lymphocytes persistants après la déplétion (lymphopenia-induced proliferation, LIP) est sous la dépendance du complexe CMH peptide et de cytokines telles que l'IL-7 et l'IL-15 (Kieper WC et al Proc Natl Acad Sci USA

1999, Ernst B et al Immunity 1999, Schluns KS et al Nat. Immunol 2000, Tan JT et al J Exp Med 2002). Les lymphocytes apparaissant au cours de ces proliférations ont un phénotype effecteur / mémoire (Prlic MB et al J Immunol 2001, Goldrath AW et al J Exp Med 2000, Cho BK et al J Exp Med 2000, Gudmundsdottir H et al J Immunol 2001, Murali-Krishna K et al J Immunol 2000). Ces données expérimentales sont concordantes avec l'observation faite chez l'Homme après déplétion par Campath, un anticorps monoclonal anti-CD52 (Pearl, JP et al Am J Transplant 2005). Juste après le traitement, la proportion de lymphocytes T mémoire était augmentée suggérant que ces cellules étaient relativement épargnées par la déplétion.

Nous avons mis en évidence une augmentation relative du nombre de lymphocytes T CD4+CD127-CD25+FoxP3+ chez les patients présentant une lymphopénie T CD4. Cette constatation a déjà été faite par d'autres auteurs au cours de lymphopénies de mécanisme différent (Zhang H et al Nat Med. 2005, Noris M, et al J Am Soc Nephrol. 2007). La lymphopénie pourrait être un stimulus pour la réponse T régulatrice probablement dans le but d'éviter la production de lymphocytes auto-réactifs. Les lymphocytes T CD4+CD25+FoxP3+ peuvent être générées par des mécanismes dépendants ou indépendants du thymus. Dans notre travail, une origine thymique est peu probable. En effet, ces patients avaient avant greffe une fonction thymique réduite et aucun n'a généré un nombre important de lymphocytes T CD4+CD45RA+ CD62L+ après greffe. L'augmentation relative des lymphocytes T CD4+ CD25+FoxP3+ serait plus certainement en rapport avec une expansion périphérique. Une autre hypothèse serait que ces cellules puissent être relativement épargnées lors de la déplétion et ainsi représentées une part plus importante des lymphocytes chez les patients ayant eu la déplétion la plus importante. D'ailleurs, chez la souris, il a été montré une moindre sensibilité des Treg aux globulines anti-lymphocytaires polyclonales (Minamimura K et al J Immunol. 2006) et

l'existence d'une conversion périphérique des lymphocytes T naïfs en Treg lors de la lymphopénie (Liang S et al J Exp Med. 2005). Ce résultat ne confirme pas une des hypothèses initiales qui était que la reconstitution lymphocytaire favoriserait l'émergence d'une population Th3 ou TR1, anti-inflammatoire et anti-athérogène. En réalité, nous constatons plutôt l'inverse au moins d'un point de vue phénotypique et si l'on considère les pourcentages de Treg par rapport aux lymphocytes T CD4. Ceci est néanmoins à nuancer du fait de l'absence de vérification de l'effet suppresseur de cette population. Par ailleurs, cette expansion de lymphocytes T de phénotype régulateur ne suffit pas à contrôler le syndrome inflammatoire. Ceci pourrait être du à un déficit quantitatif de lymphocytes régulateurs, à un pouvoir suppresseur altéré de ces cellules ou à une résistance des autres lymphocytes T à l'effet suppresseur. Les patients lymphopéniques T CD4 ont à la fois une expansion relative de lymphocytes T de phénotype régulateur et un état inflammatoire accru comme en témoigne des taux de CRP plus élevés. Il est possible que des infections sub-cliniques persistantes ou récidivantes génèrent cet état inflammatoire chez les patients ayant une lymphopénie T CD4 et contribue à aggraver l'athérosclérose. Le contexte inflammatoire pourrait lui-même favoriser la production de lymphocytes T régulateurs (Han GM et al Cell Immunol. 2008). Enfin, nous avons mesuré les lymphocytes T régulateurs *via* l'expression de FoxP3. Or les lymphocytes Treg Tr1 n'exprimeraient pas nécessairement FoxP3 (Vieira PL et al J Immunol. 2004).

Il est possible qu'une expansion de lymphocytes T régulateurs n'exprimant pas FoxP3 existe et n'ait pas été détectée dans notre étude.

Il a néanmoins été suggéré que les globulines anti-lymphocytaires pouvaient favoriser l'expansion de lymphocytes T régulateurs ou que les lymphocytes T régulateurs étaient moins sensibles à la déplétion par l'ATG que les autres lymphocytes. Il semble, qu'*in vitro*, les globulines anti-lymphocytaires puissent augmenter le nombre et la fonction des lymphocytes T CD4+CD25+Foxp3+ (Feng X et al Blood 2008). Le mécanisme reposerait sur la conversion de

lymphocyte T CD4+CD25<sup>-</sup> en lymphocytes CD4+CD25<sup>+</sup>. L'expression de Foxp3 serait également augmentée dans ces deux populations lymphocytaires (Feng X et al Blood 2008).

Ces données n'ont pas été confirmées *in vivo* chez l'Homme. Les lymphocytes T régulateurs ne sont pas épargnés par la déplétion induite par l'ATG. Les taux de lymphocytes T CD4+CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> sont en effet indétectables dans le sang une semaine après l'administration d'ATG (Sewgobind VD et al Nephrol Dial Transplant 2009). Il faut néanmoins prendre en compte le fait que les lymphocytes T circulants ne représentent que 1% de l'ensemble des lymphocytes T. Il est donc difficile d'apprécier l'effet des globulines anti-lymphocytaires sur les Treg. Tout au moins, on peut conclure que les Treg sanguins sont affectés comme les autres lymphocytes T.

Même si ces travaux concernant les relations entre lymphopénie T CD4 et complications cardio-vasculaires ne recouvrent qu'une faible partie des interactions entre immunité adaptative et athérosclérose après transplantation, ils mettent en évidence un certain nombre de points.

Les modifications de la réponse immune induites par les traitements immunosuppresseurs influencent de façon complexe l'athérogénèse. L'effet net sur le risque cardio-vasculaire dépend des caractéristiques intrinsèques du système immunitaire avant la transplantation, des différents modes d'action de la molécule et des interactions avec différents paramètres non immunologiques.

Ils illustrent également la difficulté à transposer chez l'Homme les conclusions issues de l'étude des modèles animaux. Alors qu'il est régulièrement observé une diminution des lésions vasculaires dans les modèles animaux d'athérosclérose croisés avec des souches ayant un déficit des fonctions des lymphocytes T, nous constatons ici l'inverse. Les interactions de cette anomalie avec les conditions intrinsèques du patient, le contexte de transplantation et les agents extérieurs, infectieux ou non, sont probablement à l'origine de ces différences. De plus, les souris présentent

le plus souvent un système immunitaire naïf alors que le système immunitaire du patient transplanté a été en contact avec de nombreux stimuli.

D'autres systèmes d'étude et de validation doivent donc être mis au point. Nous avons débuté des travaux concernant quatre axes principaux : une validation clinique prospective et multicentrique, la mise en place d'un modèle animal, l'évaluation de polymorphismes génétiques et la caractérisation dynamique de la réponse immune.

### **Article 3**

#### **RELEVANCE OF TOLL-LIKE RECEPTOR-4 POLYMORPHISMS IN RENAL TRANSPLANTATION.**

**Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, Ferrand C, Bamoulid J, Saas P, Kazory A,  
Chalopin JM, Tiberghien P.**

**Kidney Int. 2005 Jun;67(6):2454-61.**

Les Toll-like receptors (TLR) sont des récepteurs transmembranaires impliqués dans la reconnaissance des pathogènes. Dix TLR ont été découverts à ce jour et le TLR4 est le récepteur du lipopolysaccharide (LPS) (Akira S et al Nat Immunol 2001). Cependant, TLR4 peut également se lier à des ligands endogènes (Akira S et al Nat Immunol 2001). La liaison à TLR4 d'un ligand endogène (DAMP) ou exogène (PAMP) active l'immunité innée. Récemment ont été découvert deux polymorphismes de TLR4 aboutissant à des substitutions d'un acide aminé dans le domaine extra-cellulaire et conduisant à des modifications fonctionnelles du récepteur (Arbour NC et al Nat Genet 2000). Ces variants, Asp299Gly et Thr399Ile, sont associés à une diminution de la réponse au LPS et à un niveau plus faible des concentrations de cytokines pro-inflammatoires (Ferwerda B et al Mol Med 2008). Les patients porteurs de ces polymorphismes ont également un risque accru d'infections bactériennes (Ferwerda B et al Mol Med 2008). Des études récentes ont également suggéré que la présence des variants Asp299Gly et Thr399Ile diminuait la progression de la maladie athéromateuse et le risque de complications cardiovasculaires (Ameziane N et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003, Boekholdt SM et al Circulation 2003, Kiechl S et al N Engl J Med 2002). Néanmoins, il n'existait pas de données sur l'effet des polymorphismes de TLR4 sur l'athérosclérose après transplantation.

Nous avons étudié dans une cohorte de 238 patients transplantés rénaux stables l'impact des mutations de TLR4 sur la survenue de complications athéromateuses.

















## Discussion et conclusions

Cette étude suggère qu'un défaut de la signalisation TLR4 protège contre le développement et/ou les complications de l'athérosclérose après transplantation. Des arguments importants existent pour attribuer un rôle à TLR4 dans l'athérogénèse. L'expression de TLR4 est augmentée dans plaques athéromateuses carotidiennes et coronaires des souris apoE -/- (Edfeldt K et al Circulation 2002, Xu XH et al Circulation 2001). L'expression de TLR4 au niveau de l'intima aortique est également augmentée dans un modèle de souris avec induction de lésion artérielle (Vink A et al Circulation 2002). Il est aussi rapporté que l'activation de TLR4 par injection de LPS augmente la formation des plaques d'athérome chez la souris apoE -/- (Hollestelle SC et al Circulation 2004).

TLR4 semble être un médiateur indispensable entre infection et athérosclérose. En effet, l'aggravation des lésions athéromateuses de la souris apoE -/- par *Chlamydia pneumoniae* est abolie lorsque le gène de TLR4 est également invalidé (apoE -/- x TLR4 -/-) (Naiki Y et al J Immunol 2008). Par ailleurs, plusieurs études épidémiologiques dans la population générale ont retrouvé une relation entre les polymorphismes de TLR4 et la progression de l'athérosclérose (Ameziane N et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003, Boekholdt SM et al Circulation 2003, Kiechl S et al N Engl J Med 2002).

TLR4 est impliqué dans divers aspects de la réponse inflammatoire, y compris en l'absence d'infections par la reconnaissance de ligands endogènes produits durant les processus inflammatoires, comme le fibrinogène ou le hyaluronane (Hodgkinson CP et al Thromb Haemost 2008, Wu H et al J Clin Invest. 2007).

Divers biais doivent être considérés dans cette étude. Son caractère rétrospectif pourrait être à l'origine d'un biais de sélection. Nous avons en effet inclus une population à plus faible risque de

perte de greffon, de maladies cardio-vasculaires et de décès. Un biais de survie est donc probable. Par ailleurs, un taux différent de perte de greffon et de décès selon la présence ou non de la mutation de TLR4 ne peut pas être exclu. Néanmoins, ces biais devraient plutôt favoriser l'hypothèse nulle et ne pas contribuer à un résultat faussement positif.

Notre travail ne remplit pas l'ensemble des critères d'une étude de polymorphismes (Editorial. Freely associating. Nat genet 1999). Nous n'avons en particulier pas vérifié la fonctionnalité des mutations de TLR4 dans notre population. Arbour et al ont montré que les mutations Asp299Gly et Thr399Ile diminue la réponse au LPS (Arbour NC et al Nat Genet. 2000). La transfection de cellules avec un des haplotypes TLR4 muté réduit l'activité NF- $\kappa$ B (Schwartz DA et al J Endotoxin Res 2001, Schwartz DA et al Respir Physiol. 2001, Schwartz DA et al Chest 2002). Les autres études fonctionnelles sont basées sur la mesure de cytokines par les cellules mononucléées après stimulation par le LPS. Les études *in vitro* ont pour la plupart montré des taux de cytokines plus faibles associés à la présence des mutations Asp299Gly et Thr399Ile (Ferwerda B et al Mol Med 2008). En revanche, des études faites *in vivo* chez des volontaires sains n'ont pour la plupart pas confirmé une diminution de la production de cytokine chez les patients porteurs du polymorphisme de TLR4 (Calvano JE et al Clin Immunol 2006, Marsik C et al Clin Chem 2005, Schippers EF et al Cytokine 2004, Schippers EF et al Cytokine 2005). Dans deux études utilisant 2 ng/kg de LPS, les taux de TNF- $\alpha$  étaient similaires quelque soient les haplotypes (Calvano JE et al Clin Immunol 2006, Marsik C et al Clin Chem 2005). Dans l'une d'elles seulement, les taux d'IL-6 étaient plus faibles chez les patients présentant une mutation du gène de TLR4 (Marsik C et al Clin Chem 2005).

Il est donc difficile de conclure sur les conséquences fonctionnelles des mutations de TLR4.

De fait, la plupart des études *in vivo* n'ont pas trouvé de phénotype particulier associé aux haplotypes mutés de TLR4. Ceci pose deux types de questions : Quelle valeur doit-on accorder aux différents types de validation fonctionnelle d'un polymorphisme ? Un phénotype clinique

constant suffit-il lorsque la mesure de la conséquence biologique n'est pas accessible ou est méthodologiquement discutable ?

Les méthodes de validation fonctionnelle sont multiples. Il est quelquefois possible de mesurer directement le produit du gène (lorsque sa concentration est suffisante et le tissu biologique obtenu représentatif) ou l'activité biologique du produit du gène (dans le cas d'une activité enzymatique par exemple). Ces cas sont les plus simples et l'interprétation des résultats est aisée. Pour d'autres polymorphismes (récepteurs cellulaires ou cytokines par exemple), les méthodes de validation sont plus complexes et reposent sur des mesures indirectes. Les expériences de transfections sont difficiles à transposer aux situations cliniques. Elles n'explorent que la situation homozygote (absente chez l'Homme dans le cas des mutations de TLR4) et dans des lignées cellulaires anormales. Elles ne tiennent pas compte de l'environnement global et de possible contre régulations qui annihileraient l'effet de la mutation et d'éventuelles conséquences cliniques. Ceci vaut d'ailleurs pour la plupart des méthodes *in vitro*. Les méthodes de stimulation posent d'autres problèmes, parmi lesquels le mode de stimulation plus ou moins physiologique et le type de liquide ou de tissu prélevé pour analyse plus ou moins représentatif. Dans le cas des polymorphismes de TLR4, les méthodes de validation posent tous ces problèmes d'interprétation qui empêchent une conclusion valide. Les résultats contradictoires entre les études sont aussi probablement expliqués par ces difficultés méthodologiques.

En l'absence de preuves évidentes d'un effet biologique difficilement accessible, mais en présence de l'accumulation de travaux attribuant un phénotype clinique particulier aux patients porteurs de mutations particulières, il faut s'interroger sur la possibilité de considérer que les effets cliniques, lorsqu'ils sont constants et reproductibles, sont suffisants pour caractériser un phénotype. En ce qui concerne les polymorphismes de TLR4, les études d'association n'ont pas retrouvé de façon constante d'association à un phénotype clinique particulier. En particulier, le risque d'infection à bactéries gram négatif (BGN) n'est pas augmenté dans près de la moitié des

études (Pour revue : Ferwerda B et al Mol Med 2008). Il est intéressant de noter que Ferwerda et al ont montré que seul l'haplotype Asp299Gly était associé à une production différente de cytokines (Ferwerda B et al Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007). Après stimulation *in vitro* par LPS, la production de TNF- $\alpha$  était plus importante en présence de cet haplotype (Ferwerda B et al Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007). En présence de l'haplotype Asp299Gly/Thr399Ile, la production de cytokines était similaire à celle des patients ayant un génotype sauvage (Ferwerda B et al Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007). Le génotype Asp299Gly/Thr399Ile est le plus répandu en Europe ou le génotype Asp299Gly/WT est très rare. Or la plupart des études d'association concernent des populations d'Europe ou du continent Nord-Américain (Ferwerda B et al Mol Med 2008). Il est intéressant de noter que les rares études faites en Afrique où le génotype Asp299Gly/WT est très majoritaire ont constamment retrouvé un risque accru d'infections chez les patients porteurs de ce polymorphisme (Mockenhaupt FP et al J Commun Dis 2006, Newport MJ et al Tuberculosis 2004). Il est donc probablement nécessaire de mieux définir les phénotypes cliniques et biologiques de chaque mutation dans chaque type de population particulière.

L'absence de contrôle de nos résultats dans une seconde cohorte est une autre limite méthodologique de notre étude (Editorial. Freely associating. Nat genet 1999). D'autres travaux ont été publiés après notre travail et n'ont pas toujours confirmé l'ensemble de nos résultats. Cervera et al ont retrouvé un excès d'infections à CMV chez les patients porteurs de l'haplotype Asp299Gly/Thr399Ile, mais pas davantage d'infections bactériennes (Cervera C et al Transplantation 2007). Par ailleurs, il a été rapporté récemment qu'après greffe de cellules hématopoïétiques, le risque d'aspergillose est augmenté chez les patients porteurs d'un polymorphisme de TLR4 (Bochud PY et al N Engl J Med. 2008).

Aucune corrélation entre le polymorphisme de TLR4 du receveur et le rejet aigu du greffon rénal n'a pas été observée dans deux études (Nogueira E et al Transplant Proc 2007, Palmer SM et al Clin Transplant 2006). Il est à noter cependant, que dans l'une d'elles, il existait une différence non significative, mais numériquement très importante qui pose le problème de la puissance de cette étude qui incluait peu de patients (Nogueira E et al Transplant Proc 2007). Dans la seconde, il existait une relation entre le polymorphisme de TLR4 du donneur (c'est-à-dire du greffon) et le rejet aigu (Palmer SM et al Clin Transplant 2006). Récemment, il a été démontré que l'expression de TLR4 augmentait au cours de l'ischémie reperfusion et que cette augmentation était d'autant plus importante qu'il s'agissait de greffon provenant de donneurs cadavériques (Krüger B et al Proc Natl Acad Sci U S A. 2009). Dans notre série, nous n'avons pas analysé le polymorphisme de TLR4 des donneurs.

En tout état de cause, ces résultats discordants justifient de poursuivre les études d'association génétiques entre les mutations de TLR4 et certaines complications de la transplantation en appliquant des critères méthodologiques plus stricts. Aucune autre étude que la notre n'a à ce jour étudié l'impact du polymorphisme de TLR4 sur l'athérosclérose du transplanté rénal. Nos résultats doivent donc impérativement être confirmés par une autre étude.

Un point important souligné par notre travail est que les mutations de TLR4 semblent avoir un rôle anti-athérogène, alors même qu'elles augmentent les infections bactériennes et virales. Pourtant, le rôle des infections dans l'athérosclérose est suspecté depuis de nombreuses années. Le rôle des infections comme facteur étiologique de l'athérosclérose a été proposé à de nombreuses reprises (Libby P et al Circulation 1997) à la suite d'études séro-épidémiologiques liant infection passée à *Chlamydia* et infarctus du myocarde et maladie coronaire chronique (Saikku P et al Lancet 1988). Néanmoins, les études les plus récentes dont celles basées sur l'utilisation d'antibiotiques actifs sur *Chlamydia* en particulier l'azithromycine n'ont pas

confirmé ces premières études (O'Connor CM et al JAMA 2003, Cercek B et al Lancet 2003, Grayston JT et al N Engl J Med 2005, Zahn R et al Circulation 2003, Cannon CP et al N Engl J Med 2005).

Par ailleurs, les études animales montrent que la survenue d'une infection n'est pas nécessaire au développement de l'athérosclérose chez la souris apoE <sup>-/-</sup>. En effet, l'étendue des plaques est similaire chez les souris apoE <sup>-/-</sup> élevées en atmosphère stérile et chez celles ayant une infection (Wright BH et al Heart Vessels 2000).

Par conséquent, même s'il n'est pas exclu que les infections puissent jouer un rôle dans l'athérosclérose, elles ne sont pas nécessaires à son initiation, ni à sa progression.

## **Article 4**

### **NO EVIDENCE OF ASSOCIATION BETWEEN NOD2/CARD15 GENE POLYMORPHISM AND ATHEROSCLEROTIC EVENTS AFTER RENAL TRANSPLANTATION.**

**Courivaud C, Ferrand C, Deschamps M, Tiberghien P, Chalopin JM, Duperrier A, Saas**

**P\*, Ducloux D\* (\* co-senior authors).**

**Transplantation. 2006 Apr 27;81(8):1212-5.**

## **Introduction**

NOD2 module l'activité pro-inflammatoire des macrophages. NOD2 est un récepteur intracellulaire pour le muramyl dipeptide présent sur la paroi de certaines bactéries. La liaison à son ligand dans le macrophage permet l'activation de NF- $\kappa$ B et l'activation cellulaire, dont la production de cytokines pro-inflammatoires. Il existe plusieurs polymorphismes de NOD2/CARD15 associés *in vitro* à une diminution de la capacité d'activer NF-KB en réponse au muramyl dipeptide. Ces polymorphismes sont également associés à deux maladies inflammatoires, la maladie de Crohn et à la survenue d'une maladie du greffon contre l'hôte (GVH) après greffe de cellules hématopoïétiques.

En revanche, aucune étude ne s'était intéressée au rôle de NOD2/CARD15 dans la maladie athéromateuse.

Nous avons étudié dans une cohorte de 182 patients transplantés rénaux stables l'impact des polymorphismes de TLR4 sur la survenue de complications athéromateuses.

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

Cécile Courivaud,<sup>1,2,3</sup> Christophe Ferrand,<sup>1,2,4</sup> Marina Deschamps,<sup>1,2,4</sup> Pierre Tiberghien,<sup>1,2,4,5</sup> Jean-Marc Chalopin,<sup>1,2,3,5</sup> Anne Duperrier,<sup>1,2,4</sup> Philippe Saas,<sup>1,2,4,6</sup> and Didier Ducloux<sup>1,2,3,5,6</sup>

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 posttransplant 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]/size<sup>2</sup> [m<sup>2</sup>]), 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.

<sup>1</sup>INSERM, U645, Besançon, France.

<sup>2</sup>University of Franche-Comté, IFR133, Besançon, France.

<sup>3</sup>CHU Besançon, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, Besançon, France.

<sup>4</sup>EFS, Bourgogne Franche-Comté, Plateforme de BioMonitoring, Besançon, France.

<sup>5</sup>CHU Besançon, CICBiothérapie, Besançon, France.

<sup>6</sup>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

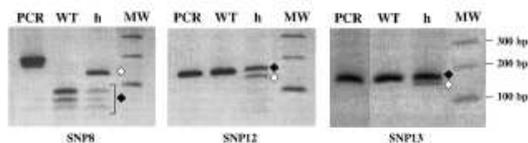
|   | Wild type genotype carriers | NOD2 polymorphism carriers <sup>a</sup> |
|---|-----------------------------|---|
| n (%)   | 155 (85.2)                  | 27 (14.8)                               |
| Age (years)   | 45.8±13.8 <sup>b</sup>      | 49.4±9.2 <sup>b</sup>                   |
| Sex ratio (male/female)                             | 97/58 (62.6%/37.4%)         | 20/7 (74%/26%)                          |
| Pre-transplant body mass index (kg/m <sup>2</sup> ) | 22.6±4.1 <sup>b</sup>       | 24.3±4.2 <sup>b</sup>                   |
| 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 <sup>b</sup>       | 15.2±6.7 <sup>b</sup>                   |
| Cigarette smoking                                   | 15 (9.7%)                   | 5 (18.5%)                               |
| Atherosclerotic events after transplantation        | 32 (20.6%)                  | 6 (22.2%) <sup>c</sup>                  |
| 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/m<sup>2</sup> 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.

<sup>a</sup> Heterozygote RTRs with a mutated NOD2 allele in either SNP8, SNP12 or SNP13 region (since no heterozygous composites or homozygous mutants were detected); <sup>b</sup> mean ± SD; <sup>c</sup> 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 Apal 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-



**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 Apal 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, ◇ symbol depicts the mutated allele, whereas ♦ depicts the wild type allele.

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  $\chi^2$  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

**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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B pathway in macrophages were performed in vitro (8, 9). They suggested that the association of

NOD2 mutations was characterized by a diminished NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B activation and inflammatory cytokine production (17). These results suggest the absence of NOD2 implication in NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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 Kerveillant 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 adaptative 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, Yannarakis 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. Morrè 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, Chamillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptative 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.

## Discussion et conclusions

Nous n'avons pas mis en évidence d'association entre les polymorphismes de NOD2 et le risque de complications athéromateuses. Comme TLR4, NOD2 est impliqué dans la reconnaissance de motifs bactériens (Philpott DJ et al Mol Immunol 2004). NOD2 est un récepteur intra-cellulaire pour le muramyl dipeptide (présent sur la paroi bactérienne) capable après liaison avec son ligand d'activer NF-KB (Philpott DJ et al Mol Immunol 2004). Néanmoins, les conséquences fonctionnelles des polymorphismes sur la fonction de NOD2 n'ont été mise en évidence qu'*in vitro* (Ogura Y et al J Biol Chem 2001, Girardin SE et al J Biol Chem 2003). Ces travaux montraient que les mutations de NOD2 étaient associées à une capacité moindre d'activation de NF-KB (Ogura Y et al J Biol Chem 2001, Girardin SE et al J Biol Chem 2003). La seule étude *in vivo* réalisée chez la souris C57BL/6 NOD2 *-/-* n'a pas confirmé ces résultats (Pauleau AL et al Mol Cell Biol 2003). Les souris NOD2 *-/-* ont une réponse normale aux ligands de TLR en terme d'activation de NF-KB et de production de cytokines (Pauleau AL et al Mol Cell Biol 2003). NOD2 n'est donc pas indispensable pour l'activation de NF-KB dans les macrophages. En revanche, le rôle de NOD2 dans l'immunité innée semble confiné au tractus digestif (Kobayashi KS et al Science 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 Science 2005). NOD2 est d'ailleurs fortement exprimé au niveau des cryptes de l'iléon terminal (Kobayashi KS et al Science 2005, Ogura Y et al Gut 2003). Ceci pourrait expliquer que NOD2 soit plus particulièrement impliqué dans les pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin comme la maladie de Crohn (Helio T et al Gut 2003, Hampe J et al Lancet 2002) ou la GVH (Holler E et al Blood 2004). NOD2 aurait donc surtout pour rôle de contrôler l'inflammation intestinale. Tous ces éléments pourraient expliquer l'absence de relation entre NOD2 et athérosclérose.

Néanmoins, Krüger et al ont récemment retrouvé une association entre des polymorphismes de NOD2 et la mortalité cardio-vasculaire (Krüger B et al Transpl Int. 2007). 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.

**Article 5**

**G-765C *COX-2* GENE PROMOTER POLYMORPHISM AND RISK OF  
ATHEROSCLEROSIS AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION**

**Courivaud C, Bamoulid J, Loupy A, Le Corre D, Ferrand C, Tiberghien P, Chalopin JM,  
Legendre C, Thervet E, Saas P, Ducloux D**

**Soumis à Transplantation**

## **Introduction**

Les macrophages activés jouent un rôle majeur dans la formation et la maturation de la plaque d'athérome. Ces effets pourraient être en partie liés à la production de prostaglandines (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) qui augmentent la perméabilité vasculaire, stimulent la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses et augmentent la synthèse de la matrice extra-cellulaire. La synthèse de ces prostaglandines dépend d'une enzyme, la cyclo-oxygénase-2 (COX-2).

Récemment, Papafilli et al (Papafilli A et al *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002) ont identifié un variant du promoteur de COX-2, correspondant à la substitution d'une guanine par une cytosine en position -765 (-765 G→C). Les patients porteurs de l'allèle -765 C ont une plus faible activité du promoteur et des taux réduits de PGE<sub>2</sub>. Par ailleurs, Cipollone et al (Cipollone F et al *JAMA* 2004) ont montré que ce polymorphisme était associé à une réduction du risque de complications athéromateuses.

Aucune donnée n'était disponible en transplantation rénale. Nous avons donc étudié les relations entre le polymorphisme de COX-2 et la survenue de complications athéromateuses dans deux cohortes indépendantes de transplantés rénaux.

**G-765C COX-2 gene promoter polymorphism and risk of atherosclerosis after  
kidney transplantation<sup>1</sup>**

**Cécile Courivaud<sup>2,3</sup>, Jamal Bamouli<sup>2,3</sup>, Alexandre Loupy<sup>4</sup>, Delphine Le Corre<sup>5</sup>, Christophe Ferrand<sup>2,6</sup>, Pierre Tiberghien<sup>2,6,7</sup>, Jean-Marc Chalopin<sup>2,3,7</sup>, Christophe Legendre<sup>4</sup>, Eric Thervet<sup>4</sup>, Philippe Saas<sup>2,6</sup>, Didier Ducloux<sup>2,3,7</sup>**

<sup>2</sup>INSERM, UMR645, Besançon, F-25020 France; Université de Franche-Comté, Besançon, F-25020 France; IFR133, Besançon, F-25000 France

<sup>3</sup>CHU Saint Jacques, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, F-25030, Besançon, France

<sup>4</sup>CHU Necker, Department of Renal Transplantation, F-75015, Paris, France

<sup>5</sup> UMR-S 775 Bases Moléculaires de la Réponse aux Xénobiotiques, F-75006, Paris, France

<sup>6</sup>EFS Bourgogne Franche-Comté, Plateforme de Biomonitoring, Besançon, F-25020 France.

<sup>7</sup>CHU Saint Jacques, CIC intégré en Biothérapies, CIC-BT 506, F-25030 Besançon, France

**Keywords:** atherosclerosis; cyclooxygenase-2 polymorphism; prostaglandin; kidney; transplantation

**Word count of the Text:** 2083

**Word count of the Abstract:** 193

**Number of Tables:** 3

**Number of Figures:** 1

**Address for correspondence:** Cécile Courivaud, Department of Nephrology, Dialysis and Renal Transplantation, CHU Saint-Jacques, F-25030, Besançon, France. Phone: 33381218782; FAX: 33381218781; e-mail: ccourivaud@chu-besancon.fr

## Footnotes

<sup>1</sup> This work was supported by grants from the Fondation Transplantation, the Fondation de France (Appel d'offre 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).

**Abbreviations:**

AE, atherosclerotic events; CHD, coronary heart disease; COX-2, cyclooxygenase-2; CV, cardiovascular; gDNA, genomic DNA; MMP, matrix metalloproteinase; PG, prostaglandin; PGE-2, prostaglandin-E2; SNP, single nucleotide polymorphism; RR, relative risk; RTR, renal transplant recipient.

## **Abstract**

**Background:** A functional G→C polymorphism has been identified in the human *COX-2* gene with C allele leading to a decreased promoter activity with low prostaglandin E2 (PGE2) production. PGE2 has various effects on atherosclerotic plaque arteries that could influence cardiovascular outcomes after transplantation.

**Methods:** We studied the association between -765 *COX-2* gene promoter polymorphism and atherosclerotic events in two independent cohorts of renal transplant recipients (RTR) including a total of 634 patients. The functional effect of *COX-2* gene promoter polymorphism was analyzed by measuring serum levels of PGE2.

**Results:** Analysis of 634 patients identified 22 CC (3.5%), 187 GC (29.5%), and 425 GG (67%). The distribution of the 3 genotypes was similar in the two cohorts. Patients with the GG genotype had significantly higher serum PGE2 concentrations than patients with the C allele (1111 pg/ml [441-3787], 1026 pg/ml [518-6868], 2541 pg/ml [483-10327] in CC, GC and GG carriers;  $p=0.0003$ ) leading to compare C carriers to GG patients. We found no evidence for an association between the -765 *COX-2* gene promoter polymorphism and the subsequent risk of AE after kidney transplantation.

**Conclusion:** Polymorphism in *COX-2* gene promoter does not influence atherosclerotic process after transplantation.

## **INTRODUCTION**

Renal transplant recipients (RTR) have disproportionately high rates of atherosclerotic outcomes (1, 2). Both traditional and non traditional cardiovascular (CV) risk factors explained this increased incidence of atherosclerotic events (AE). Consistent data suggest that vascular inflammation contributes to the pathogenesis of atherosclerosis in RTR (3). Indeed, our group has

emphasized the importance of inflammatory and innate immunity processes in the pathogenesis of atherosclerosis after renal transplantation (4, 5, 6).

Activated macrophages are a key component not only in the development of atherosclerosis but also in the plaque rupture leading to thrombosis. Prostaglandin (PG) biosynthesis has been implicated in the pathophysiology of cardiovascular process (3). It has been proposed that COX-2-mediated PG production (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>...) by activated macrophages may promote atherosclerosis through a number of mechanisms, including induction of vascular permeability, stimulation of smooth muscle cell migration as well as proliferation and synthesis of extracellular matrix (7). In addition, it has been shown that COX-2 and matrix metalloproteinases (MMP) that degrade the extracellular matrix co-expressed in atherosclerotic plaques (8).

Recently, Papafilli and al. (9) identified a variant in the *COX-2* gene promoter, a guanine to cytosine substitution at position -765 (-765 G→C). Patients carrying the -765 C allele had markedly lower promoter activity compared with homozygote patients for -765 G. Cipollone and al. (10) found an association between patients carrying the -765 C allele and lower risk of myocardial infarction and stroke. Moreover, studies (11, 12, 13) found that the 765 G→C *COX-2* gene promoter polymorphism is not associated with risk of cardiovascular events.

To date, no study has evaluated the impact of *COX-2* gene promoter polymorphism on vascular outcomes after transplantation. For that purpose, we assessed the occurrence of *COX-2* gene promoter polymorphism at position -765 and analysed the relationship among this polymorphism and the development of atherosclerotic complications, independent of traditional risk factors in RTR.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study design and population**

We conducted a retrospective genetic study to assess whether *COX-2* gene promoter polymorphism at position -765 (G→C) may be a risk factor for atherosclerotic events in two independent cohorts of 634 patients in all.

The first cohort comprised 378 patients transplanted in the department of renal transplantation in Saint-Jacques hospital (Besançon). These patients were transplanted between June 1972 and December 2004. The second cohort enrolled 256 patients who received a transplant in the department of renal transplantation in Necker hospital (Paris). These patients were transplanted between April 1986 and July 2003.

Age, gender, past history of cardiovascular disease, diabetes and post-transplanted diabetes mellitus were also analyzed as covariate.

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

The 634 RTRs were genotyped for *COX-2* gene promoter polymorphism. 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 study using a PCR-based genotyping assay with specific primers, as described (9). Thus, after PCR amplification of the polymorphism regions of interest, PCR products were overnight digested with Aci I restriction endonuclease (New England Biolabs, Beverly, USA), according to the conditions recommended by the supplier. Digestion products were then separated by a 2% standard agarose gel electrophoresis. 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 (Figure 1).

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

The functional effects of *COX-2* gene promoter polymorphism were also analyzed by measuring serum levels of prostaglandin E2 (PGE2). PGE2 was measured with high-sensitivity ELISA kits (R&D Systems, Lille, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the profile of PGE2 secretion was determined according to the genotype of the promoter. Three different possible genotypes as could be defined: High (GG), medium (GC) or low (CC) inductor of PGE2 secretion. Serums of 62 patients enrolled in Besançon cohort were thawed. The plates were read at 405 nm by spectrophotometer (ELx800UV, Bio-tek instruments, Vermont, USA).

## **Post-transplant atherosclerotic events**

**Coronary heart disease (CHD)** : Myocardial infarction documented by serial 12-lead electrocardiogram evidence or Q-wave infarction and appropriate myocardial enzyme elevations; coronary revascularization including coronary artery bypass surgery or percutaneous transluminal coronary angioplasty; typical history of angina with abnormal coronarography ; sudden death when a history of CHD was present.

**Stroke/cerebrovascular disease** : Nonhemorrhagic strokes confirmed by neurologic examination findings consistent with new onset focal neurologic deficits, with or without computed tomography or magnetic resonance imaging evidence of cerebral infarction; symptomatic extracranial artery stenosis resulting in carotid endarterectomy.

**Abdominal aortic or lower extremity arterial disease**: Abdominal aortic repair; lower extremity revascularization via bypass surgery or angioplasty; lower extremity amputation; new onset of intermittent claudication confirmed by doppler or arteriography findings.

## **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  $\chi^2$  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 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  $\alpha = 0.05$ . 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 CV events is increased) or less than 1 (i.e. risk of CV events is decreased). Assumptions of Cox models (log-linearity, proportionality of risk in time) were met in this analysis.

## **RESULTS**

### **Study population (Table 1)**

#### **Cohort 1 (Besançon):**

Three hundred and seventy eight patients were followed for a mean duration of  $9.3 \pm 8.8$  years after transplantation. Mean age was  $46 \pm 14$  years, and 236 RTR (62.4%) were men. Mean

dialysis duration was  $17.7 \pm 23.6$  months. There was no difference in the timing of transplant between the wild type group and those with the C allele.

### **Cohort 2 (Paris):**

Two hundred and fifty-six patients were followed for a mean duration of  $8.5 \pm 3.7$  years after transplantation. Mean age was  $45 \pm 12.5$  years, and 144 (56.2%) were men. Mean dialysis duration was longer than cohort 1:  $33.2 \pm 43.7$  months. We observed a difference in the timing of transplant between the wild type group and those with the C allele:  $29.8 \pm 43.5$  months versus  $43.8 \pm 43.7$  months respectively.

In the 2 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**

Frequency of different genotypes observed in RTR was for the 2 cohorts, Besançon and Paris, respectively: 65.6 % (n=248) and 69.1% (n=177) of GG homozygotes (wild type), 29.9 % (n=113) and 29 % (n=74) of GC heterozygotes, 4.5 % (n=17) and 1.9% (n=5) of CC homozygotes (mutant) (**Table 2**).

### **Relationship 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 were selected with the aim to test the maximum of RTR with CC genotype (in relation with the low incidence of this genotype). Frozen serum samples were available at different time of the transplantation for these different patients. Patients with the GG genotype had significantly higher serum PGE2 concentrations than patients with the C allele

(median values and range were, respectively, 1111.41 pg/ml [441.7-3787.5], 1026.06 pg/ml [518.6-6868.6], 2541.1 pg/ml [483.7-10327.1] in CC, GC and GG carriers;  $p=0.0003$ ). Since the C allele appeared to have dominant effect, we then compared C carriers to patients with the GG genotype.

### ***COX-2* gene promoter polymorphism and atherosclerotic events (Table 3)**

#### **Besançon cohort:**

Seventy one AE occurred during follow-up (41 in GG patients and 30 in C carriers experienced AE). This corresponds to 20 AE for 1000 patients/year.

In univariate analysis, older age ( $p<0.001$ ), male gender ( $p=0.065$ ), a past history of AE ( $p<0.001$ ), diabetes mellitus ( $p=0.031$ ) were directly associated with AE. There was a trend towards a protective effect of the GG genotype ( $p=0.062$ ).

Cox regression analysis revealed that age above the median (RR, 3.22; 95% CI, 1.82 to 7.85), a past history of AE (RR, 2.81; 95% CI, 1.59 to 5.77), and diabetes mellitus (RR, 1.76; 95% CI, 1.22 to 4.10) were risk factors for AE. The *COX-2* gene promoter polymorphism at position -765 was not associated with AE.

#### **Necker cohort:**

Thirty AE occurred during follow-up (24 in GG patients and 6 in C carriers experienced AE). This corresponds to 15 AE for 1000 patients/year.

In univariate analysis, older age ( $p<0.001$ ), male gender ( $p=0.04$ ), a past history of AE ( $p<0.001$ ), diabetes mellitus ( $p=0.008$ ), and GG genotype ( $p=0.03$ ) were directly associated with AE. Cox regression analysis revealed that age above the median (RR, 2.87; 95% CI, 1.67 to 6.98), a past history of AE (RR, 2.31; 95% CI, 1.29 to 6.12), and diabetes mellitus (RR, 1.59; 95% CI, 1.19 to 5.42) were risk factors for AE. The *COX-2* gene promoter polymorphism at

position -765 was not associated with AE.

## DISCUSSION

Inflammation plays a critical role in CV disease, and the inflammatory cascade seems to be particularly important in the atherosclerosis process. In this setting, numerous studies have explored the effect of the *COX-2* gene promoter polymorphism on AE with contradictory results. If some authors reported that the C allele might provide protective effects against atherosclerotic events (9, 10), others studies found no evidence for an association between the *COX-2* gene promoter polymorphism and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke (11-13). Moreover, Rofecoxib, a COX-2 inhibitor, was shown to increase the risk of cardiovascular events and withdrew from the market for this reason (14). These conflicting results are 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 PGH<sub>2</sub> is further metabolized by other isomerases to various prostanoids (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, 15dPGJ<sub>2</sub>) (15). Many PG produced by the COX-2 pathway contribute to formation of atherosclerosis and thrombosis, but PG also possess anti-inflammatory properties (3). For example, circulating PGD<sub>2</sub> has been recently identified as a protective factor in reducing the incidence of restenosis in patients undergoing percutaneous transluminal coronary angioplasty (16). Furthermore, 15dPGJ<sub>2</sub> is a potent inhibitor of NF-κB (3). Thus it is likely that COX-2 exerts beneficial or detrimental effects depending on the ability of specific cells to metabolize PGH<sub>2</sub> 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 at position -765 in two independent cohorts. In the Necker cohort, GG carriers had an increased risk of EA

whereas there was a trend towards a protective effect of this genotype in the Besançon cohort. 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 SNP studies. Plausible hypothesis, biological relevance of the polymorphism, and confirmation of the results in a separate independent cohort are indispensable prerequisite in such studies (17).

We demonstrated in this study that *COX-2* G/C gene promoter polymorphism at position -765 has functional significance. PGE2 levels were lower in patients with the C allele. PGE2 is a product of COX-2-mediated PG production. These measurements were made at different time of the transplantation when glucocorticoids dosages were different. Glucocorticoids administered once daily can inhibit COX-2 pathway (18). As well, treatment by statins, largely prescribed in RTRs, can also modify PGE2 biosynthesis (19). Unfortunately, the relative contribution of these treatments in our 2 cohorts was not investigated. Nevertheless, glucocorticoids dosages were not different in GG and C carriers (data not shown).

In conclusion, we cannot show any effect of the -765G→C *COX-2* gene promoter polymorphism on the occurrence of AE in RTRs. Future studies should determine whether the ability of specific cells to metabolize PGH2 into cytoprotective or proinflammatory prostanoids may influence the atherosclerotic process.

### **Acknowledgements:**

We thank Christine Colombain and Eléonore Gravelin for their excellent technical assistance.

## References

1. Kasiske BL, Maclean JR, Snyder JJ. Acute myocardial infarction and kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 900.
2. Holdaas H, Fellstrom B, Jardine AG, Holme I, Nyberg G, Fauchald P, Gronhagen-Riska C, Madsen S, Neumayer HH, Cole E, Maes B, Ambuhl P, Olsson AG, Hartmann A, Solbu DO, Pedersen TR; Assessment of Lescol in Renal Transplantation (ALERT) Study Investigators. Effect of fluvastatin on cardiac outcomes in renal transplant recipients: a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 361: 2024.
3. Cipollone F, Fazio M, Mezzetti A. Novel determinants of plaque instability. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1962.
4. 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.
5. 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.
6. Courivaud C, Ferrand C, Tiberghien P, Chalopin JM, Duperrier A, Saas P, Ducloux D. No evidence of association between NOD2/CARD15 gene polymorphism and atherosclerotic events after renal transplantation. *Transplantation* 2006; 81: 1212.
7. Linton MF, Fazio S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 116.
8. Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Fazio 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 atherosclerosis plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation* 2001; 104: 921.

9. 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.
10. Cipollone F, Toniato E, Martinotti S, Fazia 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.
11. Huuskonen KH, Kunnas TA, Tanner MM, Mikkelsen J, Ilveskoski E, Karhunen PJ, Nikkari ST. COX-2 gene promoter polymorphism and coronary artery disease in middle-aged men: the Helsinki sudden death study. *Mediators Inflamm* 2008; 2008: 289453.
12. Hegener HH, Diehl KA, Kurth T, Gaziano JM, Ridker PM, Zee RYL. Polymorphisms of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 gene, and prostaglandin-E receptor 2 gene, C-reactive protein concentrations and risk of atherothrombosis: a nested case-control approach. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1718.
13. Kohsaka S, Volcik KA, Folsom R, Wu KK, Ballantyne CM, Willerson JT, Boerwinkle E. 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.
14. 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. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343: 1520.
15. Brash AR. Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J Clin Invest* 2001; 107: 1339.
16. 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.

17. Editorial. Freely associating. *Nat genet* 1999; 22: 1.
18. Malcher-Lopes R, Franco A, Tasker JG. Glucocorticoids shift arachidonic acid metabolism toward endocannabinoid synthesis: a non-genomic anti-inflammatory switch. *Eur J Pharmacol* 2008; 583: 322.
19. Orbe J, Beloqui O, Rodriguez JA, Belzunce MS, Roncal C, Paramo JA. Protective effect of the G-175C COX-2 polymorphism on subclinical atherosclerosis and inflammatory markers in asymptomatic subjects with cardiovascular risk factors. *Clin Chim Acta* 2006; 368: 138.

**Table1. Characteristics of patients in the two cohorts**

|                           | Cohort 1 (Besançon) n=378 |               | Cohort 2 (Paris) n=256 |               | Study population n=634 |             |
|---------------------------|---------------------------|---------------|------------------------|---------------|------------------------|-------------|
|                           | GC + CC                   | GG            | GC + CC                | GG            | GC + CC                | GG          |
|                           | n=130 (34.4%)             | n=248 (65.6%) | n=79 (30.9%)           | n=177 (69.1%) | n=209 (33%)            | n=425 (67%) |
| Age (years)               | 47 ± 14.3                 | 46 ± 13.8     | 42 ± 12.4              | 45 ± 12.8     | 46 ± 13.6              | 45 ± 13.4   |
| BMI (Kg/m <sup>2</sup> )  | 22.9 ± 4.7                | 22.9 ± 4.2    | ~                      | ~             | ~                      | ~           |
| Gender ratio (% male)     | 61.5                      | 62.9          | 53                     | 57.6          | 53.5                   | 59.3        |
| Diabetes (%) / PTDM (%)   | 7.7 / 14.6                | 4.8 / 12.1    | 12.6 / 3.8             | 14.7 / 10.2   | 9.6 / 10.5             | 8.5 / 11.3  |
| Past history of CV events | 17 (13.1%)                | 26 (10.5%)    | 9 (11.4%)              | 25 (14.1%)    | 26 (12.4%)             | 51 (12%)    |

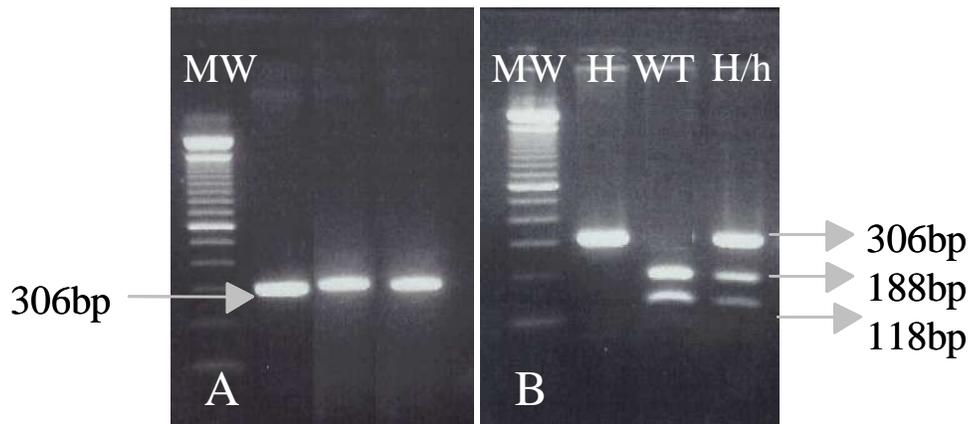
**Table 2. Genotypes frequencies of the -765 *COX-2* gene promoter polymorphism in the two cohorts**

|                                  | Besançon (n=378) | Paris (n=256) | Study population (n=634) |
|----------------------------------|------------------|---------------|--------------------------|
| <b>GG homozygote (wild type)</b> | 248 (65.6%)      | 177 (69.1%)   | 425 (67%)                |
| <b>GC heterozygote</b>           | 113 (29.9%)      | 74 (29%)      | 187 (29.5%)              |
| <b>CC homozygote (mutant)</b>    | 17 (4.5%)        | 5 (1.9%)      | 22 (3.5%)                |

**Table 3. 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 |               | Study population n=634 |             |
|-------------------------------|---------------------------|---------------|------------------------|---------------|------------------------|-------------|
|                               | GC + CC                   | GG            | GC + CC                | GG            | GC + CC                | GG          |
|                               | n=130 (34.4%)             | n=248 (65.6%) | n=79 (30.9%)           | n=177 (69.1%) | n=209 (33%)            | n=425 (67%) |
| <b>Atherosclerotic events</b> | 30 (23.1%)                | 41 (16.5%)    | 6 (7.6%)               | 24 (13.5%)    | 36 (17.2%)             | 65 (15.3%)  |

**Figure legend**



**Figure 1. Analysis of the -765 *COX-2* gene promoter polymorphism in three representative samples. (A) Reverse transcription-PCR reactions performed and PCR product of 306 bp obtained. (B) Agarose gel electrophoresis after *Aci* 1 overnight restriction digest: homozygote mute (H), wild-type (WT) and heterozygote (H/h). MW represents the molecular weight marker.**

## **Discussion et conclusions**

Nous n'avons retrouvé aucune relation entre le polymorphisme de COX-2 et la survenue d'évènements athéromateux. Les données issues de la littérature sont très variables. Si certains auteurs ont rapporté un effet protecteur de l'allèle C (Cipollone F et al JAMA 2004), d'autres études n'ont retrouvé aucune relation entre le polymorphisme et la survenue d'infarctus du myocarde ou d'accident vasculaire cérébral (Huuskonen KH et al Mediators Inflamm 2008, Hegener HH et al J Thromb Haemost 2006, Kohsaka S et al Atherosclerosis 2008). Par ailleurs, le Rofecoxib, un inhibiteur de COX-2, augmente le risque de complications cardio-vasculaires et a été retiré du marché pour cette raison (Bombardier C et al N Engl J Med 2000). Ces données contradictoires pourraient être en relation avec le rôle complexe de COX-2 dans le processus inflammatoire. COX-2 est seulement l'une des enzymes de la voie de dégradation de l'acide arachidonique et le produit de sa réaction, la PGH<sub>2</sub>, peut être ensuite transformé en diverses prostaglandines (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, 15dPGI<sub>2</sub>). Certaines de ces prostaglandines peuvent contribuer à la formation de la plaque d'athérome et à la survenue de thromboses. Cependant, certaines prostaglandines possèdent aussi des propriétés anti-inflammatoires (Cipollone F et al J Thromb Haemost 2005). PGD<sub>2</sub> réduit le risque de resténose après angioplastie coronaire (Inoue T et al Thromb Haemost 2001). PGE<sub>2</sub> serait un promoteur important de la réponse T régulatrice (Van Der Pouw Kraan TC et al J Exp Med 1995, Takahashi HK et al J Immunol 2002, Strausmann GV et al J Exp Med 1994, Harizi H et al J Immunol 2002, Sharma S et al Cancer Res 2005, Baratelli F et al J Immunol 2005, Yaqub S et al J Immunol 2006, Akasaki Y et al J Immunol 2004, Okano M et al Immunology 2006). Ainsi, COX-2 pourrait exercer des effets bénéfiques ou délétères variables selon la capacité individuelle à générer à partir de PGH<sub>2</sub> des prostaglandines anti- ou pro-inflammatoires. Cette hypothèse est assez peu probable pour expliquer nos résultats. En effet, les deux cohortes sont homogènes d'un point de vue

démographique, alors que les associations entre polymorphisme et évènements athéromateux sont opposées. L'homogénéité des deux populations aurait du orienter les résultats dans le même sens. En fait, les différences de résultats entre les études pourraient être dues à des problèmes méthodologiques. Dans notre étude, nous avons analysé deux cohortes. Dans la cohorte de Necker, nous avons retrouvé un risque accru d'évènements athéromateux chez les patients GG alors même que ce génotype était protecteur dans la cohorte bisontine. L'analyse d'une seule de ces cohortes aurait pu conduire à des conclusions erronées. Cette étude illustre donc la nécessité de réunir un certain nombre d'exigences pour les études de polymorphisme dont la reproductibilité des résultats dans deux cohortes indépendantes (Editorial. Freely associating. Nat genet 1999).

## Discussion sur les articles 4, 5 et 6

### Conclusions et perspectives concernant les relations entre immunité innée et athérosclérose

Les relations entre immunité innée et athérosclérose après transplantation sont vraisemblablement très importantes. Nous avons d'ailleurs montré que l'élévation de la protéine C réactive était un facteur de risque indépendant d'évènements athéromateux après transplantation (Ducloux D et al *Kidney Int.* 2004). Chez le transplanté rénal, l'importance relative de l'immunité innée est sans doute exacerbée du fait du blocage plus ou moins complet de l'immunité adaptative par les immunosuppresseurs qui n'ont pas ou moins d'effets sur l'immunité innée. Les différents acteurs de la réponse innée ne sont pas impliqués de la même façon dans le processus athéromateux. En effet, si l'impact global de la réponse innée mesuré par la concentration sérique de la CRP influence le risque cardio-vasculaire, nous avons montré qu'alors que TLR4 joue un rôle indépendant dans l'augmentation du risque, NOD2/CARD15 ou COX-2 n'apparaissent pas avoir d'influence directe. Il s'agit de constatations intéressantes si l'on envisage une immunothérapie de l'athérosclérose. Les TLR pourraient représenter des cibles thérapeutiques. Par exemple, TAK-242 supprime *in vitro* la signalisation TLR4 et diminue les manifestations du choc septique (Kawamoto T et al *Eur J Pharmacol* 2008, Shah T et al *Eur J Pharmacol* 2007).

Cette molécule pourrait dans un premier temps être testée dans le modèle expérimental d'athérosclérose.

## Article 6

IL-6 PROMOTER POLYMORPHISM -174 IS ASSOCIATED WITH NEW-ONSET  
DIABETES AFTER TRANSPLANTATION.

Bamoulid J, Courivaud C, Deschamps M, Mercier P, Ferrand C, Penfornis A, Tiberghien P,  
Chalopin JM, Saas P, Ducloux D.

J Am Soc Nephrol. 2006 Aug;17(8):2333-40.

## **Influence de la réponse immune sur les facteurs de risque traditionnels**

L'inflammation joue un rôle dans la pathogénie du diabète de type 2 (Pickup JC et al Diabetologia 1998). Cette relation est démontrée par nombre d'études prospectives montrant que l'élévation de l'IL-6 ou de la CRP est un facteur de risque indépendant de survenue d'un diabète de type 2 (Spranger J et al Diabetes 2003, Hu FB et al Diabetes 2004, Nakanishi S et al Diabetes Care 2003, Pradhan AD et al JAMA 2001). Par ailleurs, 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 (Kubaszek A et al Diabetes 2003, Herbert A et al Diabetologia 2005, Vozarova B et al Human Genet 2003).

Néanmoins, la relation entre inflammation et survenue d'un diabète *de novo* après transplantation n'a pas été étudiée. En conséquence, nous avons étudié 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,<sup>\*†</sup> Cécile Courivaud,<sup>\*†</sup> Marina Deschamps,<sup>\*‡</sup> Patricia Mercier,<sup>\*‡</sup> Christophe Ferrand,<sup>\*‡</sup> Alfred Penfornis,<sup>§</sup> Pierre Tiberghien,<sup>\*||</sup> Jean-Marc Chalopin,<sup>\*||</sup> Philippe Saas,<sup>\*‡</sup> and Didier Ducloux<sup>\*||</sup>

<sup>\*</sup>INSERM, U645, University Besançon, and IFR133, <sup>†</sup>CHU Saint Jacques, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, <sup>‡</sup>EFS Bourgogne Franche-Comté, Plateforme de Biomonitoring, <sup>§</sup>CHU Jean Minjot, Department of Endocrinology, and <sup>||</sup>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 ( $2.15 \pm 2$  versus  $1.32 \pm 1.03$ ;  $P = 0.03$ ). 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](http://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](mailto:dducloux@chu-besancon.fr)

Copyright © 2006 by the American Society of Nephrology

ISSN: 1046-6673/1708-2333

der, pretransplantation BMI [weight (kg)/height<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>)], 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  $\geq 7$  mmol/L, or a plasma glucose value of  $\geq 11.1$  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  $\geq 7$  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  $\mu$ 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 ( $\mu$ U/ml)  $\times$  fasting glucose (mmol/L)/22.5]. The HOMA for insulin secretion (HOMA- $\beta$ ) was calculated as described previously (16) to study the possible role of  $\beta$  cell dysfunction: [20  $\times$  fasting insulin ( $\mu$ 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  $\chi^2$  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  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>). 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  $98 \pm 21$  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  $43 \pm 13$  yr, and 139 RTR (64%) were men. Hypertension was present in 156 (72%) RTR. Mean dialysis duration was  $20 \pm 17$  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  $33 \pm 11$  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  $47 \pm 14$  yr, and 86 (65%) RTR were men. Hypertension was present in 99 (75%) RTR. Mean dialysis duration was  $19 \pm 13$  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](http://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*

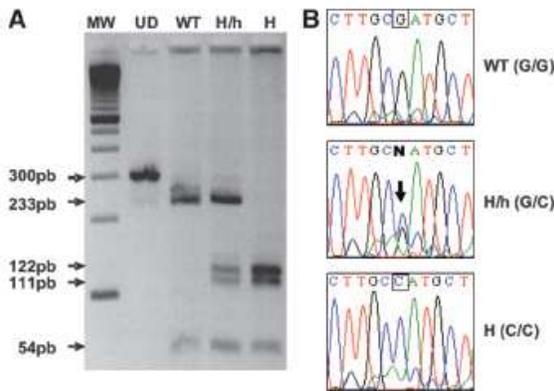
**Retrospective Study.** Ninety-five (43.8%) patients were GG homozygotes (wild type), 92 (42.4%) were GC heterozygotes, and 30 (13.8%) were CC homozygotes (mutant; Table 1). There were no differences in pretransplantation characteristics, acute graft rejection episodes, and cumulative steroid dose in 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 ( $53 \pm 13$  versus  $46 \pm 14$ ;  $P = 0.04$ ; 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 [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<br>(n [%]) | Prospective Cohort<br>(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<sup>a</sup>

|  | Retrospective Cohort |                |                | Prospective Cohort |                |                      |
|--|----------------------|----------------|----------------|--------------------|----------------|----------------------|
|  | GG<br>(n = 95)       | GC<br>(n = 92) | CC<br>(n = 30) | GG<br>(n = 55)     | GC<br>(n = 62) | CC<br>(n = 15)       |
| Age  | 45 ± 12              | 44 ± 13        | 45 ± 11        | 47 ± 14            | 45 ± 12        | 53 ± 13 <sup>b</sup> |
| Gender ratio (% male)  | 64                   | 65             | 63             | 72                 | 65             | 40 <sup>c</sup>      |
| Pretransplantation BMI (kg/m <sup>2</sup> )                              | 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                  |

<sup>a</sup>ADPKD, autosomal dominant polycystic kidney disease; HCV, hepatitis C virus.

<sup>b</sup>*P* = 0.04 (CC versus G).

<sup>c</sup>*P* = 0.03 (CC versus G).

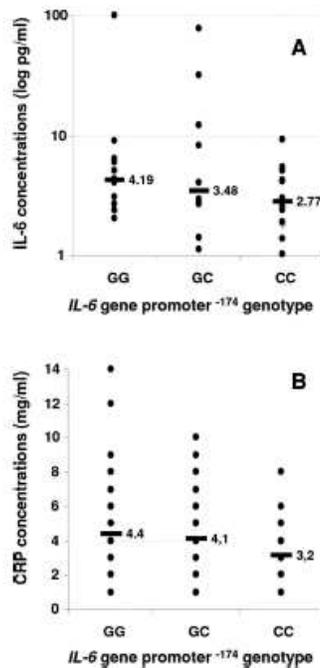


Figure 2. Functional validation of the *IL-6* gene promoter polymorphism -174 (G/C) in renal transplant recipients. (A) Circulating *IL-6* concentrations were determined by ELISA in the sera of 36 renal transplant recipients (RTR; 12 with the CC genotype, 12 with the GC genotype, and 14 with the GG genotype). 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)<sup>a</sup>

| Variable                 | HR   | 95% CI        | P       |
|--------------------------|------|---------------|---------|
| Age (yr)                 |      |               |         |
| <45                      | 1    | —             | —       |
| ≥45                      | 4.54 | 1.53 to 13.45 | 0.006   |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> ) |      |               |         |
| <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   |

<sup>a</sup>BMI, 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 monivariate 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 <sup>2</sup> ) |      |               |       |
| <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<sup>a</sup>

| Genotype Variable                           | GG<br>(n = 15)        | GC<br>(n = 15) | CC<br>(n = 15)         |
|---|-----------------------|----------------|------------------------|
| Age   | 44 ± 15               | 46 ± 11        | 45 ± 13                |
| Gender ratio (% male)                       | 66                    | 66             | 60                     |
| Pretransplantation BMI (kg/m <sup>2</sup> ) | 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 <sup>b</sup> |
| Insulin (μU/ml)                             | 8.3 ± 6.2             | 6.2 ± 5.5      | 6.1 ± 3.6              |
| HOMA-IR                                     | 2.15 ± 2 <sup>c</sup> | 1.43 ± 1.3     | 1.32 ± 0.91            |
| HOMA-β                                      | 93 ± 52               | 76 ± 63        | 82 ± 41                |

<sup>a</sup>HOMA, Homeostasis Model Assessment; -IR, insulin resistance; -β, insulin secretion.

<sup>b</sup>P = 0.02, GG versus CC carriers.

<sup>c</sup>P = 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. Proceeding of an international expert panel meeting. Barcelona, Spain, 19 February 2003. *Transplantation* 75[Suppl]: S53–S54, 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-Kiinkaanniemi 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, Vendreli 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/>

## Conclusions

Cette 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 diabète *de novo* après transplantation. Bien que la causalité ne puisse pas être absolument affirmée, nous avons pris un certain nombre de précaution méthodologique qui renforce la validité de notre résultat. Nous avons en particulier vérifié que le polymorphisme -174(G→C) modulait la production d'IL-6. En effet, les patients ayant la double mutation ont des taux plus faibles d'IL-6 et de CRP que les patients homozygotes sauvage. Par ailleurs, nous avons mis en évidence une relation entre ce même polymorphisme et la survenue d'un diabète *de novo* dans deux cohortes distinctes et indépendantes. Enfin, nous avons montré que le polymorphisme de l'IL-6 modulait la sensibilité à l'insuline sans modifier la capacité de sécrétion de cette hormone. Ces exigences méthodologiques recouvrent assez largement celles proposées par des experts pour valider la relation entre un polymorphisme et un évènement clinique (Editorial. Freely associating. Nat genet 1999).

L'interprétation de la partie rétrospective de notre étude pourrait être gênée par un biais de sélection. Nous avons inclus une population à plus faible risque de perte de greffon, de maladies cardio-vasculaires et de décès. Un biais de survie est donc probable. Un taux différent de perte de greffon et de décès selon le génotype du polymorphisme ne peut pas être exclu. Néanmoins, tous ces biais devrait plutôt favoriser l'hypothèse nulle et en aucun cas contribuer à un résultat faussement positif. Le diabète *de novo* est un évènement précoce après transplantation et il est peu probable que des évènements tardifs puissent modifier nos résultats. Enfin, les patients non testés ne différaient ni pour les facteurs de risque de diabète *de novo*, ni pour l'incidence du diabète *de novo*.

Néanmoins, du fait de la nature du recrutement de l'étude rétrospective, celle-ci ne pouvait que servir à générer notre hypothèse. Il est intéressant de noter que l'étude prospective confirme l'ensemble des résultats obtenus dans la cohorte rétrospective (fréquence des allèles, incidence du diabète de novo, relation entre le polymorphisme -174(G→C) et diabète *de novo*).

Pour qu'un test génétique soit pertinent en pratique clinique, il doit apporter une valeur prédictive positive ou négative supplémentaire par rapport aux données cliniques et/ou biologiques plus facilement accessibles. Nous pensons que le polymorphisme -174(G→C) remplit cette condition. 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 Transplantation 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 Transplantation 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.

## Discussion

## Conclusions et perspectives

Nos travaux confirment que des mécanismes immunologiques impliqués dans l'athérosclérose du sujet immunocompétent sont également opérants chez le transplanté rénal. Certains déficits de l'immunité innée, concernant en particulier le récepteur TLR4, modifieraient le risque de complications athéromateuses. Par ailleurs, l'intensité de la réponse inflammatoire, appréciée par la concentrations sérique de CRP, influencerait également le risque de diabète de novo post-transplantation et de complications athéromateuses (Ducloux D et al Kidney Int 2004).

En revanche, nous n'avons à ce jour que peu exploré le rôle de la polarisation lymphocytaire. Cette thématique fait partie de nos priorités à venir.

Par ailleurs, nous avons montré que des mécanismes spécifiques, influençant la progression de l'athérosclérose, existent chez le transplanté rénal. Une lymphopénie T CD4 prolongée induite par les globulines anti-lymphocytaires polyclonales augmente en effet le risque de complications athéromateuses. Nous avons également contribué à mieux comprendre les causes de la persistance de cette lymphopénie, en particulier le rôle du thymus. En revanche, le mécanisme liant lymphopénie T CD4 et athérosclérose reste en partie indéterminé.

Ces travaux apportent des éléments nouveaux pour la compréhension des mécanismes de l'athérosclérose après transplantation et pourraient permettre une meilleure prise en charge des patients. En effet, les facteurs pro- ou anti-athérogènes que nous avons identifiés pourraient servir à mieux identifier des patients à risque élevé ou faible de complications athéromateuses et à adapter les mesures de prévention en fonction de ce risque. Par ailleurs, certains facteurs pro-athérogènes pourraient être des cibles futures d'immunothérapie.

Nos projets en cours et à venir ont pour but de répondre aux questions restées en suspens après ces travaux, avec la volonté de poursuivre un plan de recherche translationnelle.

## **Polymorphismes des cytokines**

Nous avons déjà étudié différents polymorphismes de promoteurs de gènes de cytokines et leur association avec la survenue d'évènements athéromateux. Plus précisément, nous avons analysé des polymorphismes de l'IL-10 (-1082 G/A, -819 C/T, -592 C/A), de l'IL-6 (-174 G/C), du TNF- $\alpha$  (-308 G/A, -238 G/A), du TGF- $\beta$  (codon 25 G/C) et de l'IFN- $\gamma$  (répétition CA).

Les techniques de mise en évidence de ces polymorphismes sont décrites en annexe I. Ces polymorphismes correspondent à des capacités de production variables de la cytokine.

Nous nous sommes plus spécifiquement intéressé à la balance IFN- $\gamma$  / IL-10. Le polymorphisme de répétition de l'IFN- $\gamma$  prédit une forte production d'IFN- $\gamma$  chez les patients porteurs du génotype 2/2. Concernant l'IL-10, la combinaison des trois polymorphismes prédit une production plus importante de cette cytokine chez les patients ayant le génotype GCC/GCC. On peut ainsi définir quatre catégories de patients en fonction de leur capacité de production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-10. Nous avons observé que chez les patients ayant une production élevée d'IL-10, le taux d'évènements athéromateux était faible et non influencé par la capacité de production d'IFN- $\gamma$ . A l'inverse, chez les faibles producteurs d'IL-10, l'incidence cumulée des évènements athéromateux est plus élevée et très différente selon la capacité de production d'IFN- $\gamma$  (figure).

Ce résultat suggère que l'élément déterminant dans l'athérogénèse est la capacité de supprimer ou non la réponse inflammatoire au sein de la plaque. La réponse Th1 semble constante et quasi-universelle (tous les individus ont des stries lipidiques). Selon la possibilité ou non de générer une réponse T régulatrice, les lésions évolueront fortement ou non.

Ces premiers résultats restent à ce jour des hypothèses. L'impact de ces polymorphismes doit être vérifié dans une autre cohorte indépendante. Nous avons dans ce but établi des coopérations avec plusieurs centres de transplantation. Par ailleurs, nous devons étudier le caractère fonctionnel de ces polymorphismes chez le transplanté rénal. Cet aspect fait l'objet d'une recherche spécifique.

### **Caractérisation dynamique**

Il est important d'une part de pouvoir caractériser la fonctionnalité biologique des polymorphismes, mais aussi de rapporter la capacité de production d'une ou de plusieurs cytokines directement à la survenue de complications athéromateuses. Nous développons différentes techniques d'approche pour mesurer la capacité de production de cytokines incluant l'Elispot et la cytométrie de flux.

### **Validation prospective et multicentrique**

Une validation clinique de nos résultats est indispensable. C'est la raison pour laquelle nous avons mis en place une étude prospective multicentrique ayant pour but de déterminer l'influence de l'orientation de la réponse lymphocytaire dans la survenue de complications athéromateuses. Cette étude, financée par un PHRC et une subvention INSERM pour la recherche clinique translationnelle, a débuté en 2008 et inclura un minimum de 500 patients incidents. Les prélèvements effectués chez tous les patients permettront de corréler les mesures effectuées aux évènements enregistrés de façon prospective.

### **Modèle animal**

Nous avons mis en place un modèle de souris apoE -/- pour étudier la relation entre lymphopénie T CD4 et athérosclérose. Nous avons utilisé des souris de fond C57BL/6N@Rj (B6) mâles et femelles âgés de 8 à 14 semaines ainsi que des souris femelles apoE -/- sous fond génétique C57BL/6 âgées de de 10 à 23 semaines.

Nous avons étudié la reconstitution lymphocytaire et l'évolution des lésions athéromateuses chez ces souris après déplétion obtenue par un anticorps monoclonal anti-CD4. Les souris apoE -/- ayant reçu cet anticorps avaient des lésions moins étendues d'athérome que les souris apoE -/- n'ayant pas reçu l'anticorps monoclonal. Ce résultat diffère de celui que nous avons observé chez

l'Homme. Néanmoins, il est important de noter que le mécanisme de la déplétion est différent de celui de l'ATG, que les leucocytes n'exprimant pas le marqueur CD4 sont épargnés et que lors du sacrifice, toutes les souris avaient eu une reconstitution lymphocytaire normale.

Nous allons étudier maintenant l'impact de la déplétion lymphocytaire obtenue par des globulines anti-lymphocytaires polyclonales sur le développement de l'athérome chez la souris apoE <sup>-/-</sup>. La perfusion d'ATG se fera dans différentes conditions permettant d'approcher au plus près les conditions de la transplantation (traitements répétés pour maintenir la lymphopénie CD4, allogreffe simultanée, traitement immunosuppresseur, ...).

Malgré l'incidence très élevée de complications athéromateuses après transplantation rénale, le rôle du système immunitaire dans l'athérogénèse et l'existence d'une immunodépression acquise chez le transplanté, aucun travaux avant les nôtres n'ont étudié les relations entre la réponse immunitaire et les complications athéromateuses après transplantation. Nos résultats confirment que les mécanismes impliqués chez l'immunocompétent sont probablement également opérants chez le transplanté rénal, mais que des mécanismes originaux contribuent sans doute à l'excès de risque cardio-vasculaire des transplantés rénaux. Une meilleure connaissance de l'ensemble de ces mécanismes devrait permettre une meilleure prévention des événements athéromateux dans cette population.

## Bibliographie

Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J. Biol. Chem.* 2000; 275:9047–54

Ait Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Merval R, Esposito B, Cohen JL, Fisson S, Flavell RA, Hansson GK, Klatzmann D, Tedgui A, and Mallat Z. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 2006; 12: 178-180

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

Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001 ; 2: 675-680,

Almeida AR, Borghans JA, Freitas AA. T cell homeostasis: thymus regeneration and peripheral T cell restoration in mice with a reduced fraction of competent precursors. *J Exp Med* 2001; 194: 591– 9

Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, Chollet-Martin S, Aumont MC, Seknadji P, Lamotte M, Le Bret D, Ollivier V, de Prost D. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: e61–e64

Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000 ; 25: 187-191

Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 2000; 25 :187-91

Ashman LK, Aylett GW. Expression of CD31 epitopes on human lymphocytes: CD31 monoclonal antibodies differentiate between naive (CD45RA+) and memory (CD45RA-) CD4-positive T cells. *Tissue Antigens*. 1991; 38: 208-12

Balkau B, Lange C, Fezeu L, Tichet J, de Lauzon-Guillain B, Czernichow S, Fumeron F, Froguel P, Vaxillaire M, Cauchi S, Ducimetière P, Eschwège E. Predicting diabetes: clinical, biological, and genetic approaches: data from the Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR). *Diabetes Care*. 2008; 31: 2056-61

Baratelli F, Lin Y, Zhu L, Yang SC, Heuze-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: 1483-1490

Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, Horejs-Hoeck J, Kaupper T, Roncarolo MG. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol*. 2006;177:8338-47

Bentdal OH, Leivestad T, Fauchald P, Albrechtsen D, Pfeffer P, Lien B, Foss A, Oyen O, Hartmann A, Nordal K, Sodal G, Flatmark A, Thorsby F, Brekke IB. The national kidney transplant program in Norway still results in unchanged waiting lists. *Clin Transpl* 1998; 221-228,

Bili A, Moss AJ, Francis CW, et al: Anticardiolipin antibodies and recurrent coronary events: A prospective study of 1150 patients. *Circulation* 2000; 102:1258–1263

Björkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, Lee MA, Means T, Halmen K, Luster AD, Golenbock DT, Freeman MW. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 2004; 10: 416-421

Blüher M, Fasshauer M, Tönjes A, Kratzsch J, Schön MR, Paschke R. Association of interleukin-6, C-reactive protein, interleukin-10 and adiponectin plasma concentrations with measures of

obesity, insulin sensitivity and glucose metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2005; 113: 534-7

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: 368–375.

Bochud PY, Chien JW, Marr KA, Leisenring WM, Upton A, Janer M, Rodrigues SD, Li S, Hansen JA, Zhao LP, Aderem A, Boeckh M. Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2008; 359: 1766-77

Boekholdt SM, Agema WR, Peters RJ, Zwinderman AH, van der Wall EE, Reitsma PH, Kastelein JJ, Jukema JW. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. *Circulation* 2003; 107: 2416–2421

Bolotin E. Enhancement of thymopoiesis after bone marrow transplant by in vivo interleukin-7. *Blood* 1996; 88: 1887–94

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. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343: 1520

Borrowdale SL, Schron E, Knirsch C. Azithromycin for the secondary prevention of coronary events. *N Engl J Med* 2005; 352: 1637–1645,

Brey RL, Abbott RD, Curb JD, et al: Beta(2)-Glycoprotein 1-dependent anticardiolipin antibodies and risk of ischemic stroke and myocardial infarction: The Honolulu Heart Program. *Stroke* 2001; 32:1701–1706

Buono C, Come CE, Stavrakis G, Maguire GF, Connelly PW, Lichtman AH. Influence of interferon-gamma on the extent and phenotype of diet-induced atherosclerosis in the LDLR-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 454 –460

Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest* 2002; 109: 745-53.

Caligiuri G, Paulsson G, Nicoletti A, Maseri A, and Hansson GK. Evidence for antigen-driven T-cell response in unstable angina. *Circulation* 2000; 102: 1114–1119

Caligiuri G, Stahl D, Kaveri S. Autoreactive antibody repertoire is perturbed in atherosclerotic patients. *Lab Invest* 2003; 83 : 839-47

Calvano JE. Response to systemic endotoxemia among humans bearing polymorphisms of the Toll-like receptor 4 (hTLR4). *Clin. Immunol.* 2006; 121: 186-90.

Campbell TC, Parpia B, and Chen J. Diet, lifestyle, and the etiology of coronary artery disease: the Cornell China study. *Am J Cardiol* 1998; 82: 18T–21T

Canault M, Peiretti F, Poggi M, Mueller C, Kopp F, Bonardo B, Bastelica D, Nicolay A, Alessi MC, Nalbome G. Progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice that express distinct molecular form of TNF-alpha. *J Pathol* 2008; 214 : 574-583

Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Grayston JT, Muhlestein B, Giugliano RP, Cairns R, and Skene AM. Antibiotic treatment of *Chlamydia pneumoniae* after acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 2005; 352: 1646–1654,

Cercek B, Shah PK, Noc M, Zahger D, Zeymer U, Matetzky S, Maurer G, and Mahrer P. Effect of short-term treatment with azithromycin on recurrent ischaemic events in patients with acute coronary syndrome in the Azithromycin in Acute Coronary Syndrome (AZACS) trial: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 361: 809–813

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

Chan WL, Pejnovic N, Hamilton H, et al. 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: 675–683

Chang YH, Huang CN, Wu CY, Shiau MY. Association of interleukin-10 A-592C and T-819C polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *Hum Immunol*. 2005; 66: 1258-63

Chen W, Perruche S, Li J. CD4+CD25+ T regulatory cells and TGF-beta in mucosal immune system: the good and the bad. *Curr Med Chem*. 2007; 14: 2245-9

Cheng X, Yu X, Ding YJ, Fu QQ, Xie JJ, Tang TT, Yao R, Chen Y, Liao YH. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol*. 2008; 127: 89-97

Cheng X, Yu X, Ding YJ, Fu QQ, Xie JJ, Tang TT, Yao R, Chen Y, Liao YH. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol*. 2008; 127: 89-97

Cho, B.K, Rao VP, Ge Q, Eisen HN, Chen J. Homeostasis stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells. *J. Exp. Med*. 2000; 192: 549–556.

Cipollone F, Fazia M, Mezzetti A. Novel determinants of plaque instability. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1962-1975

Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Fazia M, De Cesare D, Iezzi A, Ucchino 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, Fazia M, Mincione G, Lezzi A, Pini B, Cuccurullo C, Ucchino S, Spigonardo F, Di Nisio M, Cuccurullo F, Mezzetti A, Porreca E. Increased expression of transforming growth factor-beta 1 as a stabilising factor in human atherosclerotic plaques. *Stroke* 2004; 35: 2253-2257

Cipollone F, Toniato E, Martinotti S, Fazia 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: 2221-8

Constans J, Marchand JM, Conri C, Peuchant E, Seigneur M, Rispal P, Lasseur C, Pellegrin JL, Leng B. Asymptomatic atherosclerosis in HIV-positive patients : A case-control ultrasound study. *Ann Med* 1995; 27: 683-685

Dansky HM, Charlton SA, Harper MM, and Smith JD. T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4642–4646

Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC, Khoury S, Oukka M, Kuchroo VK. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol.* 2008; 9: 1347-55

Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC, Khoury S, Oukka M, Kuchroo VK. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol.* 2008; 9: 1347-55

Daugherty A, Pure E, Delfel-Butteiger D, Chen S, Leferovich J, Roselaar SE, Rader DJ. The effects of total lymphocyte deficiency on the extent of atherosclerosis in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice. *J Clin Invest* 1997; 100: 1575–1580

Davenport P and Tipping PG. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol* 2003; 163: 1117–1125

Davenport P and Tipping PG. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol* 2003; 163: 1117–1125

David C. Neujahr DC, Chuangqi Chen C, Huang X, Markmann JF, Cobbold S, Waldmann H, Sayegh MH, Hancock WW, Turka LA. Accelerated Memory Cell Homeostasis during T Cell Depletion and Approaches to Overcome It. *J Immunol* 2006; 176: 4632–4639

Davidson J, Wilkenson A, Dantal J, et al. New-onset diabetes after transplantation: 2003 International consensus guidelines . Proceeding of an international expert panel meeting. Barcelona, Spain, 19 Feb. 2003. *Transplantation* 2003; 75(Suppl 10): SS3

Depairon M, Chessex S, Sudre P, Rodondi N, Doser N, Chave JP, Riesen W, Nicod P, Darioli R, Telenti A, Mooser V; Swiss HIV Cohort Study. Premature atherosclerosis in HIV-infected individuals-focus on protease inhibitor therapy. *AIDS* 2001; 15: 329-334

Doherty TM, Fisher EA, Arditì M. TLR signaling and trapped vascular dendritic cells in the development of atherosclerosis. *Trends Immunol* 2006; 27: 222-227

Douek DC. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* 2000; 355: 1875–81

Ducloux D, Carron PL, Motte G, Ab A, Rebibou JM, Bresson-Vautrin C, Tiberghien P, Saint-Hillier Y, Chalopin JM. Lymphocyte subsets and assessment of cancer risk in renal transplant recipients. *Transpl Int* 2002; 15: 393-6

Ducloux D, Carron PL, Racadot E, Rebibou JM, Bresson-Vautrin C, Saint-Hillier Y, Chalopin JM. CD4 lymphocytopenia in long-term renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 1998; 30: 2859-60.

Ducloux D, Carron PL, Rebibou JM, Aubin F, Fournier V, Bresson-Vautrin C, Blanc D, Humbert P, Chalopin JM. CD4 lymphocytopenia as a risk factor for skin cancers in renal transplant recipients. *Transplantation.* 1998; 65: 1270-2.

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, Motte G, Challier B, Gibey R, Chalopin JM. Serum total homocysteine and cardiovascular disease occurrence in chronic, stable renal transplant recipients: a prospective study. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11: 134-137

Dumont-Girard F. Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants. *Blood* 1998; 92: 4464–71.

Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, and Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2006; 105: 1158–1161

Editorial. Freely associating. *Nat genet* 1999; 22: 1.

Eid RE, Rao DA, Zhou J, Lo SF, Ranjbaran H, Gallo A, Sokol SI, Pfau S, Pober JS, Tellides G. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2009; 119: 1424-32

Ernst, B., D. S. Lee, J. M. Chang, J. Sprent, and C. D. Surh. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* 1999; 11: 173–181

Erridge C, Kennedy S, Spickett CM, Webb DJ. Oxidized Phospholipid Inhibition of Toll-like Receptor (TLR) Signaling Is Restricted to TLR2 and TLR4: Roles for CD14, LPS-Binding Protein, and MD2 as Targets For Specificity Of Inhibition. *J Biol Chem* 2008; 283: 24748-24759

Erwig LP, Henson PM. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 2008; 15: 243-50

Feng X, Kajigaya S, Solomou EE, Keyvanfar K, Xu X, Raghavachari N, Munson PJ, Herndon TM, Chen J, Young NS. Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in vitro. *Blood* 2008; 111: 3675-83

Fernandez-Fresnedo G, Escalado R, Rodrigo F, de Francisco AL, Sanz de Castro S, Ruiz JC, Pinera C, Cotorruelo JG, Arias M. Pulse pressure is an independent risk factor of cardiovascular disease in renal transplant patients. *Transplant Proc* 2003; 35: 1730-1731

Ferwerda B. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007; 104:16645-50

Ferwerda B, McCall MMB, Verheijen K, Kullberg B-J, van der Ven AJAM, Van der Meer JWM, Netea MG. Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms. *Mol Med* 2008; 14 : 346-352

Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, Ehrenstein MR. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 19396-401

Franckhauser S, Elias I, Rotter Sopasakis V, Ferré T, Nagaev I, Andersson CX, Agudo J, Ruberte J, Bosch F, Smith U. Overexpression of Il6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. *Diabetologia.* 2008; 51: 1306-16

Freigang S, Horkko S, Miller E, Witztum JL, Palinski W. Immunization of LDL receptor-deficient mice with homologous malondialdehyde-modified and native LDL reduces progression of atherosclerosis by mechanisms other than induction of high titers of antibodies to oxidative neoepitopes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18 : 1972-82.

Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999; 145: 33-43

Frostegard J, Wu R, Giscombe R, Holm G, Lefvert AK, and Nilsson J. Induction of T-cell activation by oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 461–467

Galea P, Thibault G, Lacord M, Bardos P, and Lebranchu Y. IL-4, but not tumor necrosis factor- $\alpha$ , increases endothelial cell adhesiveness for lymphocytes by activating a cAMP-dependent pathway. *J Immunol* 1993; 151: 588–596

Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol*. 2001 Feb;13(1):114-9.

Ge Q, et al. Different contributions of thymopoiesis and homeostasis-driven proliferation to the reconstitution of naive and memory T cell compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 2989– 2994

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* 16: 808-816, 2005

Gill JS. Cardiovascular disease in transplant recipients: current and future treatment strategies. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008; 3 Suppl 2: S29-37

Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: 594-606

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.

Glass CK and Witztum JL. Atherosclerosis the road ahead. *Cell* 104: 503–516, 2001

Goldrath, A. W., L. Y. Bogatzki, and M. J. Bevan.. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J. Exp. Med*. 2000; 192: 557–564.

Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1979; 76: 333-337

Gray D, Gray M, Barr T. Innate responses of B cells. *Eur J Immunol*. 2007; 37: 3304-10.

Grayston JT, Kronmal RA, Jackson LA, Parisi AF, Muhlestein JB, Cohen JD, Rogers WJ, Crouse JR, Borrowdale SL, Schron E, and Knirsch C. Azithromycin for the secondary prevention of  
Greaves DR, Hakkinen T, Lucas AD, Liddiard K, Jones E, Quinn CM et al. 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.

Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC,  
Smith SC Jr, and Stone NJ. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol  
Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation* 110: 227–239, 2004

Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *J Pathol.* 2007; 211:144-  
156

Gudmundsdottir, H., and L. A. Turka.. A closer look at homeostatic proliferation of CD4. T cells:  
costimulatory requirements and role in memory formation. *J. Immunol.* 2001; 167: 3699–3707.

Gupta S, Pablo AM, Jiang XC, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN- $\gamma$  potentiates atherosclerosis  
in apoE knock-out mice. *J Clin Invest* 1997; 99: 2752-2761

Hakim FT, et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in  
adults. *J Clin Invest* 2005;115:930–9.

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.

Han GM, O'Neil-Andersen NJ, Zurier RB, Lawrence DA. CD4+CD25high T cell numbers are  
enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol.* 2008; 253:  
92-101L

Hanson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21 :  
1876-1890

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685–1695

Harats D, Yacov N, Gilburd B, Shoenfeld Y, and George J. Oral tolerance with heat shock protein 65 attenuates *Mycobacterium tuberculosis*-induced and high-fat-diet-driven atherosclerotic lesions. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 1333–1338

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

Hasunuma Y, Matsuura E, Makita Z. Involvement of b2-glycoprotein-I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low density lipoprotein uptake by macrophages. *Clin Exp Immunol* 1997; 107:569–574

Hegener HH, Diehl KA, Kurth T, Gaziano JM, Ridker PM, Zee RYL. Polymorphisms of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 gene, and prostaglandin-E receptor 2 gene, C-reactive protein concentrations and risk of atherothrombosis: a nested case-control approach. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1718-1725

Helio T, Halme L, Lappalainen M. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 2003; 52: 558.

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* 2005; 48:1492-1495

Hodgkinson CP, Patel K, Ye S. Functional Toll-like receptor 4 mutations modulate the response to fibrinogen.

*Thromb Haemost.* 2008; 100: 301-7

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: 889-894

Hollestelle SC, De Vries MR, Van Keulen JK, Schoneveld AH, Vink A, Strijder CF, Van Middelaar BJ, Pasterkamp G, Quax PH, and De Kleijn DP. Toll-like receptor 4 is involved in outward arterial remodeling. *Circulation* 2004; 109: 393–398

Hsu HY, Nicholson AC, and Hajjar DP. Inhibition of macrophage scavenger receptor activity by tumor necrosis factor-alpha is transcriptionally and post-transcriptionally regulated. *J Biol Chem* 1996; 271: 7767–7773

Hu FB, Meigs JB, Li TY, et al. Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. *Diabetes* 2004; 53: 693-700

Hugues JR, Davies JA: Anticardiolipin antibodies in clinical situations associated with a risk of thrombotic events. *Thromb Res* 1998; 89:101–106

Huuskonen KH, Kunnas TA, Tanner MM, Mikkelsen J, Ilveskoski E, Karhunen PJ, Nikkari ST. COX-2 gene promoter polymorphism and coronary artery disease in middle-aged men: the Helsinki sudden death study. *Mediators Inflamm* 2008; 2008: 289453.

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

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, and 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: 1953–1960

Jardine AG, Fellstrom B, Logan JO, Cole E, Nyberg G, Gronhagen-Riska C, Madsen S, Neumayer HH, Maes B, Ambuhl P, Olsson AG, Pedersen T, Holdaas H. Cardiovascular risk and renal transplantation: post hoc analyses of the Assessment of Lescol in Renal Transplantation (ALERT) Study. *Am J Kidney Dis.* 2005; 46: 529-36

Junge S, Kloeckener-Gruissem B, Zufferey R, Keisker A, Salgo B, Fauchere JC, Scherer F, Shalaby T, Grotzer M, Siler U, Seger R, Gungör T. Correlation between recent thymic emigrants and CD31+ (PECAM-1) CD4+ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur J Immunol.* 2007; 37: 3270-3280

Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117: 979-87;

Kasiske BL, Chakkera HA, Roel J. Explained and unexplained ischemic heart disease risk after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:1735-1743,

Kasiske BL, Guijarro C, Massy Z, Wiederkehr MR, Ma JZ. Cardiovascular disease after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 158-165

Kasiske BL, McLean JR, Snyder JJ. Acute myocardial infarction and kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 900-907

Kawamoto T, Li M, Kitazaki T, Kimura H. TAK-242 selectively suppresses toll-like receptor 4-signaling mediated by the intracellular domain. *Eur J Pharmacol* 2008; 548 : 40-48

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 2006; 13: 816-25.

Kazory A, Ducloux D. Acquired hypercoagulable state in renal transplant recipients. *Thromb Haemost.* 2004; 91:646-654

Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002; 347: 185-192,

Kieper, W. C., and S. C. Jameson.. Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide/MHC ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 13306–13311

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: 427–433

King VL, Szilvassy SJ, and Daugherty A. Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 456–461

Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptative immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307: 731.

Kohsaka S, Volcik KA, Folsom R, Wu KK, Ballantyne CM, Willerson JT, Boerwinkle E. 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

Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* 2008 Apr;8(4):279-89.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 485-517

Krishnaswamy G, Chi DS, Kelley JL, Sarubbi F, Smith JK, Peiris A. The cardiovascular and metabolic complications of HIV infection. *Cardiol Rev* 2000; 8: 260-268

Krüger B, Böger CA, Schröppel B, Obed A, Hoffmann U, Murphy BT, Fischereider M, Holler E, Banas B, Krämer BK. Impact of NOD2/CARD15 haplotypes on the outcome after kidney transplantation. *Transpl Int.* 2007; 20: 600-607

Krüger B, Krick S, Dhillon N, Lerner SM, Ames S, Bromberg JS, Lin M, Walsh L, Vella J, Fischereeder 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

Kubaszek A, Pihlajamäki J, Komarovski V, Lindi V, Lindstrom J, Eriksson J, Valle TT, Hamalainen H, Hanne-Parikka P, Keinänen-Kiukkaanniemi 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* 2003 ; 52:1872-1876

Lee YW, Hennig B, Toborek M. Redox-regulated mechanisms of IL-4-induced MCP-1 expression in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H185-H192

Lee YW, Kuhn H, Hennig B, Neish AS, Toborek M. IL-4-induced oxidative stress upregulates VCAM-1 gene expression in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 83–94

Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX3CR1<sup>-/-</sup> mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest*. 2003; 111: 333-40.

Lewin SR, et al. Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Blood* 2002; 100: 2235–42

Li A, et al. Co-transplantation of bone marrow stromal cells transduced with IL-7 gene enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *Gene Ther* 2006; 13: 1178–87

Liang S, Alard P, Zhao Y, Parnell S, Clark SL, Kosiewicz MM. Conversion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> cells into CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J Exp Med*. 2005; 201: 127-37

Libby P, Egan D, and Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation* 1997; 96: 4095–4103

Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*. 2006; 203: 1701-11.

Lorenz M, Slaughter HS, Wescott DM, Carter SI, Schnyder B, Dinchuk JE, Car BD.

Cyclooxygenase-2 is essential for normal recovery from 5-fluorouracil–induced myelotoxicity in mice. *Experimental Hematology* 1999; 27: 1494–1502

Lu H, Zhao Z, Kalina T, Gillespy T 3rd, Liggitt D, Andrews RG, Maloney DG, Kiem HP, Storek J. Interleukin-7 improves reconstitution of antiviral CD4 T cells. *Clin Immunol*. 2005; 114: 30-41

Luscinskas FW, Kansas GS, Ding H, Pizcueta P, Schleiffenbaum BE, Tedder TF, and Gimbrone MA. Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta(1)-integrins, and beta(2)-integrins. *J Cell Biol* 1994; 125: 1417–1427

Mackall CL, et al. Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med* 1995; 332: 143–9

Mackall CL, et al. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood* 2001; 97: 1491–7

Mackall CL, et al. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood* 1993; 82: 2585–94

Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Graber P, Alouani S, Esposito B, Humbert Y, Chvatchko Y, and Tedgui A. Interleukin-18/ interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability. *Circ Res* 2001; 89: E41–E45,

Mallat Z, Gojova A, Brun V, Esposito B, Fournier N, Cottrez F, Tedgui A, Groux H. Induction of regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apoE-knockout mice. *Circulation* 2003; 108: 1232-1237

Mallat Z, Heymes C, Ohan J. Expression of interleukin-10 in human atherosclerotic plaques. Relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 611-616

Mallat Z, Tedgui A. Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Circ Res* 2001; 88: 998-1003

Maron R, Sukhova G, Faria AM, Hoffmann E, Mach F, Libby P, and Weiner HL. Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of lowdensity lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2002; 106: 1708 – 1715,

Marsik C, Jilma B, Joukhadar C, Mannhalter C, Wagner O, Endler G. The Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms influence the late inflammatory response in human endotoxemia. *Clin. Chem.* 2005; 51:2178-80

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.

Meier-Kriesche H, Arndorfer JA, Kaplan B. Association of antibody induction with short- and long-term cause-specific mortality in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 769

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

Meier-Krieche HU, Schold JD, Srinivas TR, Reed A, Kaplan B. Kidney transplantation halts cardiovascular disease progression in patients with end-stage renal disease. *Am J Transplant.* 2004; 4: 1662-8

Melian A, Geng YJ, Sukhova GK, Libby P, Porcelli S. CD1 expression in human atherosclerosis. A potential mechanism for T cell activation by foam cells. *Am J Pathol* 1999; 155: 775–786

Michel L, Berthelot L, Pettré S, Wiertlewski S, Lefrère F, Braudeau C, Brouard S, Soullillou JP, Laplaud DA. Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor alpha-chain are excluded from the analysis. *J Clin Invest.* 2008; 118: 3411-9

Miggin SM, O'Neill LA. New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukoc Biol.* 2006; 80: 220-6.

Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, Boullier A, Butler S, Witztum JL. Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1213-1219

Minamimura K, Gao W, Maki T. CD4<sup>+</sup> regulatory T cells are spared from deletion by antilymphocyte serum, a polyclonal anti-T cell antibody. *J Immunol.* 2006; 176: 4125-32

Mockenhaupt FP. Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *J. Commun. Dis.* 2006; 38:230-45.

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: 1432-1435

Murali-Krishna K, Ahmed R. Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells. *J. Immunol.* 2000; 165: 1733–1737

Muraro PA, Douek DC. Renewing the T cell repertoire to arrest autoimmune aggression. *Trends Immunol* 2006;27:61–7

Naiki Y, Sorrentino R, Wong MH, Michelsen KS, Shimada K, Chen S, Yilmaz A, Slepkin A, Schröder NW, Crother TR, Bulut Y, Doherty M, Bradley M, Shaposhnik Z, Peterson EM, Tontonoz P, Shah PK, Arditi M. TLR / MyD88 and liver X receptor alpha signaling pathways reciprocally control Chlamydia pneumoniae-induced acceleration of atherosclerosis. *J Immunol* 2008; 181 : 7176-7185

Nakanishi S, Yamane K, Kamei N, et al. Elevated C-reactive protein is a risk factor for the development of type 2 diabetes in Japanese Americans. *Diabetes Care* 2003; 26: 2754-2757,

Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, and Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997; 100: 2680–2690

Newport MJ. The toll-like receptor 4 Asp299Gly variant: no influence on LPS responsiveness or susceptibility to pulmonary tuberculosis in The Gambia. *Tuberculosis (Edinb)* 2004; 84:347-52

Niessner A, Sato K, Chaikof EL, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM. Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha. *Circulation*. 2006; 114: 2482-2489

Noble NA, Harper JR, Border WA. In vivo interactions of TGF-beta and extracellular matrix. *Prog Growth Factor Res* 1992; 4 : 369-382

Nogueira E, Ozaki KS, Macusso GD, Quarim RF, Câmara NO, Pacheco-Silva A. Incidence of donor and recipient toll-like receptor-4 polymorphisms in kidney transplantation. *Transplant Proc* 2007; 39: 412-414

Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, Cravedi P, Cugini D, Monteferrante G, Aiello S, Cassis L, Gotti E, Gaspari F, Cattaneo D, Perico N, Remuzzi G. Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18: 1007-18

O'Connor CM, Dunne MW, Pfeffer MA, Muhlestein JB, Yao L, Gupta S, Benner RJ, Fisher MR, and Cook TD. Azithromycin for the secondary prevention of coronary heart disease events: the WIZARD study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290: 1459 – 1466

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.

Ogura Y, Lala S, Xin W, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003; 52: 1591-1594

Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H, Saito K, Sekikawa K, and Seishima M. Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 2005; 180: 11–17

Okano M, Sugata Y, Fujiwara T, Matsumoto R, Nishibori M, Shimizu K, Maeda M, Kimura Y, Kariya S, Hattori H, Yokoyama M, Kino K, Nishizaki K. E prostanoic acid 2 (EP2)/EP4-mediated suppression of antigen-specific human T-cell responses by prostaglandin E2. *Immunology* 2006; 118: 343-352

Oviedo-Orta E, Bermudez-Fajardo A, Karanam S, Benbow U, Newby AC. Comparison of MMP-2 and MMP-9 secretion from T helper 0, 1 and 2 lymphocytes alone and in coculture with macrophages. *Immunology*. 2008; 124: 42-50

Palinski W, Witztum JL: Immune responses to oxidative neoepitopes on LDL and phospholipids modulate the development of atherosclerosis. *J Int* 2000; 247:371–380

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; 20:30-36.

Panousis CG, Evans G, Zuckerman SH. TGF-beta increases cholesterol efflux and ABC-1 expression in macrophage-derived foam cells: opposing the effects of IFN-gamma. *J Lipid Res* 2001; 42:856–63

Panousis CG, Zuckerman SH. Regulation of cholesterol distribution in macrophage-derived foam cells by interferon-gamma. *J Lipid Res* 2000; 41:75–83

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

Pauleau AL, Murray PJ. Role of NOD2 in the response of macrophages to Toll-like receptor agonists. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 7531.

Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y. A molecular basis for insulin resistance: elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:29911–8.

Pearl J.P, Parris J, Hale A, Hoffmann SC, Bernstein WB, McCoy KL, Swanson SJ, Mannon RB, Roederer M, Kirk AD. Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion. *Am. J. Transplant.* 2005; 5: 465–474

Pejnovic N, Vratimos A, Lee SH, Popadic D, Takeda K, Akira S, Chan WL. Increased atherosclerotic lesions and Th17 in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice fed high-fat diet. *Mol Immunol.* 2009

Peschon JJ, et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 1994; 180: 1955–60

Philpott DJ, Girardin SE. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol Immunol* 2004; 41: 1099-1104

Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 1998, 41: 1241-1248

Ponticelli C, Villa M, Cesana B, Montagnino G, Tarantino A. Risk factors for late kidney allograft failure. *Kidney Int* 2002; 62: 1848-1852

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286: 327-334

Prlic M., Blazar BR, Khoruts A, Zell T, Jameson SC. Homeostatic expansion occurs independently of costimulatory signals. *J. Immunol.* 200; 167: 5664–5668

Quinn MT, Parthasarathy S, and 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 USA* 1985; 82: 5949–5953,

Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, and Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2995–2998

Randolph GJ. Emigration of monocyte-derived cells to lymph nodes during resolution of inflammation and its failure in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2008; 19: 462-8.

Reardon CA, Blachowicz L, White T, Cabana V, Wang Y, Lukens J, Bluestone J, and Getz GS. Effect of immune deficiency on lipoproteins and atherosclerosis in male apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1011–1016

Ridker PM, Morrow DA. C-reactive protein, inflammation, and coronary risk. *Cardiol Clin* 2003; 21: 315-325

Robertson AK, Hansson GK. T cells in atherogenesis. For better or for worse? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2421-2432

Rocca B, Spain LM, Ciabattoni G, Patrono C, FitzGerald GA. Differential expression and regulation of cyclooxygenase isozymes in thymic stromal cells. *J Immunol.* 1999; 162: 4589-97

Rollins BJ and Pober JS. Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of mcp-1/jc by human endothelial cells. *Am J Pathol* 1991; 138: 1315–1319

Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126

Roux E. Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood* 2000; 96: 2299–303

Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, Huttunen JK, and Valtonen V. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988; 2: 983–986

Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, et al. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992; 339 : 883-7

Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, et al: Autoantibody LDL. *Lancet* 339:883–887, 1992

Saoudi A, Simmonds S, Huitinga I, Mason D. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in rats by targeting autoantigen to B cells: evidence that the protective mechanism depends on changes in the cytokine response and migratory properties of the autoantigen-specific T cells. *J Exp Med* 1995 ; 182 : 335-44

Sancho D, Joffre OP, Keller AM, Rogers NC, Martínez D, Hernanz-Falcón P, Rosewell I, Reis e Sousa C. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature.* 2009; 458: 899-903.

Scarpelli D, Cardellini M, Andreozzi F, Laratta E, Hribal ML, Marini MA, Tassi V, Lauro R, Perticone F, Sesti G. Variants of the interleukin-10 promoter gene are associated with obesity and insulin resistance but not type 2 diabetes in caucasian italian subjects. *Diabetes.* 2006; 55: 1529-

Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 2003; 425: 516-21.

Schiller NK, Boisvert WA, Curtiss LK. Inflammation in atherosclerosis: lesion formation in LDL receptor-deficient mice with perforin and *Lyst*<sup>(beige)</sup> mutations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22: 1341-6

Schippers EF. IL-10 and toll-like receptor-4 polymorphisms and the in vivo and ex vivo response to endotoxin. *Cytokine* 2005; 29:215-28

Schippers EF, van 't Veer C, van Voorden S, Martina CA, le Cessie S, van Dissel JT. TNF-alpha promoter, Nod2 and Toll-like receptor-4 polymorphisms and the in vivo and ex vivo response to endotoxin. *Cytokine* 2004; 26:16-24.

Schluns, KS., Kieper WC, Jameson SC, Lefrancois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat. Immunol*. 2000; 1: 426 –432.

Schwartz DA. Inhaled endotoxin, a risk for airway disease in some people. *Respir. Physiol*. 2001; 128:47-55

Schwartz DA. The role of TLR4 in endotoxin responsiveness in humans. *J. Endotoxin Res*. 2001; 7:389-93.

Schwartz DA. The genetics of innate immunity. *Chest* 2002; 121:62S-8S

Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. 2006; 203: 1693-700.

Sewgobind VD, Kho MM, van der Laan LJ, Hendriks TK, van Dam T, Tilanus HW, Ijzermans JN, Weimar W, Baan CC. The effect of rabbit anti-thymocyte globulin induction therapy on regulatory T cells in kidney transplant patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2009; 24:1635-44

Shah T, Sunamoto M, Kitazaki T, Sato J, Li M, Izawa Y. Therapeutic effects of TAK-242, a novel selective toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor, in mouse endotoxin shock model. *Eur J Pharmacol* 2007; 571: 231-239

Sharma S, Yang S-C, 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: 5211-5218

Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 8264-8268

Song L, Leung C, Schindler C. Lymphocytes are important in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 108: 251–259,

Spranger J, Krobe A, Mohlig M. Inflammatory cytokines and the risk to develop type diabetes: results of the prospective population-based European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)-Postdam study. *Diabetes* 2003; 52: 812-817

Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 1986; 256: 2823–2828

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, 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: 1355–1374,

Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, 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 –856

Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, and Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3893–3897

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 PGE<sub>2</sub>. *J Exp Med* 1994; 180: 2365

Tabib A, Leroux C, Mornex JF, Loire R. Accelerated coronary atherosclerosis and arteriosclerosis in young human-immunodeficiency-virus-positive. *Coron Artery Dis* 11: 41-46, 2000

Takahashi HK, Iwagaki H, Yoshino T, Mori S, Morichika T et al. Prostaglandin E<sub>2</sub> 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

Tan, JT, Ernst B, Kieper WC, LeRoy E, Sprent J, Surh CD.. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8 cells but are not required for memory phenotype CD4. cells. *J. Exp. Med.* 2002; 195: 1523–1532

Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005; 56: 23-46

Taylor-Robinson AW, Phillips RS. B cells are required for the switch from Th1- to Th2-regulated immune responses to *Plasmodium chabaudi* infection. *Infect Immun* 1994; 62 : 2490-8

Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis. Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiol Rev* 2006; 86: 515-581

Tenger C, Sundborger A, Jawien J, Zhou X. IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN-gamma and CXCL16 expression independently of T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 791–796

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

Vaarala O, Manttari M, Manninen V. Anti-cardiolipin antibodies and risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged men. *Circulation* 1995; 91:23–27

Van Der Pouw Kraan TC, Boeije LC, Smeenk RJ, Wijdens J, Arden LA. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin-12 production. *J Exp Med* 1995; 181: 775

Van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJ, Frölich M, Bootsma-Van Der Wiel A, Westendorp RG; Leiden 85 Plus Study. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes : the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes*. 2002; 54: 1088-92

Van Lenten BJ and Fogelman AM. Lipopolysaccharide-induced inhibition of scavenger receptor expression in human monocyte-macrophages is mediated through tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Immunol* 1992; 148: 112–116,

Vaughan CJ and Gotto AM Jr. Update on statins: 2003. *Circulation* 2004; 110: 886 –892

Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C, Stockinger B. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*. 2008; 9: 1341-6

Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, Barthlott T, Stockinger B, Wraith DC, O'Garra A. IL-10-secreting T cells do not express FoxP3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol*. 2004; 172: 5986-93

Vink A, Schoneveld AH, van der Meer JJ, van Middelaar BJ, Sluijter JP, Smeets MB, Quax PH, Lim SK, Borst C, Pasterkamp G, de Kleijn DP. In vivo evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation* 2002; 106: 1985–1990

Von Der Thusen JH, Kuiper J, Fekkes ML. Attenuation of atherogenesis by systemic and local adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-10 in LDLr <sup>-/-</sup> mice. *FASEB J* 2001; 15: 2730-2732

Vozarova B, Fernandez-Real J-M, Knowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD, Ricart W, Vendreli 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. *Human Genet* 2003; 112: 409-413

Wahl SM. Transforming growth factor-beta: innately bipolar. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19: 55-62

Webster A, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. Tacrolimus versus cyclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005; (4):CD003961

Wermeling F, Chen Y, Pikkarainen T, Scheynius A, Winqvist O, Izui S, Ravetch JV, Tryggvason K, Karlsson MC. Class A scavenger receptors regulate tolerance against apoptotic cells, and autoantibodies against these receptors are predictive of systemic lupus. *J Exp Med.* 2007; 204: 2259-65.

Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice through release of interferon- $\gamma$ . *Circ Res* 2002; 90: e17–e22

Whitman SC, Ravisankar P, Elam H, Daugherty A. Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice. *Am J Pathol* 2000; 157: 1819–1824

Williams K, Hakim FT, Gress RE. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Semin Immunol* 2007; 19: 318-330

Wright BH, Corton JM, El-Nahas AM, Wood RF, Pockley AG. Elevated levels of circulating heat shock protein 70 (Hsp70) in peripheral and renal vascular disease. *Heart Vessels* 2000; 15: 18–22

Wu CJ. Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. *Blood* 2000; 95: 352–9

Wu R, Nityanand S, Berglund L. Antibodies against cardiolipin and oxidatively modified LDL in 50-year-old men predict myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:3159–3163

Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, Alexander SI, Sharland AF, Chadban SJ. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2007; 117: 2847-59.

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

Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu XP, Rajavashisth TB, Yano J, Kaul S, Arditi M. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* 2001; 104: 3103–3108

Yaqub S, Johansson CC, Tasken K, Aandahl EM. FOXP3+ CD4+ CD25+ adaptative regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *J Immunol* 2006; 177: 246-254

Zahn R, Schneider S, Frilling B, Seidl K, Tebbe U, Weber M, Gottwik M, Altmann E, Seidel F, Rox J, Hoffler U, Neuhaus KL, Senges J. Antibiotic therapy after acute myocardial infarction: a prospective randomized study. *Circulation* 2003; 107: 1253– 1259

Zhang H, Chua KS, Guimond M, Kapoor V, Brown MV, Fleisher TA, Long LM, Bernstein D, Hill BJ, Douek DC, Berzofsky JA, Carter CS, Read EJ, Helman LJ, Mackall CL. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Med.* 2005; 11: 1238-43

Zhao L, Cuff CA, Moss E, Wille U, Cyrus T, Klein EA, Pratico D, Rader DJ, Hunter CA, Pure E, Funk CD. Selective interleukin-12 synthesis defect in 12/15-lipoxygenase-deficient macrophages associated with reduced atherosclerosis in a mouse model of familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 2002; 277: 35350 – 35356,

Zhou X, Caligiuri G, Hamsten A, Lefvert AK, Hansson GK. LDL immunization induces T-cell-dependent antibody formation and protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 ; 21 : 108-14.

Zhou X, Nicoletti A, Elhage R, Hansson GK. Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 2000; 102: 2919–2922,

Zuckerman E, Toubi E, Shiran A. Anticardiolipin antibodies and acute myocardial infarction in non-systemic lupus erythmatosus patients: A controlled prospective study. *Am J Med* 1996; 101:381– 386